THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR des sciences fondamentales et appliquées
Ecologie et biologie des interactions - EBI (Poitiers)
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

École doctorale : Sciences pour l'environnement - Gay Lussac (La Rochelle)
Secteur de recherche : Biologie des organismes ; Biotechnologies animales, végétales et microbiennes

Présentée par :
Mickael Durand

Étude de l'allocation du carbone dans la plante en réponse à la contrainte hydrique : impact sur l'expression des transporteurs de saccharose dans les organes source et puits

Directeur(s) de Thèse :
Rémi Lemoine, Nathalie Pourtau

Soutenue le 11 décembre 2015 devant le jury

Jury :

Président	**Éric Gomes**	Professeur, Université de Bordeaux
Rapporteur	**Sylvie Dinant**	Directeur de recherche, IJPB, INRA, Versailles
Rapporteur	**Thierry Simonneau**	Directeur de recherche, LEPSE, INRA, Montpellier
Membre	**Rémi Lemoine**	Directeur de recherche, CNRS, Poitiers
Membre	**Nathalie Pourtau**	Maître de conférences, EBI, Université POITIERS
Membre	**Soulaïman Sakr**	Professeur,IRHS, Université d'Angers

Pour citer cette thèse :
Mickael Durand. *Étude de l'allocation du carbone dans la plante en réponse à la contrainte hydrique : impact sur l'expression des transporteurs de saccharose dans les organes source et puits* [En ligne]. Thèse Biologie des organismes ; Biotechnologies animales, végétales et microbiennes. Poitiers : Université de Poitiers, 2015. Disponible sur Internet <http://theses.univ-poitiers.fr>

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)

(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

Ecole Doctorale : Sciences pour l'Environnement Gay Lussac.

Secteur de Recherche : Biologie des organismes ; Biotechnologies Animales, Végétales et Microbiennes

Présentée par :

Mickael DURAND

****

Etude de l'allocation du carbone dans la plante en réponse à la contrainte hydrique : impact sur l'expression des transporteurs de saccharose dans les organes source et puits

****

Directeurs de Thèse :
Rémi LEMOINE
Nathalie POURTAU

****

Soutenue le 11 Décembre 2015 devant la commission d'examen

JURY

Sylvie DINANT	Directeur de recherche INRA Versailles	Rapporteur
Thierry SIMONNEAU	Directeur de recherche INRA Montpellier	Rapporteur
Eric GOMES	Professeur de l'Université de Bordeaux	Examinateur
Soulaiman SAKR	Professeur à Agrocampus Ouest	Examinateur
Rémi LEMOINE	Directeur de recherche CNRS Poitiers	Examinateur
Nathalie POURTAU	Maître de conférences de l'Université de Poitiers	Examinateur

Etude de l'allocation du carbone dans la plante en réponse à la contrainte hydrique : impact sur l'expression des transporteurs de saccharose dans les organe source et puits

L'objectif de cette thèse était d'étudier les transporteurs de saccharose impliqués dans le développement des organes puits, et plus précisément leur rôle dans la racine des plantes soumises à la contrainte hydrique.

L'expression des transporteurs *AtSUCs* et *AtSWEETs* a été cartographiée, au cours du développement complet de plantes *A. thaliana* cultivées en hydroponie, dans la rosette, la hampe, les siliques et les racines. En parallèle, nous avons évalué l'allocation du carbone et le métabolisme des sucres dans la plante entière au cours du développement pour finalement (1) avoir un aperçu de l'allocation du carbone, du métabolisme des sucres ainsi que de l'expression des transporteurs de saccharose et (2) discuter leurs possibles relations.

Dans un second temps, nous avons conçu un système de culture en sol innovant appelé « Rhizobox » permettant la récolte de racines propres, l'analyse de l'architecture du système racinaire et l'application de la contrainte hydrique. Lors de la contrainte hydrique, la croissance racinaire est réduite, mais l'exploration en profondeur du système racinaire est maintenue probablement pour améliorer l'absorption d'eau. De plus, même si la rosette soumise à la contrainte hydrique était plus petite, l'export de ^{14}C, vers la racine, était augmenté. Dans le même temps, les niveaux de transcrits des gènes de facilitateurs de saccharose *AtSWEET11* et *AtSWEET12* ainsi que du gène *AtSUC2*, un symporteur saccharose:H^+ spécifique de la cellule compagne, tous trois impliqués dans le chargement du saccharose dans le phloème, étaient augmentés dans les feuilles des plantes soumises à la contrainte hydrique, corroborant l'augmentation de l'export du carbone vers la racine. De façon intéressante, les niveaux de transcrits des gènes *AtSUC2* et d'*ASWEET11-15*, étaient plus élevés dans les racines stressées, soulignant (1) la potentielle existence d'un déchargement apoplastique du saccharose dans la racine d'*A. thaliana* et (2) un rôle putatif pour ces transporteurs de saccharose dans le déchargement du saccharose dans la racine étant donné qu'ils sont principalement exprimés dans les zones de la racine où la demande en carbone est importante.

Study of plant carbon allocation under water deficit: impact on sucrose transporters genes expression in source and sink organs

The aim of this thesis was to investigate the sucrose transporters involved in sink organs development, and more precisely their role in roots of plants submitted to water deficit.

The expression of *AtSUCs* and *AtSWEETs* transporters was mapped during the full development of *A. thaliana* plants grown hydroponically in rosette, stem, siliques and roots. In parallel, we evaluated C partitioning and sugar metabolism in whole plant during development to finally (1) get an insight on C allocation, sugar metabolism and sucrose transporters genes expression and (2) discuss their possible relationships.

Secondly, we designed an innovating soil culture system, called "Rhizobox" which allows clean roots harvest, root system architecture analysis and water deficit experiment. Under water deficit, root growth was reduced, but in depth root exploration was maintained probably to improve water uptake. In addition, although shoot submitted to water deficit were smaller, ^{14}C exported to the roots increased. In the same time, the transcript levels of the sucrose effluxers gene *AtSWEET11* and *AtSWEET12* and the companion-cell specific sucrose:H^+ symporter gene *AtSUC2*, all three involved in sucrose phloem loading, are up-regulated in leaves of water deficit plants, agreeing with the increase in carbon export to the roots. Interestingly, the transcript levels of *AtSUC2*, and *AtSWEET11-15*, were higher in stressed roots, underlying (1) the potential existence of sucrose apoplastic unloading in *Arabidopsis* roots and (2) a putative role for these sucrose transporters in sucrose unloading in root since they are mainly expressed in root zones where C demand is high.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Ministère de l'Enseignement Supérieur de m'avoir accordé la confiance nécessaire en finançant mes travaux.

Je présente mes remerciements à Sylvie Dinant et Thierry Simonneau pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteurs. Je remercie également Eric Gomès et Soulaiman Sakr d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Je n'oublie pas aussi de remercier Catherine Bellini et Yves Gibon pour leur participation à mon comité de suivi de thèse.

J'adresse mes remerciements à Rossitza Atanassova et Didier Bouchon pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe SEVE et du laboratoire EBI.

J'adresse mes profonds remerciements à Nathalie Pourtau, Laurence Maurousset et Rémi Lemoine pour m'avoir guidé dans mes travaux de thèse. Ces trois années sont passées à une vitesse fulgurante. Je ne me suis jamais ennuyé, et j'ai particulièrement apprécié nos discussions scientifiques. Vous avez toujours écouté mon point de vue même quand j'avais tort. La grande liberté dont j'ai bénéficié quant à l'orientation du projet de recherche est encore un point positif à notre collaboration. Enfin, étant donné qu'il ne faut pas être avare en remerciement (et ce même pour un Charentais) je vous adresse mes sincères remerciements pour le travail de correction et de relecture de ce manuscrit. Vos conseils quant à la rédaction de ce manuscrit ont toujours été judicieux. Merci, à toi Rémi pour toutes ces réflexions concernant le transport des sucres dans la plante, à toi Nathalie, pour tes remarques avisées sur le métabolisme des sucres et la sénescence et merci à toi Laurence, pour tes précisions botaniques, écologiques et pour la correction de toutes les petites coquilles. J'espère d'ailleurs qu'il n'en reste plus.

Bien entendu, je remercie Benoit Porcheron pour l'ensemble de l'aide fournie lors des expérimentations. Le montage des rhizobox, les changements de milieu d'hydroponie, les extractions de sucres, les comptages de radioactivité, tout ça c'était avec toi. Je n'omets pas non plus la participation de Nathalie, Laurence et Rémi aux différentes expérimentations : que ce soit les récoltes nocturnes avec Nathalie et surtout nos têtes de déterrés à 1h et 5h du matin, les manipes de transport avec Rémi le lendemain de Noël ainsi que les récoltes de siliques une par une avec Laurence, Nathalie et Benoit. Merci aussi à Magalie Lallemand et Florence Thibault pour l'aide fournie en microscopie, vous avez toujours été disponibles pour

m’assister. Florence, je retiens particulièrement ton enthousiasme pour aller observer de la racine sous tous ses aspects au MET.

Je tiens à remercier Vincent Lebeurre et Bruno Faure pour avoir apporté un œil attentif à mes plantes et pour tous ces petits services qui vous rendent le travail bien plus simple.

Je n’oublie surtout pas de remercier Cécile Gaillard, notre mère à tous dans les labos. Tes conseils et ton aide sont toujours très utiles. Je n’oublie pas que c’est toi qui, dès le M2, m’a formé aux techniques de PCR et RT-qPCR au labo.

Je tiens à remercier l’ensemble des membres de l’équipe pédagogique pour leur aide et leurs conseils quant à l’exercice de la fonction de DCACE. Je remercie tout particulièrement Nathalie, Mireille Faucher et Sylvain La Caméra pour leurs conseils et leur aide pour l’organisation des séances de TP et TD. Sylvain, j’ai vraiment apprécié nos séances de TP en duo et j’espère avoir été à la hauteur durant ces deux ans et ces séances de TP OPB à répétition.

Je n’oublie pas de remercier l’ensemble des stagiaires ayant contribué de près ou de loin à ce travail de thèse : Robin Dumas, Marie Couëdic, Benois Deslais, Laure Mignerot et Nils Hennion. Nils, non seulement je te remercie pour le gros travail que tu as abattu concernant les micro-greffes, mais surtout je te souhaite la plus grande réussite pour ta thèse, et je te passe donc le relais. D’ailleurs ne te laisse pas intimider par le petit être du laboratoire, plus couramment appelé Florian Veillet, c’est le plus fourbe des doctorants, mais tu verras que ses conseils et avis sont bien souvent très pertinents et, en ce sens, je l’en remercie.

Je remercie aussi les autres doctorantes, Chloé Cardot et Lucie Slawinski et leur souhaite bon courage jusqu’à la fin de leurs travaux : attention ça arrive toujours plus vite qu’on ne le pense. Je n’oublie pas d’avoir une pensée pour les anciens : Jonathan, Pauline, et Dany. Jo, ces presque trois ans en ta compagnie furent bien sympathiques, on aura bien disserté sur à peu près tout, mais surtout on aura bien rigolé dans ce labo qu’on a bien souvent partagé à deux. Les charriages réguliers quant à nos sujets respectifs de recherche ont été autant de bons moments partagés.

Enfin, un énorme merci à mes amis et tout particulièrement à tous les membres de la Douda Family. Je n’oublie pas de remercier chaleureusement Laura qui a su me supporter durant la rédaction de ce manuscrit, et je la remercie par ailleurs pour tous les membres du laboratoire qui ont dégusté ses savoureux cannelés et autres pâtisseries soigneusement confectionnés.

Je dédie l'ensemble de ce travail à mon grand père, Camille, sans qui je n'aurais certainement pas pu arriver jusqu'ici. Merci Papy

Abréviations

$2^{-\Delta Ct}$	Expression relative
2D	Deux dimensions
ABA	Acide abscissique
ACP	Analyse en composantes Principales
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNg	Acide désoxyribonucléique génomique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Bovin serum albumin
CC	Cellule compagne
CNRS	Centre National de Recherche Scientifique
Col-0	Columbia-0
DNSA	Acide dinitrosalicylique
dNTP	Nucléoside triphosphate
DO	Densité optique
DST	Transporteurs de dissacharides
DTT	Dithiothréitol
EBI	Ecologie et biologie des interactions
EDTA	Acide ethylène dimaine tétraacétique
ERD	Early response to dehydration
FRET	Förster resonance energy transfer
GAS	Galactinol synthase
GFP	Green fluorescence protein
GUS	B-Glucuronidase
HEK	Human Embryonic Kidney
INRA	Institut National de Recherche Agronomique
INT	Inositol transporter
INV	Invertase
JAS	Jour après semis
KO	Knock-out
LEA	Late embryogenis abundant
MCE	Methanol chloroforme eau
MES	N-morpholino-2-ethanesulfonic acid
MEX	Maltose excess
MF	Matière fraîche
MFS	Major facilitator superfamily
MS	Matière sèche
MS	Murashige et Skoog
MST	Monosaccharide transporter
Osm	Osmolarité
P	Pression de turgescence
P=GxE	Phénotype = Génome x Environnement
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction

PEG	Polyéthylène glycol
pGlcT	Plastidic glucose translocator
pH	Potentiel hydrogène
PLT	Polyol transporter
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PMT	Polyol monosaccharide transporter
PP	Parenchyme phloèmien
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
R	Constante des gaz parfait
R/S	Root/Shoot
RBC	Ribulose biphosphaste carboxylase
RD	Responsive to dessication
REB	RNA extraction buffer
ROS	Reactive ocygen species
RPG	Ruptured grain pollen
RSA	Root system architecture
RT	Rétro transcription
SAG	Senescence associated gene
SDS	Sodium dodécyl sulphate
SE	Sieve element / Cellule criblée
SEVE	Sucres & Echange Végétaux-Environnement
SFP	Sugar porter family protein
SLA	Specific leaf area
St	Stressé
STP	Sugar transporter protein
SUC	Sucrose transporter
SWEET	Sugar will eventually be exported transporter
T	Température
TIP	Tonoplast intrinsic protein
Tm	Témoin
TMT	Tonoplast monosaccharide transporter
TPT	Triose phosphate transporter
Tris	Tri-(hydroxyméthyl)-amino méthane
UMR	Unité Mixte de Recherche
VEX	Vegetative cell expressed
VGT	Vacuolar glucose transporter
WC	Water content
X-glu	Glucopyranoside
Xoo	Xanthomonas oryzae pv. Oryzae
ψ_{Eau}	Potentiel hydrique
ψ_{Osm}	Potentiel osmotique

Table des matières

I. Etude bibliographique 1

1 Production et transport des sucres chez les végétaux 2

1.1 Production des sucres 2

1.2 Source vs. Puits 2

1.3 Chargement du phloème 3

1.4 De la source au puits 4

1.5 Le déchargement du phloème 5

1.6 Relation source-puits, importance de la force de puits 5

2 Les transporteurs de sucres 6

2.1 Les gènes de transporteurs de dissacharides (DST) 6

2.2 Les gènes de transporteurs de monosaccharides (MST) 8

2.2.1 La sous-famille des AtSTP (Sugar Transporter Protein) 8

2.2.2 La sous famille des AtERD6-like (Early Response to Dehydration) 9

2.2.3 La sous famille des AtpGlucT 10

2.2.4 La sous famille des AtPMT (Polyo Monosaccharide Transporter) ou AtPLT 10

2.2.5 Les transporteurs de monosaccharides vacuolaires : les sous-familles AtVGT et AtTMT 10

2.2.6 La sous-famille des AtINT (INositol Transporter) 11

2.3 Les transporteurs de type SWEET 11

2.4 Transporteurs de sucres et allocation du carbone entre source et puits 13

2.4.1 Depuis la source… 13

2.4.2 …en passant par le phloème… 15

2.4.3 …vers les puits 15

3 Le déficit hydrique 16

3.1 Définitions et impact 16

3.1.1 Sécheresse 17

3.1.2 Le potentiel hydrique (ψ_{Eau}) 17

3.1.3 Le stress 18

3.2 Les différentes stratégies face au déficit hydrique 18

3.2.1 L'échappement à la sécheresse 18

3.2.2 L'évitement de la sécheresse 19

3.2.3 La tolérance à la sécheresse 20

3.2.4 La survie à la sécheresse 20
3.3 Les réponses mises en place lors du déficit hydrique 21
3.3.1 A l'échelle de la plante 21
3.3.2 A l 'échelle du métabolisme et de la cellule 23
4 Objectifs de l'étude 26
II. Matériel et Méthodes 29
1 Matériel végétal 30
2 Méthodes 30
2.1 Culture des plantes en hydroponie 31
2.1.1 Le système d'hydroponie 31
2.1.2 Expérimentation « circadienne » 32
2.1.3 Expérimentation « Développement » 32
2.1.4 Expérimentation « Contrainte osmotique » 32
2.2 Culture des plantes en rhizobox 33
2.2.1 La rhizobox : un système de culture innovant 33
2.2.2 Expérimentation « Carence hydrique en rhizobox » 35
2.3 Suivi physiologique des plantes 36
2.3.1 Nombre de feuilles et surface foliaire projetée 36
2.3.2 Analyse du système racinaire 36
2.3.3 Suivi du statut hydrique des plantes 37
2.3.4 Suivi de l'allocation de la biomasse (Root/Shoot) 38
2.3.5 Suivi du contenu en sucres solubles et amidon 38
2.3.6 Suivi de l'expression des gènes 39
2.3.7 Suivi des relations source-puits pour le carbone 41
2.4 Etude de la localisation de transporteurs de saccharose 43
2.4.1 Etude de la localisation de l'expression *via* l'utilisation de plantes exprimant le gène de la β-glucuronidase (GUS) 43
2.4.2 Localisation de AtSUC2 par immunolocalisation 44
2.5 La micro-greffe : une technique pour étudier spécifiquement l'impact d'une mutation au niveau racinaire 45
III. Chapitre « Etude des relations source-puits dans des situations contrastées » 48
Avant propos 49
IV. Chapitre « Etude de l'allocation du carbone en réponse à la contrainte hydrique en rhizobox » 89

Avant propos **90**

V. Chapitre **116**

« Contrainte hydrique vs. Contrainte osmotique » **116**

Résultats **117**

1 Rappel des principaux effets de la contrainte osmotique appliquée **117**

2 Rappel des principaux effets de la contrainte hydrique appliquée **118**

3 Comparaison des contraintes hydrique et osmotique **119**

3.1 Développement, statut hydrique et expression des gènes marqueurs **120**

3.2 Teneurs en sucres solubles et amidon **120**

3.3 Expression des transporteurs de saccharose **121**

3.3.1 Dans la rosette 121

3.3.2 Dans la racine 122

Discussion **124**

1 Système d'hydroponie et contrainte osmotique **124**

1.1 Le système d'hydroponie : avantages et inconvénients **124**

1.2 Le PEG comme agent osmotique **125**

2 Rhizobox et contrainte hydrique **125**

2.1 La rhizobox : un système présentant de nombreux avantages **125**

2.2 Détermination de la contrainte hydrique appliquée **126**

3 Rhizobox vs. Hydroponie **127**

3.1 Les plantes « Tm Hydroponie » et « Tm Rhizobox » se distinguent par plusieurs aspects……. **127**

3.2 Contrainte hydrique vs. Contrainte osmotique **128**

3.2.1 Des effets communs d'ampleur différente…. 128

3.2.2 Deux stratégies différentes pour deux réponses racinaires différentes 133

Bilan **135**

VI. Chapitre « *AtSUC1* » **136**

Résultats **137**

1 Etude du mutant suc1 (GK-139B11-#05) **137**

2 Etude la localisation de l'expression d'At*SUC1* dans la racine **140**

Discussion **142**

1 **Caractérisation du mutant *suc1*** **142**

1.1 L'expression du gène *AtSUC5* est stimulée dans les racines du mutant *suc1* **142**

1.2 Etude de l'expression d'*AtSUC5* dans les racines du mutant *suc1* : vers une régulation analogue à celle d'*AtSUC1* dans la racine de Col-0 ? **143**

2 Quelle fonction pour AtSUC1 dans la racine ? **145**

Bilan **147**

VII. Chapitre « *AtSUC2 »* **148**

Résultats **149**

1 Etude de l'effet de la mutation d'AtSUC2 ..... **149**

1.1 **Avant propos sur la micro-greffe chez *A. thaliana*** **150**

1.2 Effet des différentes greffes sur la biomasse **150**

1.3 Effet des différentes greffes sur les teneurs en sucres **151**

1.3.1 Teneurs en sucres solubles et amidon dans les feuilles 151

1.3.2 Teneurs en sucres solubles dans les racines 152

2 Etude de la localisation de l'expression d'*AtSUC2* dans la racine **153**

2.1 Localisation de l'expression d'*AtSUC2* dans la racine à l'aide de plantes pAtSUC2-GUS **154**

2.2 Localisation de l'expression d'*AtSUC2* dans la racine à l'aide de plantes pAtSUC2-GFP **155**

3 Etude de la localisation de la protéine AtSUC2 ..... **156**

3.1 Validation de l'anticorps anti-AtSUC2 ..... **156**

3.2 **Etude de la localisation de la protéine AtSUC2 dans la racine d'*A. thaliana*** **157**

Discussion **158**

1 **La mutation KO d'*AtSUC2* confinée à la racine impacte son développement sans pour autant affecter celui de la rosette** **158**

2 Quel rôle pour AtSUC2 dans la racine ? **159**

3 AtSUC2 est particulièrement exprimé au niveau de la zone de départ des racines et dans les pointes racinaires **163**

Bilan **166**

VIII. Chapitre « *AtSWEET11 et 12 »* **167**

Résultats **168**

1 Etude de *sweet11/sweet12* à l'aide de plantes greffées **168**

1.1 Etude la biomasse **169**

1.2 Etude des différentes greffes sur les teneurs en sucres **169**

1.2.1 Teneurs en sucres solubles et amidon dans les feuilles 170

1.2.2 Teneurs en sucres solubles dans les racines 171

2 Etude de la localisation de l'expression d'AtSWEET11 et d'*AtSWEET12* dans la racine **172**

2.1 Localisation de l'expression d'*AtSWEET11* dans la racine **172**

2.2 Localisation de l'expression d'AtSWEET12 dans la racine **173**

Discussion **175**

1 Le double mutant KO *sweet11-12* présente une teneur en saccharose réduite dans la racine **176**

2 Quelles conséquences au confinement de la double mutation KO à un seul organe ? **176**

3 *AtSWEET11* et *AtSWEET12* présentent une localisation différente dans la racine **178**

Bilan **182**

IX. Conclusion générale et perspectives **183**

1 Cartographie au cours du développement **184**

2 La réduction de la disponibilité en eau comme facteur modifiant les relations source-puits ? **184**

2.1 Les plantes soumises à la contrainte osmotique ne montrent pas de réallocation de carbone vers la racine **185**

2.2 Les plantes soumises à la contrainte hydrique appliquée montrent une réallocation du carbone vers la racine **185**

2.3 La réallocation du carbone vers la racine est probablement supportée par la régulation de l'expression des transporteurs de saccharose **186**

2.3.1 … dans la rosette 186

2.3.2 …mais aussi dans la racine 186

3 Quel pourrait être le rôle des transporteurs de saccharose dans la racine ? **187**

3.1 *AtSUC1* : un rôle éventuel dans l'expansion cellulaire racinaire ? **187**

3.2 *AtSUC2* : un rôle dans le développement racinaire en participant au rechargement et/ou au déchargement du saccharose? 188

3.3 *AtSWEET11* et *AtSWEET12* pourraient contribuer à nourrir les tissus environnant les tissus conducteurs 188

4 Développement d'outils pour l'étude de la racine et des relations source-puits... 189

5 Perspectives 189

5.1 Quelle est la localisation cellulaire de l'expression des transporteurs de saccharose ? 190

5.2 Déterminer le rôle de la racine dans les relations source-puits pour le carbone . 190

5.3 Quelle est la structure anatomique du complexe de chargement du phloème et du phloème de transport ? 191

5.4 Quel est le devenir de l'excédent de carbone exporté vers la racine ? 191

5.5 Vers une caractérisation de la fonction des transporteurs de saccharose dans la racine 192

6 En conclusion 193

X. Références bibliographiques 194

XI. Annexes 215

Annexe I 216

Annexe II 220

Annexe III 222

Annexe IV 223

Annexe V 224

Annexe VI 226

Annexe VII 227

Annexe VIII 228

I. Etude bibliographique

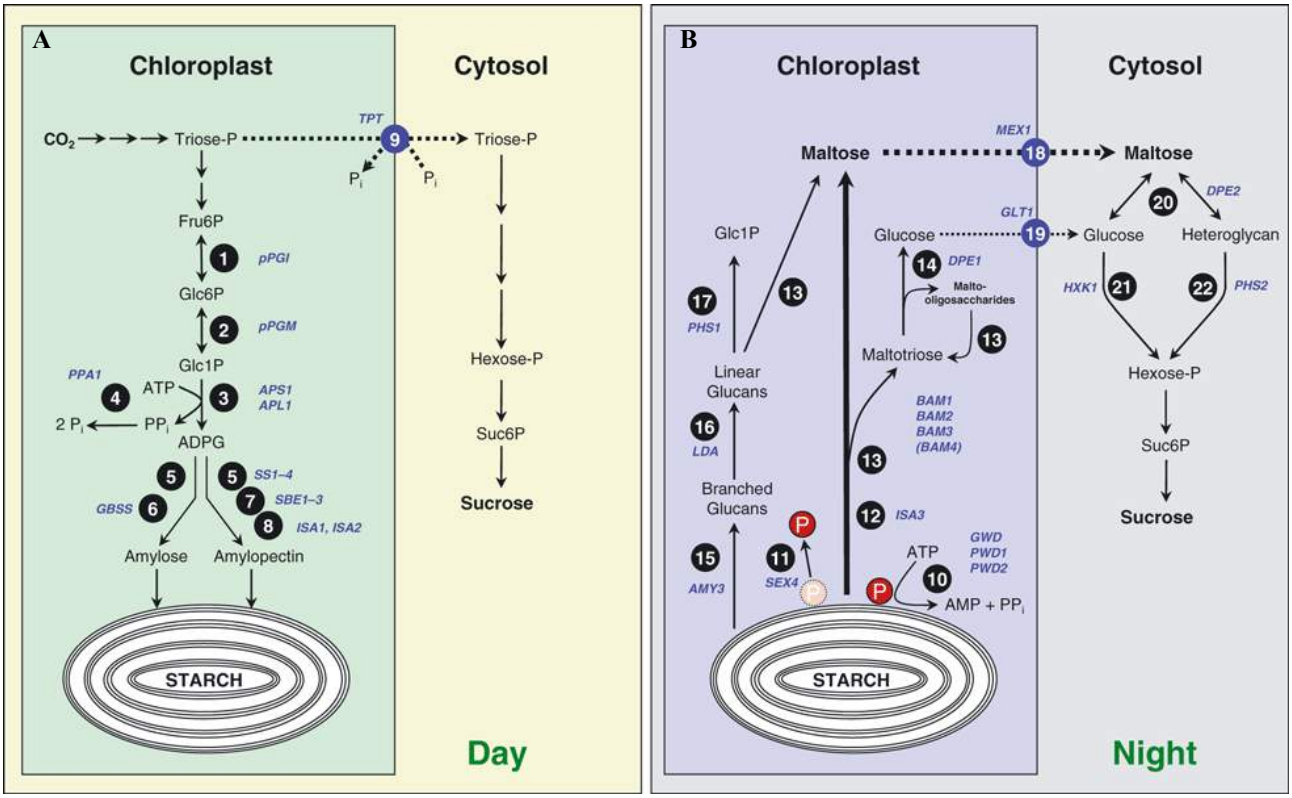


Figure 1 *Production et dégradation de l'amidon dans les feuilles*.
A. L'amidon est synthétisé dans le chloroplaste le jour. Les trioses-phosphate produits par le cycle de Calvin-Benson sont soit utilisés pour la production d'amidon, soit exportés dans le cytosol pour la synthèse de saccharose. **B.** La nuit, l'amidon est dégradé majoritairement sous forme de maltose et dans une moindre mesure sous forme de glucose pour ensuite être exportés dans le cytosol pour la synthèse de saccharose (Stitt *et al*., 2010).

1 Production et transport des sucres chez les végétaux

1.1 Production des sucres

Les végétaux supérieurs sont autotrophes pour le carbone. Ils sont capables de synthétiser leur matière organique carbonée à partir du CO_2 atmosphérique et de l'eau puisée dans le sol. Le processus de réduction du dioxyde de carbone par la photosynthèse nécessite un apport énergétique fourni par la lumière. La production d'hydrates de carbone se résume alors comme ceci : 6 CO_2 + 6 H_2O + énergie lumineuse ➔ $C_6H_{12}O_6$ + 6 O_2. La réaction de photosynthèse se déroule principalement dans les chloroplastes des cellules du mésophylle des feuilles adultes des végétaux supérieurs (**Figure 1**). Une fois le CO_2 fixé, les trioses phosphate qui en résultent sont soit exportés dans le cytosol pour être convertis en saccharose, soit stockés provisoirement sous forme d'amidon dans le stroma. Cet amidon est dégradé durant la nuit en maltose ou en glucose (**Figure 1**). Ces molécules sont alors adressées vers le cytosol où elles sont transformées en saccharose. Dans les deux cas, le saccharose alors produit est soit exporté vers le phloème, soit compartimenté dans la vacuole où il peut être clivé en glucose et fructose ou conservé tel quel (Stitt *et al.*, 2010).

1.2 Source vs. Puits

Chez les végétaux supérieurs, toutes les cellules ne réalisent pas la photosynthèse (Truernit, 2001). Il convient ainsi de différencier les organes sources, exportateurs de molécules carbonées, des organes puits, importateurs de ces molécules carbonées. Les organes sources tels que les feuilles adultes sont capables de réaliser la photosynthèse et ont une production de sucres supérieure aux besoins nécessaires pour le développement, la croissance et le métabolisme de l'organe. En revanche, les organes puits comme les organes de reproduction, de stockage, les jeunes feuilles et les racines n'ont, soit pas la possibilité de réaliser la photosynthèse, soit pas la capacité de produire les sucres nécessaires et sont donc dépendants des organes sources vis-à-vis du carbone. Le saccharose est le sucre majoritairement transporté pour alimenter les organes puits. Le fait que le saccharose soit un sucre non réducteur et plutôt inerte au niveau métabolique n'est en rien étranger à cela (Lemoine, 2000). Le transport du saccharose entre organe source et organe puits se fait par l'intermédiaire du phloème. Un tel transport à longue distance nécessite le chargement du saccharose dans le phloème au niveau des organes sources et son déchargement depuis le phloème au niveau des organes puits.

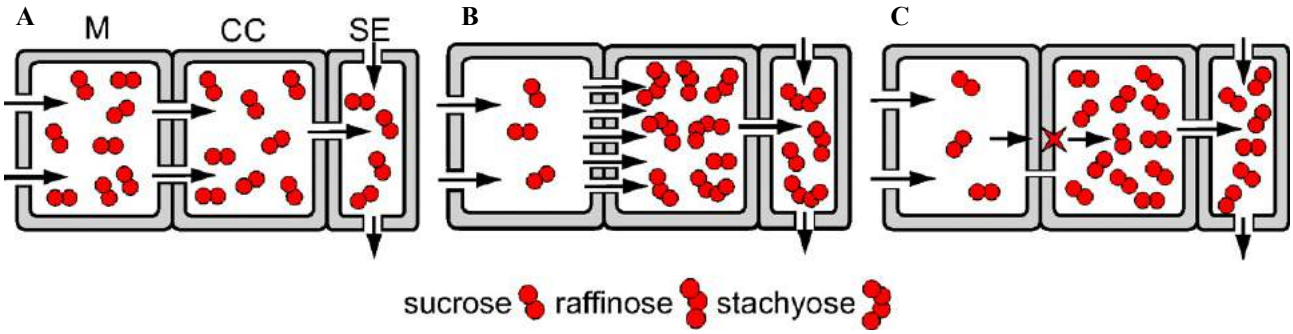


Figure 2 *Les trois stratégies de chargement du saccharose dans le phloème*.
A. Chargement symplastique. **B.** Chargement symplastique avec piégeage moléculaire. **C.** Chargement apoplastique. (M), (CC) et (SE) représente respectivement le mésophylle, la cellule compagne et le tube criblé (adapté de Rennie and Turgeon, 2009).

1.3 Chargement du phloème

Il existe 3 stratégies de chargement du phloème : le chargement apoplastique et le chargement symplastique avec ou sans piégeage moléculaire (**Figure 2**) (Rennie and Turgeon, 2009). Dans tous les cas, le saccharose est transporté depuis les cellules du mésophylle où il est produit jusqu'aux cellules du parenchyme phloémien. Ce mouvement se fait de cellule en cellule *via* les plasmodesmes selon un gradient de concentration en saccharose (Lalonde *et al.*, 2003). C'est au niveau de la jonction entre le parenchyme phloémien et le complexe conducteur (cellule compagne/cellule criblée) que le saccharose va être concentré.

Dans le cas d'un chargement symplastique, le saccharose va diffuser de manière passive des cellules du parenchyme phloémien vers les cellules compagnes *via* les plasmodesmes (**Figure 2A**). Un tel transport nécessite un grand nombre de plasmodesmes à l'interface entre la cellule du parenchyme phloémien ainsi qu'une forte concentration en saccharose dans les cellules du mésophylle. Ce type de transport peut être associé au « piégeage moléculaire » où les molécules de saccharose sont alors « galactosylées » une ou deux fois pour respectivement former du raffinose ou du stachyose, à l'intérieur de la cellule compagne où elles sont alors piégées, puisque ne pouvant pas passer par les plasmodesmes reliant la cellule compagne au parenchyme phloémien (**Figure 2B**). Ce procédé permet de maintenir un gradient de « saccharose » sans pour autant nécessiter de fortes concentrations en saccharose dans les cellules du mésophylle. Ce sont alors ces triholosides et tétraholosides qui sont transportés dans le phloème vers les organes puits (Rennie and Turgeon, 2009).

En revanche lors d'un chargement apoplastique, le saccharose est dans un premier temps exporté depuis le cytosol des cellules du parenchyme phloémien vers l'apoplaste (**Figure 2C**). Chez *Arabidopsis thaliana*, l'efflux du saccharose dans l'apoplaste à proximité environnante du complexe conducteur est contrôlé par deux facilitateurs récemment découverts, AtSWEET11 et AtSWEET12 (**Figure 3**) (Chen *et al.*, 2012). En tant que facilitateurs, ces transporteurs ne requièrent pas d'énergie pour fonctionner. Le saccharose présent dans l'apoplaste doit ensuite être concentré dans les cellules compagnes du complexe conducteur. La concentration en saccharose du complexe conducteur est bien plus élevée que dans l'apoplaste environnant, ainsi l'influx du saccharose nécessite un transport actif et donc une dissipation d'énergie. Le mécanisme de chargement actif du phloème depuis l'apoplaste implique la présence de transporteurs de saccharose au niveau de la membrane des cellules compagnes (**Figure 3**) (Lalonde *et al.*, 2004). Ces transporteurs de type Sucrose Carrier (Ayre, 2011) co-transportent une molécule de saccharose avec un proton et utilisent la force

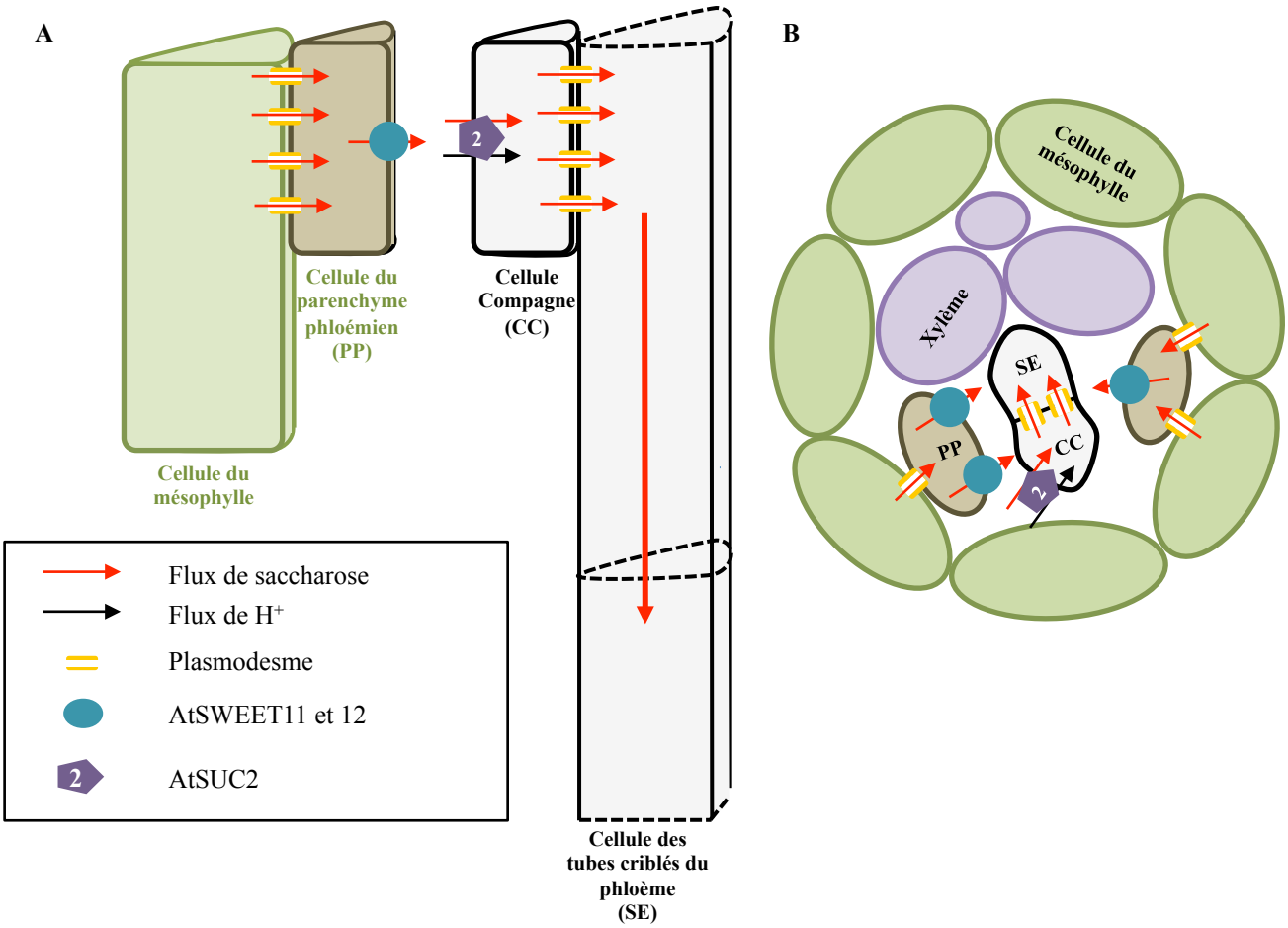


Figure 3 *Transporteurs de saccharose et chargement apoplastique du phloème*.
A. Schéma d'une vue longitudinale du complexe de chargement. **B.** Schéma d'une vue transversale du complexe de chargement. Le saccharose diffuse depuis les cellules du mésophylle vers les cellules du parenchyme phloémien *via* les plasmodesmes. Il est ensuite relâché dans l'apoplaste *via* les facilitateurs AtSWEET11 et AtSWEET12 pour être chargé dans la cellule compagne *via* l'activité du symport saccharose/H^+ AtSUC2. Enfin le saccharose diffuse depuis la cellule compagne vers le tube criblé à travers les plasmodesmes.

protomotrice pour faire rentrer le saccharose dans la cellule compagne contre son gradient de concentration (Dinant and Lemoine, 2010; Giaquinta, 1979). Cette force protomotrice est fournie par une ATPase pompe à protons de la membrane plasmique qui exporte des ions H^+ dans l'apoplaste environnant la cellule compagne (Michelet and Boutry, 1995). Ainsi, le saccharose peut atteindre des concentrations allant de la centaine de millimolaires jusqu'à plus d'un molaire dans les cellules du phloème, alors que la concentration de l'apoplaste est située entre 2 et 7 millimolaires (Livingston and Henson, 1998; Lohaus *et al.*, 2000). Le saccharose ainsi chargé atteindra alors le tube criblé *via* les nombreux plasmodesmes branchus présents au niveau de l'interface entre la cellule criblée et la cellule compagne.

1.4 De la source au puits

L'ensemble des mécanismes décrits ci-dessus concerne le transfert du saccharose dans la zone dite de chargement du phloème (van Bel, 2003) qui représente l'étape initiale du transport à longue distance (Lemoine *et al.*, 2013). Le transport du saccharose de la source vers le puits se déroule dans le phloème de transport et la sortie au niveau du puits a lieu dans la zone de déchargement du phloème (van Bel, 2003). Ces trois zones du phloème se distinguent non seulement par leur fonction, mais aussi par leur structure (**Figure 4**). La cellule compagne est bien plus volumineuse que la cellule criblée dans la zone de chargement du phloème. Au niveau du phloème de transport, la cellule compagne est moins volumineuse que la cellule criblée et elle est encore plus petite voire inexistante au niveau de la zone de déchargement du phloème (van Bel, 2003). Le concept le plus largement accepté pour expliquer le transport du saccharose et des solutés dans les tubes criblés du phloème est la théorie du flux de masse proposée par Münch en 1930. Ce modèle indique que la différence de pression hydrostatique au sein du phloème entre organes source (forte pression) et puits (basse pression) engendre le mouvement de la sève de la source vers le puits.

Lors du transport longitudinal, une fraction du saccharose s'échappe du phloème. Une partie sert à alimenter en squelettes carbonées les tissus puits environnants et une autre partie est réabsorbée au sein du phloème (Hafke *et al.*, 2005; Minchin *et al.*, 1984; Minchin and Thorpe, 1987). Le processus par lequel le saccharose s'échappe le long du phloème de transport reste inconnu, même si les facilitateurs de transport de saccharose que sont les SWEETs sont des cibles potentielles (Ludewig and Flügge, 2013). La collecte du saccharose depuis l'apoplaste vers le phloème de transport nécessite de l'énergie (car contre le gradient de concentration en saccharose) apportée par la force protomotrice. Ainsi la récupération du saccharose est conditionnée par le gradient de pH entre l'apoplaste, le phloème de transport et

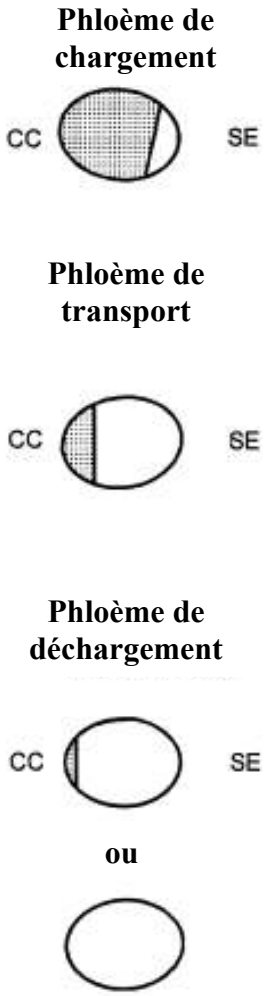


Figure 4 Volumes occupés par la cellule compagne (CC) et le tube criblé (SE) dans le phloème de chargement, le phloème de transport et le phloème de déchargement (adapté de van Ben *et al*., 2003)

les cellules environnantes (Hafke *et al.*, 2005) et la présence de co-transporteurs de saccharose/H^+ (SUC) selon un mécanisme semblable à celui se déroulant dans le phloème de chargement (Ayre, 2011).

1.5 Le déchargement du phloème

Contrairement aux fuites du saccharose pendant le transport longitudinal, les premières étapes du déchargement du saccharose au niveau des organes puits impliquent très souvent la voie symplastique (Patrick, 1997). En effet, l'utilisation d'un marqueur fluorescent (carboxyfluorescéine) a démontré que le déchargement *via* la voie symplastique était dominant dans les puits forts comme les pointes racinaires chez *A. thaliana* (Oparka *et al.*, 1994). De plus, le déchargement par la voie symplastique présente l'avantage d'offrir une grande capacité de transport et une faible résistance (Patrick, 1997). Au delà de la zone de déchargement du phloème, le type de transport se déroulant par la suite varie particulièrement selon le type de puits et le stade de développement. En effet, un transport des sucres *via* la voie apoplastique est possible par la suite. Durant la formation du fruit chez le pommier et le cerisier, il y a une étape de déchargement par la voie apoplastique du saccharose et du sorbitol impliquant des transporteurs (Gao *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004). De même, le déchargement apoplastique est dans certains cas obligatoire pour atteindre des zones isolées, c'est notamment le cas de la graine où la présence d'une discontinuité symplastique nécessite un passage par l'apoplaste (Patrick, 1997). Le saccharose est importé dans la cellule de destination par des transporteurs de type SUC. Le saccharose peut aussi être clivé en glucose et fructose par des invertases pariétales, et ce sont alors des co-transporteurs hexose/H^+ qui transportent activement les hexoses produits vers les cellules receveuses (Lalonde *et al.*, 2004). Les sucres ainsi transportés peuvent ensuite être directement utilisés ou stockés sous forme de sucres (*Vitis vinifera*, *Beta vulgaris*), d'amidon (*Solanum tuberosum*), d'acides gras (*Brassica napus*) ou encore de protéines (*Glycine max*) (Ludewig and Flügge, 2013).

1.6 Relation source-puits, importance de la force de puits

Le transport du saccharose à longue distance permet d'alimenter en carbone tous les organes puits de la plante. Il faut donc alors considérer la plante comme un réseau complexe de sources et de puits. Ainsi les différents organes puits de la plante sont en compétition pour l'apport en carbone, et une hiérarchie est établie selon le type d'organe et le stade de développement (Lemoine *et al.*, 2013). Les racines et les jeunes feuilles sont des puits majeurs lors des premières phases de développement de la plante, alors que les fruits et les

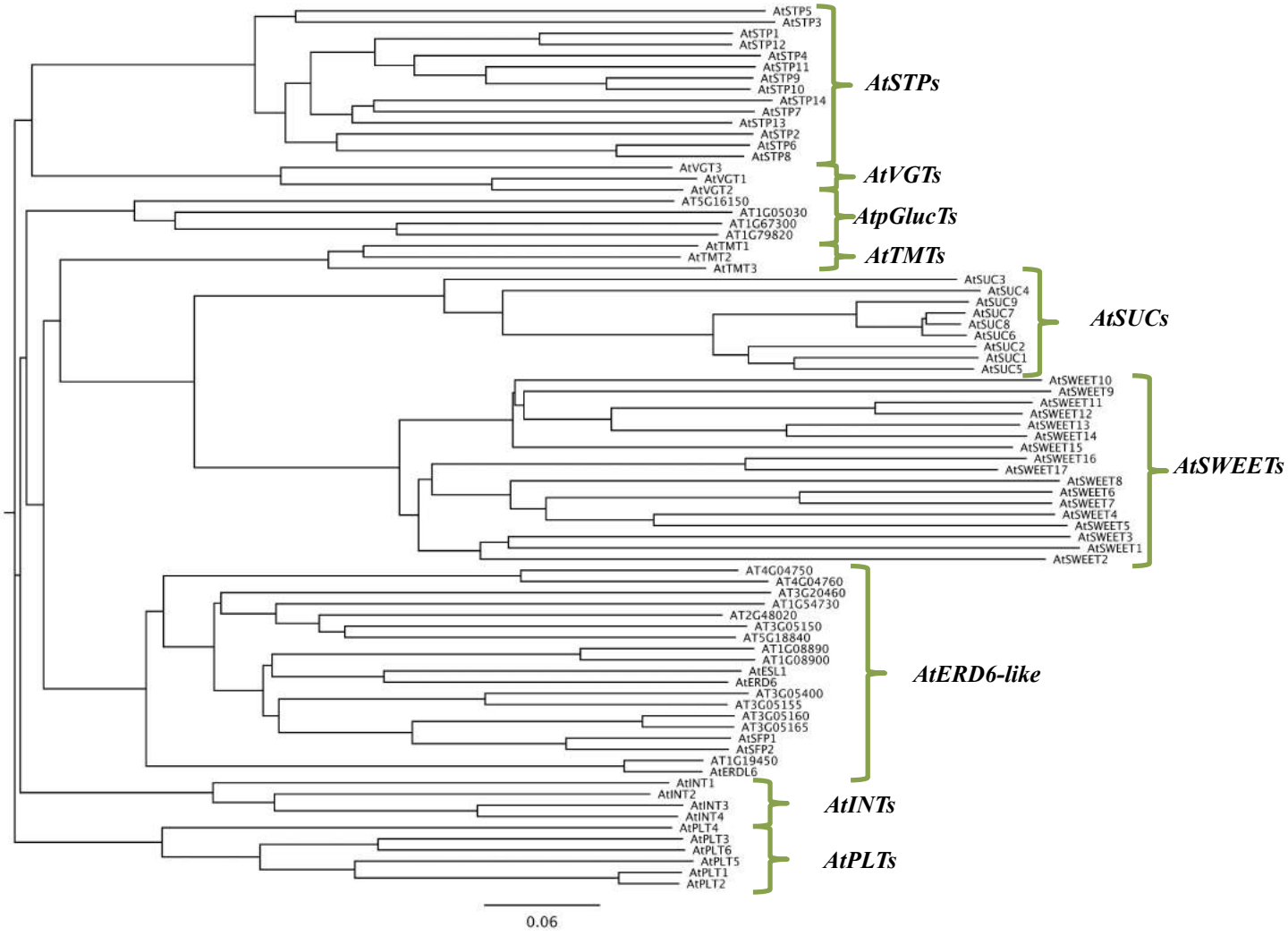


Figure 5 *Arbre phylogénétique des transporteurs de sucres identifiés chez Arabidopsis thaliana*.
Les transporteurs SWEET et les transporteurs de sucres de la MFS (Major Facilitator Superfamily) sont représentés.

graines deviennent des puits importants durant la phase de reproduction (Wardlaw, 1990). La hiérarchie entre les différents puits est déterminée par la force de puits (Ho, 1988). La force de puits représente la capacité à diminuer la concentration en photo-assimilats dans les cellules du tube criblé au niveau du puits, pour établir un gradient de pression hydrostatique favorable au transport à longue distance entre source et puits (Wardlaw, 1990). Différentes stratégies sont mises en place pour diminuer la concentration en saccharose, les invertases et la saccharose synthase clivent notamment le saccharose en glucose et fructose (Ruan, 2014). Dans chacun des cas, des transporteurs de sucres sont impliqués, qu'ils soient présents au niveau de la membrane plasmique de la cellule, de la vacuole ou encore des plastes. D'autre part, les organes sources conditionnent aussi l'apport de sucres vers les puits puisque des teneurs en saccharose trop importantes dans les feuilles inhibent l'activité des transporteurs SUC et donc le chargement du phloème (Chiou and Bush, 1998).

2 Les transporteurs de sucres

Les transporteurs de sucre ont donc un rôle prépondérant dans l'allocation du carbone entre source et puits, car ils vont réguler les différents flux de sucres à l'intérieur de la plante. Ces transporteurs peuvent être situés au niveau de la membrane plasmique de la cellule, du tonoplaste de la vacuole ou des membranes des plastes. De même, la nature des molécules transportées est variable : saccharose, hexoses, trioses phosphate ou même polyols.

Les transporteurs de sucres se distinguent selon deux grandes classes chez les plantes : les transporteurs SWEET (Chen, 2013) et les transporteurs MFS (Major Facilitator Superfamily) parmi lesquels on retrouve les SUC (Sucrose Carrier) et les STP (Sugar Transporter Protein) (Lalonde *et al.*, 2004) (**Figure 5**).

2.1 Les gènes de transporteurs de dissacharides (DST)

Chez *A. thaliana*, il existe 9 séquences codant des transporteurs de saccharose (SUC), notées *AtSUC1* à *AtSUC9* (Sauer, 2007). Ces transporteurs membranaires, de type symport saccharose/H^+, transportent le saccharose contre son gradient de concentration en utilisant la force protomotrice.

AtSUC1 est exprimé dans le grain de pollen (Stadler *et al.*, 1999), les trichomes et les racines (Sivitz *et al.*, 2007). *AtSUC1* est nécessaire à la germination du grain de pollen, il serait impliqué dans la croissance du tube pollinique (Sivitz *et al.*, 2008). Les caractéristiques de transport d'AtSUC1 sont relativement proches de celles d'AtSUC2 (Ludewig and Flügge,

2013) même si leur profil d'expression est différent. D'ailleurs l'expression d'*AtSUC1* sous le contrôle du promoteur d'*AtSUC2* supprime le défaut de croissance généralement observé chez le mutant *suc2* (Wippel and Sauer, 2011). *AtSUC1* est exprimé dans les racines et cette expression est d'autant plus forte en présence de saccharose dans le milieu extérieur (Sivitz *et al.*, 2008). D'ailleurs lors de l'application exogène de saccharose, l'accumulation d'anthocyanes observée chez les plantes sauvages n'est pas observée chez le mutant *suc1,* suggérant un rôle pour AtSUC1 dans la transduction du signal saccharose aboutissant à l'accumulation d'anthocyanes (Sivitz *et al.*, 2008; Solfanelli *et al.*, 2006). *AtSUC1* est régulé par la signalisation de l'ABA, au travers du contrôle négatif du facteur de transcription ABI5 (Hoth *et al.*, 2010).

AtSUC2 est exprimé dans les feuilles, les hampes florales, les sépales et les racines et plus précisément au niveau des cellules compagnes du phloème de chargement et du phloème de transport (Truernit and Sauer, 1995a). AtSUC2 est nécessaire pour le chargement du saccharose depuis l'apoplaste vers la cellule compagne, au niveau des organes sources pour le transport à longue distance vers les organes puits. En effet le mutant *suc2* présente un phénotype bien particulier, à savoir une réduction drastique de la taille des feuilles de la rosette, un faible développement des organes puits et une accumulation de sucres solubles et d'amidon dans les feuilles (Gottwald *et al.*, 2000a; Srivastava *et al.*, 2008). La suppression de ce gène peut ne pas être létale pour la plante, toutefois la production de graines viables reste alors très limitée (Srivastava *et al.*, 2009). AtSUC2 est aussi impliqué dans la récupération du saccharose s'échappant lors du transport à longue distance dans le phloème de transport (Srivastava *et al.*, 2008). Enfin, AtSUC2 pourrait être impliqué dans le déchargement du saccharose dans les organes puits, depuis qu'un tel rôle a été démontré pour son homologue chez le maïs, ZmSUT1 (Carpaneto *et al.*, 2005).

AtSUC3 est exprimé fortement dans un grand nombre de tissus et cellules puits comme les cellules de garde, les trichomes, le grain de pollen et la pointe racinaire (Meyer *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2000). De plus, la protéine AtSUC3 est localisée dans les cellules criblées. C'est cette localisation qui l'implique potentiellement dans la récupération du saccharose lors du transport à longue distance (Meyer *et al.*, 2004). *AtSUC3* a été décrit comme un potentiel senseur du saccharose (Barker *et al.*, 2000) mais ceci n'a pas été démontré jusqu'à maintenant. Il est aussi fortement induit lors d'une blessure (Meyer *et al.*, 2004).

L'expression d'*AtSUC4* est limitée à la stèle de la racine, les anthères en développement et les tissus méristématiques des parties aériennes (Schneider *et al.*, 2012). *AtSUC4* a été

localisé au niveau de la membrane tonoplastique (Endler *et al.*, 2006). AtSUC4 est responsable de l'efflux de saccharose de la vacuole vers le cytosol (Schulz *et al.*, 2011). Le mutant *suc4* ne présente pas de phénotype particulier. En revanche, la surexpression d'*AtSUC4* entraine des teneurs en saccharose inférieures à celle du type sauvage (Schneider *et al.*, 2012), cependant aucune donnée n'est disponible concernant l'effet de la surexpression sur la productivité de la plante.

AtSUC5 est fortement exprimé dans l'albumen de la graine et dans une moindre mesure dans les feuilles et racines (Baud *et al.*, 2005). Ce transporteur est aussi capable de transporter la biotine (Ludwig *et al.*, 2000; Pommerrenig *et al.*, 2013), molécule nécessaire à la synthèse des triacylglycérols. D'ailleurs, le mutant *suc5* présente une diminution transitoire de la teneur en triacylglycérols lors de la formation de la graine, ainsi qu'un retard de formation de l'embryon (Baud *et al.*, 2005).

AtSUC6, AtSUC7 et *AtSUC8* partagent un haut degré d'homologie de séquence tant au niveau de la partie codante qu'au niveau des introns et des extrémités 5' et 3' (Sauer *et al.*, 2004). Cependant *AtSUC6* et *AtSUC7* codent des protéines aberrantes et semblent donc être des pseudogènes. En revanche *AtSUC8* et *AtSUC9* codent des transporteurs de saccharose fonctionnels et sont tous les deux exprimés dans les tissus floraux (Sauer *et al.*, 2004). L'activité d'AtSUC9 retarderait la transition florale, puisque le mutant *suc9* présente une floraison précoce (Sivitz *et al.*, 2007).

2.2 Les gènes de transporteurs de monosaccharides (MST)

Chez *A. thaliana*, la famille des MSTs se compose de 53 membres répartis en 7 sous-familles : 2 grandes et 5 petites (Slewinski, 2011). Les deux grandes sous-familles sont les STP (Sugar Transport Proteins) et les ERD6-like (Early Response to Dehydration). Les cinq petites sous-familles sont les pGlucT (plastidic Glucose Transporter), les PLT ou PMT (Polyol Transporters ou Polyol Monosaccharide Transporters), les VGT (Vacuolar Glucose Transporters), les TMT (Tonoplastic Monosaccharide Transporters) et les INT (Inositol or cyclic polyol transporters) (Slewinski, 2011).

2.2.1 La sous-famille des AtSTP (Sugar Transporter Protein)

Les AtSTPs sont les transporteurs d'hexoses les mieux caractérisés chez *A. thaliana.* A ce jour, tous les STPs connus sont des protéines de la membrane plasmique catalysant l'influx d'hexoses depuis l'apoplaste vers le cytosol de la cellule. Ils sont au nombre de 14 et notés de *AtSTP1* à *AtSTP14* (Büttner, 2007).

Jusqu'à maintenant, huit *AtSTPs* (1, 2, 3, 4, 6, 9, 11 et 13) ont été étudiés en détail et ont été démontrés comme catalysant le transport d'hexoses à travers la membrane plasmique (Büttner, 2010). *AtSTP1* est exprimé dans la graine en germination, la racine de la plantule (Sherson *et al.*, 2000), et plus abondamment dans les cellules de garde des cotylédons, les feuilles de la rosette, les sépales, les ovaires et la hampe florale (Stadler *et al.*, 2003). *AtSTP2, 6, 9, 10* et *11* ne sont exprimés que dans le grain de pollen et le tube pollinique (Büttner, 2007). *AtSTP4* est le seul transporteur à la fois exprimé dans le pollen et dans d'autres tissus comme la pointe racinaire et les feuilles (Truernit *et al.*, 1996). *AtSTP1, 4, 7* et *13* sont exprimés dans la racine (Büttner, 2010). De même *AtSTP1*, *5, 7, 12* et *14* sont exprimés dans le tégument de la graine (Büttner, 2010). *AtSTP3* est exprimé dans les tissus chlorophylliens, c'est d'ailleurs le seul STP qui ne soit pas exprimé dans un organe puits et qui n'ait pas une forte affinité pour le glucose (Büttner *et al.*, 2000). *AtSTP13*, exprimé dans les racines (Yamada *et al.*, 2011), est aussi exprimé dans les tissus vasculaires des pétales. Il est de plus induit durant la mise en place de la mort cellulaire (Nørholm *et al.*, 2006). Enfin, AtSTP13 est impliqué dans la résistance basale à *Botrytis cinerea* étant donné que le mutant KO *stp13* présente une plus grande sensibilité à ce pathogène (Lemonnier *et al.*, 2014).

2.2.2 La sous famille des AtERD6-like (Early Response to Dehydration)

Cette sous-famille est composée de 19 membres chez *A. thaliana.* C'est la sous-famille la moins étudiée parmi les MSTs. Parmi les représentants de cette famille, *AtSFP2* est exprimé dans les organes sources et puits au niveau des tissus conducteurs, alors que son proche homologue *AtSFP1* est exprimé dans les feuilles et plus particulièrement dans les zones ayant perdu de la chlorophylle (Quirino *et al.*, 2001), suggérant que ce gène est induit par la sénescence, ce qui n'est pas surprenant puisque ce processus est généralement accompagné d'une augmentation des teneurs foliaires en monosaccharides. *AtESL1*, un autre membre de cette sous-famille, en tant que facilitateur, aide à la diffusion du glucose à travers la membrane tonoplastique. Il est fortement exprimé dans les cellules du péricycle et du parenchyme xylémien (Yamada *et al.*, 2010). *AtESL1* et *AtERD6* sont induits par les stress abiotiques et auraient un rôle dans l'ajustement osmotique en régulant le flux de sucres au sein de la cellule (Kiyosue *et al.*, 1998; Yamada *et al.*, 2010). AtERDL6 a été caractérisé comme symporteur H^+/glucose par une étude de patch-clamp au niveau de vacuoles d'*A. thaliana* (Klemens *et al.*, 2014). Ce gène serait responsable d'une partie de l'export de glucose de la vacuole, la mutation de ce transporteur entrainant une accumulation significative de glucose dans la vacuole (Poschet *et al.*, 2011). Enfin son expression est

relativement ubiquitaire, les données microarrays et les études GUS révélant une expression dans les feuilles, les racines et les fleurs à différents stades de développement (Poschet *et al.*, 2011).

2.2.3 La sous famille des AtpGlucT

AtpGlucT est un translocateur de glucose situé au niveau de la membrane chloroplastique (Weber *et al.*, 2000). *AtpGlucT* contribue, avec un transporteur de maltose (*AtMEX1*), à l'export des produits issus de la dégradation de l'amidon du chloroplaste vers le cytosol, dans les feuilles. L'activité de ces deux transporteurs est essentielle pour la croissance et le développement de la plante (Cho *et al.*, 2011). Ce transporteur est aussi présent dans des tissus hétérotrophes, suggérant un autre rôle que l'export dans ces tissus. Il pourrait en effet être impliqué dans l'import de carbone dans certains tissus hétérotrophes (ex : statolithes dans les pointes racinaires) (Fischer and Weber, 2002) .

2.2.4 La sous famille des AtPMT (Polyo Monosaccharide Transporter) ou AtPLT

Les polyols, formes réduites d'aldose ou cétose, sont des composés osmotiquement actifs s'accumulant en réponse aux stress abiotiques (Noiraud *et al.*, 2001). Six membres, notés de *AtPMT1* à *AtPMT6,* composent cette sous famille chez A. *thaliana.* Le rôle de ces transporteurs est loin d'être clair chez *A. thaliana,* d'autant plus que le transport de polyols dans la sève phloémienne est inexistant chez *A. thaliana* (Klepek *et al.*, 2005). De même ces transporteurs ont une large spécificité de substrats en transportant des polyols comme le sorbitol, le mannitol, le xylitol, mais aussi des hexoses (Klepek *et al.*, 2005; Klepek *et al.*, 2010; Reinders *et al.*, 2005). Actuellement 3 transporteurs, *AtPMT1*, *AtPMT2* et *AtPMT5* ont été caractérisés. *AtPMT1* et *AtPMT2* sont exprimés dans les grains de pollen, le tube pollinique, les hydathodes et les jeunes cellules du xylème (Klepek *et al.*, 2010). *AtPMT5* est fortement exprimé dans les racines et dans une moindre mesure, dans les tissus vasculaires des feuilles et les organes floraux (Klepek *et al.*, 2005).

2.2.5 Les transporteurs de monosaccharides vacuolaires : les sous-familles AtVGT et AtTMT

Ces deux sous-familles sont chacune composées de 3 membres, *At3g03090* (*AtVGT1*), *At5g17010* (*AtVGT2)* et *At5g59250* pour la sous famille *AtVGT* et *AtTM1, 2* et *3* pour la sous-famille des *AtTMT* (Büttner, 2007). *AtVGT1* est fortement exprimé dans les grains de pollen et dans une moindre mesure, dans les feuilles et les hampes (Aluri and Buttner, 2007). *AtTMT1* est exprimé dans les feuilles jeunes et adultes, et dans une moindre mesure dans les racines et

les hampes. En revanche, *AtTMT2* est présent principalement dans les racines et hampes et plus faiblement, dans les feuilles jeunes et adultes ainsi que les tissus floraux (Wormit *et al.*, 2006). AtTMT1 et 2 sont des antiporteurs glucose/H^+, mais il a récemment été découvert qu'ils pouvaient aussi transporter le saccharose (Schulz *et al.*, 2011). La perte de fonction de la protéine TMT1 entraine une diminution de la capacité d'import de glucose au niveau de la vacuole d'*A. thaliana*. A l'opposé, l'augmentation de l'activité de TMT1 entraine une altération de la compartimentation subcellulaire du glucose avec une concentration plus importante dans la vacuole et plus faible dans le cytoplasme, stimulant la photosynthèse et la capacité d'exportation des feuilles et réduisant la respiration (Wingenter *et al.*, 2010).

2.2.6 La sous-famille des AtINT (INositol Transporter)

L'inositol est un composant cellulaire présent chez de nombreux organismes où il joue des rôles variés sous sa forme phosphorylée, comme dans la constitution des membranes et dans la signalisation cellulaire *via* l'IP3. *A. thaliana* compte 4 transporteurs impliqués dans son transport qui possèdent une forte homologie avec les transporteurs de myo-inositol présents chez la levure, l'homme et chez *Mesembryanthemum crystallinum* (Aizoacées) (Chauhan *et al.*, 2000). AtINT4 a été caractérisé comme symporteur myo-inositol/H^+ au niveau de la membrane plasmique et il est particulièrement exprimé dans le pollen et les cellules compagnes (Schneider *et al.*, 2006). AtINT1 semble, quant à lui, localisé au niveau du tonoplaste (Büttner, 2007).

2.3 Les transporteurs de type SWEET

L'existence des transporteurs *AtSWEET* a récemment été mise en lumière. La présence de tels transporteurs d'efflux de sucre a souvent été proposée pour expliquer l'efflux du saccharose depuis les cellules du parenchyme phloémien vers l'apoplaste (Evert *et al.*, 1978; Geiger *et al.*, 1974). De plus, l'association du FRET (Förster Resonance Energy Transfert) à un senseur de sucre dans la racine d'*A. thaliana* a révélé l'export et l'import de glucose et de saccharose selon leur gradient de concentration. Cependant ce mouvement de sucre est insensible au pH, suggérant que le flux de sucre est contrôlé par un système de transport indépendant de la force protomotrice, excluant ainsi les STP et les SUC (Chaudhuri *et al.*, 2008). Puis des gènes candidats ont été co-exprimés avec le senseur glucose de type FRET, dans des cellules humaines HEK293T dépourvues d'activité d'absorption du glucose. Parmi les gènes candidats testés, l'expression d'*AtSWEET1* a permis l'entrée de glucose dans la cellule, révélée par le changement négatif du ratio de fluorescence FRET (Chen *et al.*, 2010).

D'ailleurs, les caractéristiques du flux généré par *AtSWEET1* sont remarquablement similaires à l'activité de transport non identifié dans la racine de *A. thaliana* par Chaudhuri (2008). Cependant l'expression d'*AtSWEET1* dans les racines est faible, ce qui implique l'existence d'autres *AtSWEETs* pour cette fonction (Chen *et al.*, 2010). C'est ainsi que les transporteurs *AtSWEETs*, famille composée de 17 membres chez *A. thaliana*, ont été découverts (Baker *et al.*, 2012).

Les transporteurs du clade III de cette famille, notés de *AtSWEET9* à *AtSWEET15* sont aussi capables de transporter le saccharose (Chen *et al.*, 2012). D'ailleurs *AtWEET11* et *AtSWEET12,* localisés au niveau de la membrane plasmique des cellules du parenchyme phloémien, sont impliqués dans l'efflux du saccharose depuis le cytosol des cellules du parenchyme phloémien vers l'apoplaste au niveau de la zone de chargement du phloème des feuilles sources, la première étape nécessaire au chargement actif du phloème. Le double mutant *sweet11/sweet12* présente un phénotype remarquable, à savoir une croissance réduite et l'accumulation d'amidon et sucres solubles dans les feuilles adultes, confirmant le rôle potentiel de ces deux transporteurs dans l'efflux de saccharose dans l'apoplaste proche de la zone de chargement du phloème (Chen *et al.*, 2012). Cependant le phénotype observé est de moindre ampleur par rapport à celui observé chez le mutant *suc2* (Gottwald *et al.*, 2000a) et il pourrait être dû au fonctionnement d'autres SWEET déjà présents ou à l'induction de nouveaux *AtSWEET* comme *AtSWEET13*, étant donné que ces transporteurs présentent une certaine redondance de fonctionnement (Chen, 2013).

Les transporteurs SWEET peuvent aussi être impliqués dans les interactions plante/pathogène, notamment chez le riz où *OsSWEET11* est induit par le pathogène *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* (Xoo), *via* des effecteurs bactériens se fixant sur le promoteur du gène et induisant la transcription du gène du transporteur. La modulation de l'expression de ce transporteur par Xoo engendrerait dans le milieu extracellulaire l'efflux de sucres nécessaires à son développement, ce que confirme la résistance à Xoo du mutant *ossweet11* (Chen *et al.*, 2010). Il a récemment été proposé qu'*AtSWEET2* modulerait la sécrétion de sucres dans la rhizosphère, probablement en réduisant la disponibilité du glucose séquestré dans la vacuole, ce qui limiterait les pertes de carbone dans la rhizosphère. La disponibilité réduite en sucres dans la rhizosphère suite à l'activité de SWEET2 contribuerait à la résistance à *Pythium* (Chen *et al.*, 2015a).

Enfin les transporteurs SWEET peuvent avoir d'autres rôles dans divers processus d'efflux. *AtSWEET8/RPG1 (Ruptured Grain Pollen)* est exprimé dans le tapetum durant la

formation du grain de pollen où il est supposé responsable de l'efflux de glucose depuis le tapetum pour la croissance du grain de pollen. D'ailleurs le mutant *sweet8/rpg1* présente une fertilité mâle réduite (Guan *et al.*, 2008). Dans la même lignée, AtSWEET13/RPG2 joue aussi un rôle dans la nutrition du grain de pollen (Sun *et al.*, 2013). Le mutant KO pour *OsSWEET14/Os11N3* produit des graines plus petites et présente un retard de croissance, suggérant un rôle dans la nutrition de la graine pour ce transporteur chez le riz (Antony *et al.*, 2010). *AtSWEET5/VEX1* (*Vegetative Cell Expressed 1*), un gène codant un transporteur de glucose, est spécifiquement exprimé dans la cellule végétative du grain de pollen, indiquant un rôle dans l'apport de sucre pour le développement de la cellule générative (Engel, 2005). AtSWEET9 est requis pour la sécrétion du nectar et fonctionne dans ce cas comme un facilitateur libérant le saccharose dans l'apoplaste pour être clivé en glucose et fructose pour former le nectar (Lin *et al.*, 2014). Certains transporteurs SWEET du clade III sont particulièrement impliqués dans le remplissage de la graine, le triple mutant *sweet11-12-15* présentant une forte altération du remplissage de la graine (Chen *et al.*, 2015b). De plus *AtSWEET11* et *AtSWEET12* sont aussi importants pour l'export des sucres (saccharose, glucose et fructose) requis pour la formation de la paroi lors du développement vasculaire de la hampe florale (Le Hir *et al.*, 2015). La surexpression du transporteur vacuolaire *AtSWEET16* améliore la germination et la tolérance au froid (Klemens *et al.*, 2013). *AtSWEET17,* dont l'expression est localisée dans le parenchyme et les tissus vasculaires, fonctionne comme un transporteur de fructose vacuolaire exportant le fructose de la vacuole et contrôlant ainsi le contenu en fructose dans les feuilles (Chardon *et al.*, 2013). Le mutant *sweet17* présente un retard de croissance et une plus faible production de graines, faisant de *AtSWEET17* un transporteur impliqué dans l'allocation des sucres dans la plante (Chardon *et al.*, 2013).

2.4 Transporteurs de sucres et allocation du carbone entre source et puits

2.4.1 Depuis la source…

2.4.1.1 Le chloroplaste

Lors de la photosynthèse, le CO_2 est assimilé grâce à une série de réactions communément appelées le cycle de Calvin-Benson. L'un des six trioses phosphate produits est soit directement utilisé dans le chloroplaste pour la production d'amidon, soit exporté vers le cytosol pour la respiration ou la synthèse de saccharose. Cet export est effectué par le

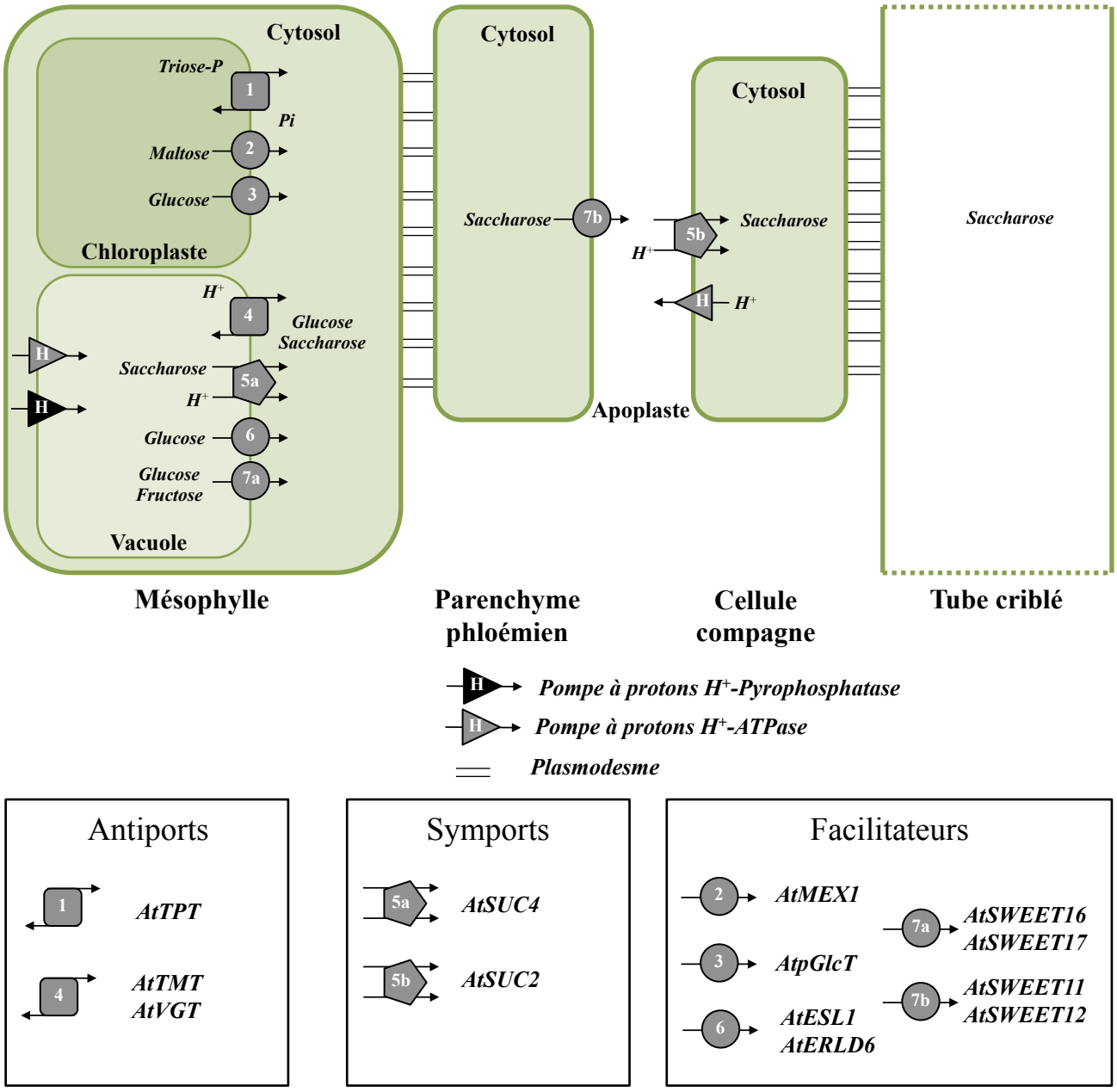


Figure 6 *Vue d'ensemble des différents transporteurs impliqués dans le flux de carbone dans la feuille source.*

translocateur triose-phosphate/phosphate (TPT), qui exporte les trioses phosphate en échange d'un phosphate inorganique (**Figure I.5**) (Fliege *et al.*, 1978; Flügge *et al.*, 1989).

Durant la nuit, le carbone exporté vers les organes puits est issu de la dégradation de l'amidon chloroplastique. La majorité du carbone provenant de la dégradation de l'amidon est exporté soit sous la forme de maltose *via* le transporteur de maltose MEX1, soit sous la forme de glucose *via* le transporteur de glucose plastique pGlcT (**Figure 6**) (Weise *et al.*, 2004).

2.4.1.2 La vacuole

Dans les feuilles sources, plus précisément dans les cellules du mésophylle, les sucres peuvent temporairement être stockés dans la vacuole quand l'export de saccharose vers le phloème est saturé (Martinoia *et al.*, 2000). Un tel stockage temporaire implique l'existence de transporteur d'influx et d'efflux au niveau de la membrane tonoplastique.

Les transporteurs TMT et VGT sont responsables de l'influx de sucres (glucose pour VGT ; glucose et saccharose pour TMT) dans la vacuole (**Figure 6**) (Aluri and Buttner, 2007; Schulz *et al.*, 2011). Cet influx de sucres contre leur gradient de concentration nécessite de l'énergie apportée soit par une pompe à proton ATPase, soit par une pompe à proton pyrophosphatase qui importent des ions H^+ dans la vacuole qui sont par la suite échangés contre des sucres. L'efflux de sucres est soit catalysé par des co-transporteurs, soit par des facilitateurs. SUC4, un co-transporteur saccharose/H^+, est responsable de l'efflux de saccharose depuis la vacuole vers le cytoplasme (**Figure 6**). Ce transport est accompagné d'un efflux de protons (Schneider *et al.*, 2012). ERDL6, ESL1, SWEET16 et SWEET17, quatre facilitateurs, sont responsables de l'export d'hexoses (**Figure 6**) (Chardon *et al.*, 2013; Klemens *et al.*, 2013; Klemens *et al.*, 2014; Yamada *et al.*, 2010) .

2.4.1.3 La zone de déchargement du phloème

Le saccharose migre des cellules du mésophylle vers le parenchyme selon un gradient de concentration. Dans le cas d'un chargement apolastique, ce qui est le cas chez *A. thaliana*, le saccharose est exporté depuis le cytosol des cellules du parenchyme phloémien vers l'apoplaste *via* les facilitateurs SWEET11 et SWEET12 (**Figure 6**) (Chen *et al.*, 2012). Le saccharose est ensuite chargé dans les cellules conductrices contre son gradient de concentration *via* le transporteur membranaire SUC2, localisé au niveau de la cellule compagne (**Figure 6**) (Gottwald *et al.*, 2000a; Srivastava *et al.*, 2008).

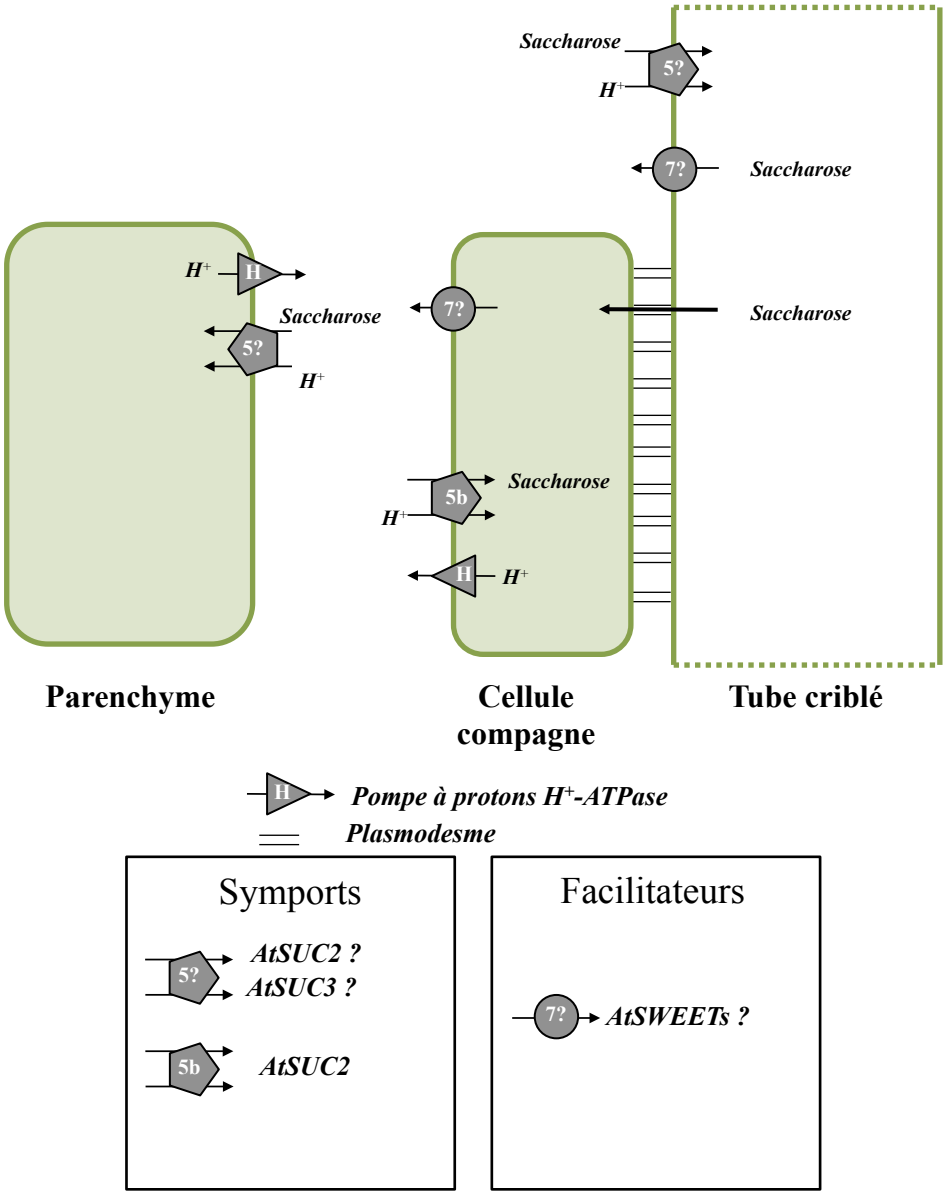


Figure 7 *Vue d'ensemble des différents transporteurs impliqués dans le flux de saccharose dans le phloème de transport*.

2.4.2 …en passant par le phloème…

Lors du transport du saccharose dans le phloème, une partie du saccharose s'échappe du phloème pour nourrir les tissus environnants. Cette fuite n'a pas été étudiée en détail, cependant le rôle de facilitateurs comme les SWEET est envisageable (**Figure 7**). En effet, il est admis que les cellules du phloème de transport sont isolées symplastiquement des cellules environnantes (Kempers *et al.*, 1998). En revanche le processus de récupération du saccharose a été étudié plus en détail. SUC2 est impliqué dans la récupération du saccharose échappé dans l'apoplaste (**Figure 7**) (Srivastava *et al.*, 2008). SUC3, localisé dans les cellules du tube criblé, serait impliqué dans la collecte du saccharose en coopération avec SUC2 (**Figure 7**) (Meyer *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2000).

2.4.3 …vers les puits

Le déchargement du phloème se déroule souvent de manière symplastique (il existe tout de même des exceptions) même si une étape apoplastique est parfois nécessaire par la suite. Ceci dépend du tissu ou du stade physiologique.

2.4.3.1 La graine

Arrivé dans l'embryon, le saccharose subit une série de réactions métaboliques pour être stocké sous forme de triacylglycérol chez *A. thaliana*. Parmi ces réactions, sont incluses les étapes de transport à travers les diverses membranes à franchir (**Figure 8**).

Lorsque le saccharose a atteint l'extrémité du phloème au niveau du funicule, le saccharose est déchargé par la voie symplastique dans le tégument externe de l'embryon (Stadler *et al.*, 2005a). Puis AtSWEET15, exprimé dans le tégument externe, exporte alors le saccharose dans l'apoplaste (**Figure 8**) (Chen *et al.*, 2015b). SUC3, un co-transporteur saccharose/H^+, pourrait potentiellement transporter le saccharose dans le tégument interne, car il a été localisé dans cette couche de cellules (**Figure 8**) (Meyer *et al.*, 2004; Stadler *et al.*, 2005a). SWEET11, lui aussi, pourrait être impliqué dans la récupération de ce saccharose car il est exprimé dans le tégument interne (**Figure 8**) (Chen *et al.*, 2015b). Les trois couches de cellule du tégument interne forment un continuum symplastique isolé de l'albumen (Stadler *et al.*, 2005a). L'efflux du saccharose depuis le tégument interne vers l'albumen pourrait être catalysé par des facilitateurs SWEET (Ludewig and Flügge, 2013), probablement SWEET11 et SWEET12 (Chen *et al.*, 2015b) puis le saccharose pourrait être absorbé dans les cellules de l'albumen par SUC5 qui y est exprimé durant le développement de la graine (**Figure 8**) (Baud *et al.*, 2005; Pommerrenig *et al.*, 2013; Stadler *et al.*, 2005a). Enfin, avant d'entrer dans

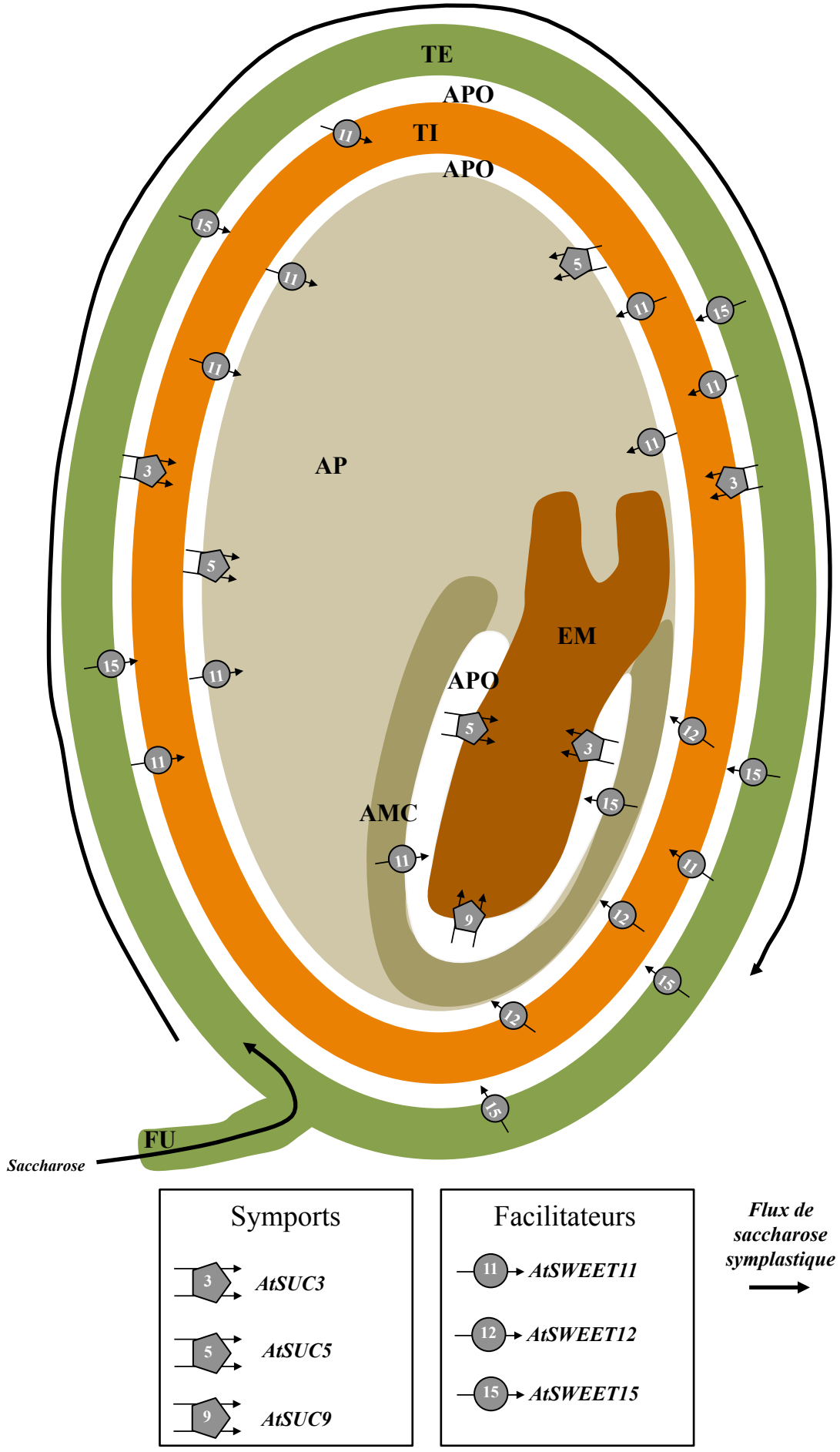


Figure 8 *Vue d'ensemble des différents transporteurs impliqués dans le déchargement du saccharose dans la graine d'A. thaliana.*
(FU) Funicule, (TE), Tégument externe, (APO), Apoplaste, (TI), Tégument interne, (AP), Albumen périphérique, (EMC), Albumen micropilaire et (EM), Embryon.
Adapté de Ludewig and Flugge, 2013 et Chen et al., 2015.

l'embryon, le saccharose doit être libéré dans l'apoplaste séparant l'albumen de l'embryon, et ce serait encore les facilitateurs SWEET11 et SWEET15 qui seraient responsables de cet efflux (**Figure 8**) (Chen *et al.*, 2015b). L'absorption du saccharose par l'embryon pourrait être due à trois transporteurs, SUC3, SUC5 et SUC9 qui sont exprimés dans différents tissus de l'embryon à différents stades de développement (**Figure 8**) (Baud *et al.*, 2005; Meyer *et al.*, 2004; Pommerrenig *et al.*, 2013; Sivitz *et al.*, 2007; Stadler *et al.*, 2005a).

2.4.3.2 La racine

Le déchargement *via* la voie symplastique est dominant dans la pointe racinaire chez *A. thaliana* (Oparka *et al.*, 1994; Stadler *et al.*, 2005b). Cependant le transport apoplastique mérite d'être étudié plus en détail, puisque certains transporteurs membranaires de saccharose (SUC1, SUC2) et de glucose (STPs) ainsi que quelques facilitateurs (SWEETs) sont exprimés dans les racines.

3 Le déficit hydrique

Une grande partie des travaux présentés dans cette thèse est consacrée à la réduction de la disponibilité en eau puisque cette contrainte est connue pour modifier les relations source-puits pour le carbone (Lemoine *et al.*, 2013), plus particulièrement entre la rosette et la racine (Muller *et al.*, 2011).

3.1 Définitions et impact

L'eau est indispensable à la croissance et au bon fonctionnement de la plante. Elle est impliquée dans un grand nombre de processus métaboliques et physiologiques. Le mouvement de l'eau à l'intérieur des cellules contribue au maintien de la pression de turgescence. Le transport de l'eau à travers la plante, depuis le sol vers l'atmosphère, participe au transfert des nutriments du sol vers la plante *via* le xylème, à la mise en place d'un gradient de pression hydrostatique dans le phloème, ainsi qu'au maintien de la température *via* le mécanisme d'évapotranspiration.

Selon l'espèce cultivée, la quantité d'eau nécessaire à son développement est très variable, en effet pour produire 1 kg de coton, 5263 litres devront être apportés alors que la production de 1 kg de blé ne nécessitera que 590 litres (CNRS – Dossier scientifique : l'eau, CNRS 2000). L'agriculture réclame donc de grandes quantités d'eau apportées par les pluies et surtout par l'irrigation. D'ailleurs, les grandes cultures sont responsables pour 91,5% de l'empreinte hydrique humaine, soit 8317 Gm^3 d'eau par an (Hoekstra and Mekonnen, 2012).

Dans certaines régions du monde où la disponibilité en eau est soit faible, soit transitoire, le déficit hydrique est considéré comme un facteur limitant le rendement des cultures (Boyer, 1982). De plus, les zones de déficit hydrique tendent à se faire plus nombreuses avec les changements climatiques à venir, ainsi que l'augmentation croissante de la demande en eau.

Dans un tel contexte, la compréhension des mécanismes d'utilisation de l'eau et des stratégies mises en place par la plante lors d'un déficit hydrique se révèle d'une importance capitale dans l'élaboration de variétés tolérantes au stress hydrique (Harb *et al.*, 2010).

3.1.1 Sécheresse

La sécheresse peut être définie de façons multiples en fonction du nombre de facteurs pris en compte (Wilhite, 2005). D'un point de vu météorologique, la sécheresse correspond à un déficit de précipitation (eau, neige) sur une période de temps plus ou moins longue par rapport à la pluviométrie annuelle (Wilhite, 2005). D'un point de vue physiologique ou agronomique, la sécheresse est définie comme la contrainte hydrique suffisante pour altérer la croissance de la plante et son rendement comparée au régime hydrique optimum pour la croissance et le rendement maximal de la plante (Wilhite, 2005). Le concept de sécheresse est compliqué puisque les plantes absorbent l'eau du sol à différents niveaux. Ainsi, même si la pluviométrie est proche de 0 sur un laps de temps donné, provoquant une réduction de la disponibilité en eau en surface, la plante peut se développer normalement parce qu'elle a la possibilité de puiser les quantités d'eau nécessaires à sa croissance en profondeur. Ainsi, il y a une sécheresse substantielle en accord avec la première définition mais la plante présente un apport hydrique adéquat.

3.1.2 Le potentiel hydrique (ψ_{Eau})

La disponibilité en eau du sol est définie par le potentiel hydrique qui a la dimension d'une pression. Le potentiel hydrique est l'énergie qu'il faut fournir à un compartiment pour libérer un volume d'eau. Ainsi le potentiel hydrique d'une solution est toujours négatif (sauf pour l'eau pure où il est égal à zéro) et les mouvements d'eau se font toujours du compartiment de potentiel le moins négatif vers le compartiment de potentiel le plus négatif. Pour résumer le flux d'eau s'effectue d'une zone de forte disponibilité vers une zone de faible disponibilité. A partir de cette définition, il est alors aisé de comprendre que le déficit peut non seulement être induit par le manque d'eau dans le sol, mais aussi par d'autres facteurs comme la présence de sel ou le gel qui vont alors retenir l'eau (Verslues *et al.*, 2006). Le potentiel hydrique est aussi utilisé pour mesurer la disponibilité en eau des cellules de la

plante. Il est accepté que le potentiel hydrique d'une cellule végétale a deux composantes principales : le potentiel osmotique ψ_{Osm} et la pression de turgescence P ($\psi_{Eau} = \psi_{Osm} + P$).

Lors du déficit hydrique, le gradient de potentiel hydrique entre le sol et la plante va diminuer, limitant alors l'absorption d'eau. Cette diminution du potentiel hydrique du sol est perçue par la plante et va provoquer des modifications physiologiques et morphologiques à différentes échelles de temps et d'espace (Chaves *et al.*, 2002). La mise en place de tels mécanismes peut contribuer à un niveau de tolérance plus ou moins élevé lors du déficit hydrique (Bray, 1997).

3.1.3 Le stress

C'est la réponse habituellement négative, par rapport à la plante bien arrosée, suite à la diminution de la teneur en eau et du potentiel hydrique dans l'environnement et à l'intérieur de la plante. Le stress est un phénomène physiologique et biochimique provoquant l'altération des structures et des fonctions à tous les niveaux d'organisation, depuis les molécules de grande taille comme les protéines et les lipides, et leurs agrégations en membranes, jusqu'au organites, aux cellules, aux tissus et aux organes constituant la plante entière. Il y a d'ailleurs d'importantes interactions entre ces différentes échelles et processus (Lawlor, 2013).

3.2 Les différentes stratégies face au déficit hydrique

Les mécanismes de « résistance » des plantes à la sécheresse se divisent en 4 grands types : l'échappement, l'évitement, la tolérance et la survie (Lawlor, 2013). Cependant, chacune de ces stratégies n'est pas exclusive à un type de plante.

3.2.1 L'échappement à la sécheresse

Les plantes échappant à la sécheresse présentent un haut degré de plasticité au niveau de leur développement, ce qui les rend capable de compléter leur cycle de vie avant que l'eau ne vienne à manquer (Chaves *et al.*, 2003). De telles plantes ne sont par conséquent pas affectées par la sécheresse qui aura lieu dans leur environnement à un autre moment ; c'est pourquoi on dit qu'elles y échappent. Cette stratégie est extrêmement importante d'un point de vue agronomique. Chez les cultures annuelles, comme les céréales, le cycle de développement coïncide généralement avec les conditions climatiques : la croissance végétative a lieu durant la phase où les précipitations sont importantes et la maturation de la graine s'opère lors de la période sèche (Lawlor, 2013). C'est aussi la stratégie utilisée par des plantes désertiques comme les éphémérophytes qui, même dotées d'une courte durée de vie, présentent une forte

vitesse de croissance, une importante capacité à fixer le carbone et ce, en utilisant au maximum les ressources du milieu (Maroco *et al.*, 2000).

3.2.2 L'évitement de la sécheresse

L'évitement est manifesté par les plantes qui se développent durant des périodes de sécheresse tout en maintenant leur statut hydrique.

Une telle stratégie implique la limitation des pertes en eau et la conservation de l'eau du sol. Cela nécessite une diminution de la transpiration à travers la réduction de la surface foliaire et de la conductance stomatique. La réduction de la surface foliaire peut se dérouler lors de la mise en place de la contrainte hydrique *via* la production d'un nombre réduit de feuilles plus petites, ou plus tardivement, quand la sécheresse est plus sévère *via* l'induction de la sénescence dans les feuilles les plus âgées. Si la réduction de la conductance stomatique réduit les pertes en eau, elle n'est pas sans conséquence puisque l'évapotranspiration permet le maintien de la température foliaire. La fermeture des stomates est donc généralement accompagnée de la mise en place de processus visant à réduire l'absorption de la lumière comme l'enroulement des feuilles, la réduction de la surface foliaire, une densité plus importante de trichomes pour augmenter la réflexion ou encore un changement d'angle de la feuille qui devient alors verticale évitant ainsi les radiations solaires (Chaves *et al.*, 2003). Généralement, ces modifications réduisent l'assimilation et le rendement de la photosynthèse par plante, induisant une baisse de la productivité par unité de surface cultivée.

L'évitement implique aussi une optimisation des apports en eau avec un enracinement plus profond pour exploiter au maximum l'eau du sol. L'absorption d'eau est en effet maximisée en privilégiant l'allocation des ressources carbonées vers les racines dont le développement est alors favorisé, améliorant ainsi l'accès à l'eau (Jackson *et al.*, 2000).

Enfin, le stockage d'eau dans des organes (tronc, tige) est aussi envisageable, mais très peu dans le cas des plantes annuelles cultivées en agriculture.

Dans le cas de la réduction des pertes en eau et de l'optimisation des apports en eau, c'est la taille et la fonction des organes qui vont déterminer la balance en eau. Il doit en effet être souligné que la première interaction de la plante avec son environnement l'est *via* la taille des organes, comme cela a été montré pour des cultures soumises à la contrainte hydrique au champ (Legg *et al.*, 1979). Bien sûr, les caractéristiques de surface (conductance stomatique, conductance cuticulaire, couche limite) sont aussi très importantes. Les mécanismes métaboliques, codés par le génome, déterminent quand et comment sont produits les organes

ainsi que leurs tailles potentielles et caractéristiques. Cependant c'est l'effet de l'environnement sur les mécanismes métaboliques qui détermine la taille et les caractéristiques des organes de la plante. Par conséquent, la taille et les caractéristiques des organes des plantes sont particulièrement reliées à l'apport en eau (Lawlor, 2013).

Enfin, vu la définition et les mécanismes mis en place par les plantes présentant une stratégie d'évitement, le terme « évitement » n'est pas particulièrement approprié étant donné que les plantes « n'évitent » pas la sécheresse mais plutôt exploitent des ressources hydriques alternatives (stockées dans le sol), ce qui par conséquent, retarde et minimise le développement de la contrainte hydrique au niveau des cellules et des organes, et donc les effets du stress (Lawlor, 2013).

3.2.3 La tolérance à la sécheresse

Le terme de tolérance est souvent utilisé pour caractériser une résistance à la sécheresse suite à une reprogrammation métabolique. Les mécanismes conférant la tolérance en préservant la teneur en eau et la pression de turgescence, même quand l'apport en eau est limité, incluent la diminution du potentiel osmotique *via* l'accumulation de proline (Hare *et al.*, 1998; Morgan, 1984) ou l'augmentation de la conductance de l'eau des cellules *via* la présence supplémentaire d'aquaporines (Maurel *et al.*, 2008). D'autres mécanismes métaboliques sont pris en compte dans la tolérance comme les mécanismes de détoxication des ROS qui s'accumulent quand l'énergie capturée par les photosystèmes excède la demande pour l'assimilation du CO_2. Ces mécanismes consistent principalement à augmenter la dissipation de l'énergie, ainsi qu'à favoriser la dégradation des ROS et limiter leur production (Chaves *et al.*, 2003).

3.2.4 La survie à la sécheresse

La survie est une forme de résistance à la sécheresse où les cellules, les tissus et les organes qui ont cessé de croitre durant la sécheresse sont capables de maintenir les fonctions cellulaires clés durant ladite période et de retrouver après la contrainte hydrique leurs caractéristiques antérieures ainsi qu'une reprise des fonctions métaboliques. C'est le cas de *Craterostigma plantagineum* (Scrophulariacées) qui est capable de reviviscence après une période de sécheresse durant laquelle elle perd son eau et devient alors entièrement sèche, mais conserve son potentiel de reprise de croissance durant des années dans cet état. Après arrosage, cette plante retrouve son intégrité en 48 heures. Une remobilisation rapide des

sucres et la présence de protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant) seraient responsables de cette surprenante reprise de croissance (Scott, 2000).

3.3 Les réponses mises en place lors du déficit hydrique

3.3.1 A l'échelle de la plante

3.3.1.1 La feuille

Une des premières réponses générées suite à l'application d'un déficit hydrique est la fermeture des stomates. Ce processus présente l'avantage de limiter les pertes en eau, mais aussi l'inconvénient de restreindre l'entrée de CO_2. Cette réduction de la conductance stomatique résulte de la modification de la turgescence des cellules de garde qui ont alors tendance à perdre de l'eau. Ce processus est déclenché par un signal ABA généré par la déshydratation des racines (Davies and Zhang, 1991).

Lors d'une contrainte hydrique, la surface foliaire est réduite. C'est notamment le cas chez le riz, où la plasticité de la surface foliaire est cruciale pour maintenir le contrôle de l'utilisation de l'eau (Shao *et al.*, 2008). Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cette réduction de la croissance foliaire : (1) la pression de turgescence est une composante directement impactée par le déficit hydrique, (2) le rythme de la division cellulaire décroit (Tardieu *et al.*, 2000) et (3) les parois cellulaires se durcissent (Chazen and Neumann, 1994). La contrainte hydrique peut aussi engendrer une réduction du nombre de feuilles, cependant ce phénomène possède une certaine plasticité chez *A. thaliana* en fonction de l'écotype (Aguirrezabal *et al.*, 2006). En effet, l'écotype Col-0 montre une réduction du nombre de feuilles lors du déficit hydrique (Aguirrezabal *et al.*, 2006; Hummel *et al.*, 2010), ce qui n'est pas observé chez An-1 ou encore Gre-0 (Aguirrezabal *et al.*, 2006). Cependant, malgré la diversité des réponses concernant la formation des feuilles chez *A. thaliana*, la surface foliaire et donc la vitesse de croissance sont toujours affectées négativement. Il est également important de noter que la diminution de la croissance foliaire et de la conductance stomatique va affecter la capacité de la plante à intercepter les rayons lumineux et à capturer le CO_2 et donc, inévitablement, sa capacité à produire de la biomasse (Tardieu *et al.*, 2011). D'ailleurs, une mesure qui reflète bien le compromis entre l'expansion foliaire et l'allocation de la biomasse est la surface foliaire spécifique (SLA : specific leaf area) c'est-à-dire la surface de la feuille par unité de masse sèche. La SLA décroit lors d'un déficit hydrique (Liu and Stützel, 2004; Marcelis *et al.*, 1998). Il est en effet largement admis dans la littérature que l'expansion foliaire est altérée bien avant la photosynthèse (Hummel *et al.*, 2010; Tardieu *et al.*, 1999).

3.3.1.2 La racine

Les racines, responsables de l'approvisionnement en eau, sont directement ancrées dans le sol et sont les premières au contact du déficit hydrique. Plusieurs composantes conditionnent la capacité du système racinaire à absorber l'eau environnante : sa croissance latérale et en profondeur, sa surface totale et la nature du sol.

En général, lors du déficit hydrique, la croissance racinaire est moins impactée que celle des parties aériennes (Chaves *et al.*, 2002), ce qui implique une augmentation du ratio « Root/Shoot » (R/S) (Verslues *et al.*, 2006). Des travaux réalisés sur différentes plantes d'intérêt agronomique ont effectivement montré que la vitesse d'élongation de la racine primaire était sévèrement diminuée pour des potentiels hydriques bas (-1,5 MPa). En revanche, la croissance foliaire est complètement inhibée pour des potentiels hydriques plus forts (-0,5 MPa) (Sharp *et al.*, 2004). Privilégier la croissance racinaire au détriment de la croissance foliaire constitue un des principaux mécanismes pour maximiser l'absorption et limiter les pertes en eau. En ce qui concerne les racines latérales, leur croissance est restreinte lors du stress hydrique, que ce soit chez le maïs (Roycewicz and Malamy, 2012) ou encore chez *A. thaliana* (van der Weele *et al.*, 2000). C'est cependant l'amplitude du stress qui conditionne cette réponse puisque l'inhibition de l'élongation des racines latérales n'est observée chez *A. thaliana* que lors d'une contrainte sévère (van der Weele *et al.*, 2000). Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'initiation des primordia racinaires n'est pas inhibée avec la baisse de la disponibilité en eau chez *A. thaliana* (Deak and Malamy, 2005), ce qui permettrait une reprise de croissance latérale avec le retour d'une disponibilité accrue en eau. Le maintien de l'élongation de la racine primaire et la réduction de la formation des racines latérales sont des réponses dépendantes de l'ABA. Il a d'ailleurs été démontré que des mutants déficients dans la synthèse de l'ABA présentaient une augmentation de la formation de racines latérales en réponse à une contrainte osmotique (Xiong *et al.*, 2006a). De même, l'application d'ABA exogène génère la même réponse racinaire que lors d'une contrainte osmotique, à savoir la réduction de la formation des racines latérales (Xiong *et al.*, 2006a). Ces résultats suggèrent que l'ABA produit par les racines se comporte comme un signal réprimant la formation des racines latérales en réponse à la baisse de la disponibilité en eau (Roycewicz and Malamy, 2012), permettant ainsi de privilégier la croissance en profondeur. Enfin, le maintien de la croissance racinaire est aussi assuré par un apport continu en carbone provenant des feuilles, puisque, même si la croissance foliaire est diminuée précocement, la photosynthèse ne l'est que plus tardivement. La demande en carbone nécessaire à la

croissance de la feuille se retrouve donc réduite, alors que la production n'a pas été modifiée, ce qui augmente alors la quantité de carbone disponible à l'exportation vers les organes puits comme les racines (Hummel *et al.*, 2010). Toutefois, bien qu'il ait été montré que la contrainte hydrique augmentait la disponibilité du carbone pour l'export vers la racine, il reste encore à confirmer la hausse de l'export du carbone vers la racine en réponse à la contrainte hydrique.

Enfin, il faut tout de même noter qu'en cas de stress prolongé et/ou de forte intensité, l'assimilation nette, tout comme l'efficacité d'utilisation de l'eau, chute drastiquement, limitant alors la production de saccharose et donc potentiellement son export vers les puits. Ceci peut donc modifier le développement racinaire puisque le saccharose stimule la croissance du système racinaire dans son intégralité (racines primaires et latérales, diamètre) (Freixes *et al.*, 2002; Lee-Ho *et al.*, 2007). Ainsi le développement racinaire lors du déficit hydrique semble d'une grande complexité car il dépend de l'intensité et de la durée du stress.

3.3.2 A l 'échelle du métabolisme et de la cellule

3.3.2.1 La photosynthèse

La diminution de la conductance stomatique est l'un des mécanismes de réponse les plus précoces lors de la mise en place du déficit hydrique (Chaves *et al.*, 2003). Ce phénomène, visant à limiter les pertes en eau, restreint dans le même temps l'entrée de CO_2 et donc potentiellement la photosynthèse et la production de photo-assimilats (Cornic, 2000). Lors d'une contrainte mise en place par arrêt d'arrosage, la chute de la conductance peut se diviser en deux phases, une première phase où elle diminue sans pour autant que le contenu en eau de la feuille ne soit affecté et une seconde phase correspondant à une contrainte sévère où la conductance chute drastiquement parallèlement au contenu en eau de la feuille (Poulson *et al.*, 2006). La première phase de réduction de la conductance serait liée au signal ABA provenant des racines alors que la seconde phase serait plutôt liée à la modification du statut hydrique de la feuille et à la signalisation qui en résulte. De plus, Poulson et collaborateurs (2006) ont observé, lors de cette expérience, que la photosynthèse nette ne diminuait que lorsque le contenu en eau des feuilles chutait. Ainsi dans les phases précoces du stress, la faible diminution de la conductance stomatique a un effet moins important sur l'assimilation nette que sur les pertes en eau, *via* la transpiration, ce qui tend alors à améliorer l'efficacité d'utilisation de l'eau, phénomène couramment observé dans la tolérance au stress hydrique (Rouhi *et al.*, 2007). Cependant, en fonction de l'intensité, de la durée du stress et de l'âge de

la plante, la photosynthèse nette peut être maintenue alors même que la croissance foliaire est déjà ralentie (Hummel *et al.*, 2010). Ceci va générer une surproduction de composés carbonés qui sera soit stockée dans la vacuole sous forme de sucres solubles ou dans les chloroplastes sous forme d'amidon, soit exportée vers les organes puits comme les racines pour accroitre leur développement (Muller *et al.*, 2011). L'accumulation de sucres comme le saccharose pourrait aussi participer à l'ajustement osmotique. De plus, l'accumulation de saccharose favoriserait la stabilisation des polymères de la paroi lors de la perte en eau cellulaire (Moore *et al.*, 2008).

3.3.2.2 L'ajustement osmotique

L'ajustement osmotique est l'un des principaux mécanismes aboutissant à la tolérance lors d'un déficit hydrique. Les plantes confrontées à ce type de stress vont en effet accumuler des molécules de faible poids moléculaire, généralement dénommée osmoticum, osmolytes ou encore solutés compatibles. Ces osmolytes peuvent atteindre de fortes concentrations sans pour autant être toxiques pour la cellule ou bien affecter le métabolisme primaire (Hare and Cress, 1997). La nature de ces solutés compatibles est variable. Les osmoticum dont le rôle a clairement été démontré dans l'ajustement osmotique lors du déficit hydrique sont des ions (K^+), des acides aminés (glycine, proline), des sucres (saccharose, hexoses, polyols) et des bétaïnes (glycine-betaïne) (Hummel *et al.*, 2010; Moore *et al.*, 2008; Munns, 2002). L'accumulation de ces osmolytes au sein des cellules et des tissus va permettre de faire diminuer le potentiel hydrique, afin de maintenir l'influx d'eau, ou au moins limiter l'efflux, pour maintenir la pression de turgescence nécessaire à l'expansion cellulaire (Hare *et al.*, 1998). De même, ces molécules sont impliquées dans la protection des structures cellulaires (membranes, parois, protéines) ainsi que dans la régulation du statut « red-ox » de la cellule (Hare *et al.*, 1998).

L'accumulation de sucres solubles au niveau foliaire est un processus généralement observé lors du déficit hydrique chez *A. thaliana* (Hummel *et al.*, 2010; Mewis *et al.*, 2012; Sperdouli and Moustakas, 2012; Taji *et al.*, 2002). Les sucres solubles accumulés lors de ces expérimentations sont plus particulièrement des hexoses et du saccharose. Le saccharose est d'ailleurs le composé hyper-accumulé lors de la sécheresse chez *Craterostigma plantagineum* et permettrait de stabiliser les enzymes et les structures cellulaires en absence d'eau (Scott, 2000). Aussi, l'accumulation de sucres solubles chez le peuplier cultivé *in vitro* favoriserait la tolérance au stress osmotique (Watanabe *et al.*, 2000). Enfin, il a été démontré que les teneurs en sucres solubles étaient supérieures dans des variétés de riz résistant au stress salin que dans

des variétés sensibles, et que les sucres solubles favorisaient la résistance à la contrainte osmotique induite par la contrainte saline (Cha-um *et al.*, 2009).

3.3.2.3 A l'échelle du transcriptome

Le déficit hydrique a de multiples conséquences sur la physiologie de la plante et va donc, dans le même temps affecter, de manière significative le transcriptome de cette dernière. Ainsi, comme les réponses de la plante sont en partie contrôlées par l'effet de la contrainte hydrique sur son génome (P = GxE), de nombreux efforts ont été réalisés pour caractériser la réponse moléculaire de la plante lors de la baisse de la disponibilité en eau. L'arrivée des techniques de micro-array a permis de générer de grandes quantités d'informations concernant l'expression du génome en réponse au déficit hydrique (Bray, 2004). Ainsi, les gènes découverts comme régulés par le stress ne sont pas exclusivement impliqués dans la tolérance à la contrainte hydrique mais aussi dans la réponse à celle-ci (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006). Les informations concernant la régulation de l'expression du génome lors du déficit hydrique ont, non seulement, par la suite, engendré la création d'organismes génétiquement modifiés chez certaines espèces plus ou moins tolérantes à la sécheresse, mais aussi aidé à la compréhension du rôle de ces différents gènes dans la réponse globale au manque d'eau. En effet, le nombre de publications concernant des organismes génétiquement modifiés en lien avec la contrainte hydrique a augmenté de manière exponentielle depuis le début des années 1990 (Lawlor, 2013). Les gènes dont l'expression est artificiellement modulée dans ces organismes, interviennent dans différentes fonctions de la plante. Lawlor (2013) a répertorié 9 grands types de processus impactés dans les lignées transformées dans les études sur la contrainte hydrique :

(i) La synthèse de composés visant à diminuer le potentiel osmotique et donc augmenter la pression de turgescence, pour *in fine* réduire le potentiel hydrique de la plante (ex : synthèse de proline, sucres solubles, mannitol, glycine-bétaïne).

(ii) La modification du métabolisme des acides aminés qui affecte alors la synthèse de protéines (ex : glutamate).

(iii) La synthèse de molécules signal qui altèrent l'équilibre du métabolisme cellulaire (ex : tréhalose-6-P, phosphatidyl-inositol, ononitol).

(iv) La synthèse de protéines chaperonnes pour stabiliser la structure des protéines, des membranes (ex : protéines LEA).

(v) La production de protéines impliquées dans la croissance cellulaire et le métabolisme (ex : expansines)

(vi) La surexpression de protéines de transport de diverses fonctions (ex : aquaporines, antiporteur vacuolaire Na^+/K^+).

(vii) La production de facteurs de transcription visant à réguler l'expression d'autres gènes.

(viii) Des changements dans la synthèse et la signalisation des phytohormones ainsi que dans le métabolisme lié (ex : ABA, farnesyl-transferase, isopentenyl transferase)

(ix) Des modulations de la régulation de l'état énergétique et de sa signalisation dans les cellules (ex : ascorbate peroxydase).

4 Objectifs de l'étude

Le laboratoire SEVE (Sucres Echanges Végétaux & Environnement) s'intéresse au rôle des transporteurs de sucres dans la physiologie de la plante et plus particulièrement dans la réponse et l'adaptation aux stress biotiques et abiotiques s'inscrivant dans la thématique de l'UMR EBI (Ecologie et Biologie des Interactions). Au sein de la composante « Racine », nous nous focalisons sur l'implication des transporteurs de saccharose dans les relations sources-puits pour le carbone entre la rosette et la racine d'*A. thaliana*.

L'objectif majeur de mon travail de thèse est d'identifier les principaux transporteurs de saccharose potentiellement impliqués dans les relations sources-puits pour le carbone. Si les principaux acteurs ont été identifiés au niveau foliaire (*AtSUC2*, *AtSWEET11* et *AtSWEET12*) ce n'est pas le cas dans le compartiment racinaire, de par sa nature, difficile à étudier. Afin de répondre à la question posée, la stratégie choisie consiste dans un premier temps à identifier les gènes de transporteurs de saccharose (*AtSUC* et *AtSWEET* du clade III) exprimés dans la racine, puis, dans un second temps, à mesurer l'expression de ces transporteurs dans un contexte où les relations source-puits pour le carbone varient. Dans un troisième temps, il s'agira de localiser l'expression dans la racine des transporteurs dont l'expression change quand les relations source-puits sont modifiées et enfin, de tenter de déterminer le rôle précis de ces transporteurs par une approche de génétique inverse.

Les travaux de thèse de Dany Mainson (2013) ont permis le développement d'un système de culture en hydroponie, système permettant l'obtention de quantités importantes de matériel racinaire, pour l'étude de l'expression des transporteurs de sucres dans la racine par la technique de macro-array. Le développement d'un tel système de culture a permis de cartographier l'expression des transporteurs de sucres dans la racine, la rosette, la hampe et les siliques lors du développement complet d'*A. thaliana.* Après avoir étudié les relations

source-puits pour le carbone au cours du développement complet, Dany Mainson (2013) a étudié les relations source-puits pour le carbone dans un système plus simple ne comportant qu'une rosette et un système racinaire. La réduction de la disponibilité en eau est connue pour affecter les relations sources-puits pour le carbone. C'est pourquoi il a étudié l'effet de la contrainte hydrique *via* un stress osmotique sur l'expression des transporteurs de sucres de la racine.

De ce fait, les premiers travaux de ma thèse sont dans la continuité de ceux de Dany Mainson (2013), le but étant (1) de confirmer ses résultats et (2) de réaliser la cartographie de l'expression des transporteurs de saccharose chez *A. thaliana*, au cours du développement complet (dans la racine, la rosette, la hampe et la silique) et en réponse au stress osmotique (dans la racine et la rosette) par RT-qPCR en ajoutant l'étude des gènes *AtSWEET* du clade III.

Le deuxième axe de mes travaux marque un profond changement quant à l'étude des relations sources-puits pour le carbone. Nous avons en effet revu le mode de culture des plantes, mais aussi le mode d'application de la réduction de la disponibilité en eau. Afin de se rapprocher le plus possible des conditions de culture de la plante en pot, nous avons conçu la rhizobox, un système de culture permettant la croissance en deux dimensions d'une racine non souillée par la terre du fait de la présence d'une membrane perméable à l'eau et aux éléments minéraux. De plus, nous avons réduit la disponibilité en eau des plantes dès la germination selon un régime hydrique inférieur à celui des plantes témoins. La contrainte hydrique est ici utilisée pour modifier les relations sources-puits pour le carbone entre la rosette et la racine *d'A. thaliana*. De ce fait, nous avons en premier lieu caractérisé l'effet de la contrainte hydrique appliquée sur les compartiments foliaire et racinaire, puis dans un second temps évalué les effets sur les relations sources-puits pour le carbone *via* la mesure de l'export du carbone depuis la rosette vers la racine. C'est ensuite que nous nous sommes attachés à analyser l'expression des transporteurs de saccharose dans la racine mais aussi dans la rosette, son étude ne pouvant être exclue pour avoir une vision globale du lien entre expression des transporteurs de saccharose et relations sources-puits pour le carbone. Aussi, puisque le système de rhizobox nous offre un accès facile au compartiment racinaire, nous avons analysé l'effet de la contrainte hydrique appliquée sur l'architecture du système racinaire. Cette étude a nécessité le développement de plusieurs outils.

Dans un troisième axe, nous nous sommes focalisés sur la localisation de l'expression des principaux transporteurs de saccharose dans la racine potentiellement impliqués dans les

relations sources-puits pour le carbone. Enfin, le quatrième axe de ces travaux a concerné la caractérisation du rôle précis de ces mêmes transporteurs dans racine *via* une approche de génétique inverse associée à des micro-greffes.

Le but final de ces travaux est de fournir une vision intégrative de l'expression des transporteurs de saccharose dans la rosette et la racine en lien avec la modification des relations sources-puits pour le carbone.

II. Matériel et Méthodes

Tableau 1 *Récapitulatif des différentes lignées d'Arabidopsis thaliana utilisées au cours des différentes expérimentations.*

Nom	Identifiant	Type	Fond génétique/ Ecotype	Source
Col-0	-	Sauvage	Col-0	Centre des ressources biologiques de Versailles
suc1	GK-139B11#05	Knock-Out	Col-0	NASC
SUC1-GUS	*pAtSUC1::SUC1::GUS*	Rapporteur	Col-0	John Ward, University of Minnesota
suc2-2	SALK_038124	Knock-Out	Col-0	Sylvie Dinant, INRA Versailles
*suc2*F	*pCmGAS::cSUC2*	Knock-Out complémenté	SALK_038124 Col-0	Sylvie Dinant, INRA Versailles
pSUC2-GUS	*pAtSUC2::GUS*	Rapporteur	Col-0	Sylvie Dinant, Versailles
pSUC2-GFP	*pAtSUC2::GFP*	Rapporteur	C24	Sylvie Dinant, Versailles
suc5	SAIL-365-D07	Knock-Out	Col-0	NASC
sweet11/sweet12	SALK_073629/ SALK_031696	Knock-Out	Col-0	Sylvie Dinant, INRA Versailles
pSWEET11-GUS	*pAtSWEET11::GUS*	Rapporteur	Col-0	Sylvie Dinant, INRA Versailles
pSWEET12-GUS	*pAtSWEET12::GUS*	Rapporteur	Col-0	Sylvie Dinant, INRA Versailles

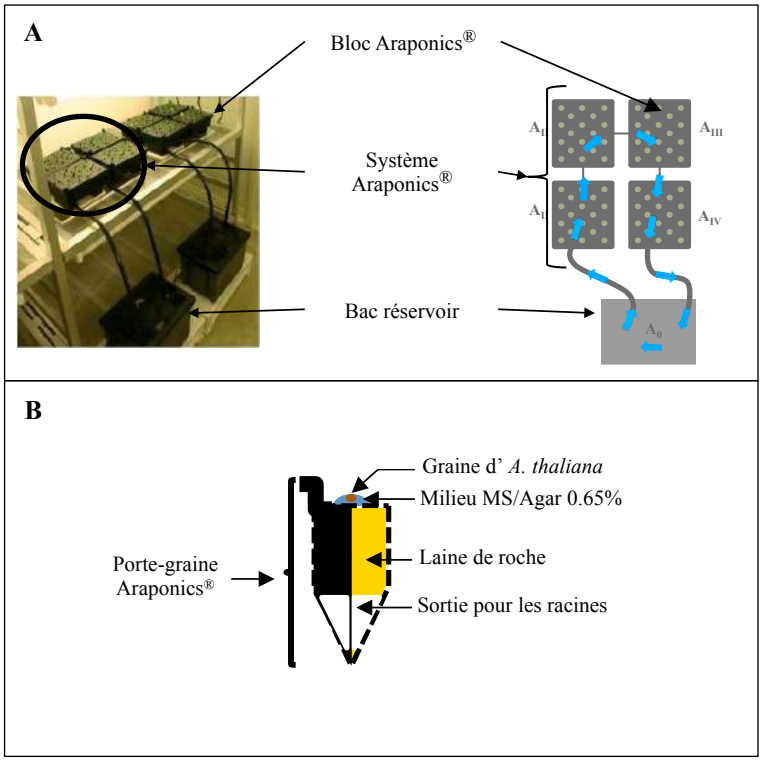


Figure 9 *Présentation du système d'hydroponie utilisé.*
A, Le système d'hydroponie est composé de 4 blocs pouvant contenir chacun jusqu'à 18 plantes, soit 72 plantes pour un système. Le système est relié à un bac réservoir d'une contenance de 15 L de solution nutritive. **B**, Schéma d'un porte-graine du système Araponics® utilisé pour semer les graines d'*Arabidopsis thaliana* dans le système de culture en hydroponie.

1 Matériel végétal

L'ensemble des expérimentations a été réalisé sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Ordre des Brassicales, Clade des Rosidées, Eudicotylédones), écotype Col-0 pour toutes les plantes sauvages ou transformées, excepté pour la lignée exprimant la GFP soluble sous le contrôle du promoteur du gène *AtSUC2*, d'écotype C24. Les graines sauvages ont été fournies par le centre des ressources biologiques de l'INRA de Versailles.

Les expérimentations concernant des plantes transgéniques dont l'expression d'un ou deux gènes a été supprimée ont été réalisées sur les simples mutants *suc1* (GK-139B11#05), *suc2-2* (SALK_038124), *suc5* (SAIL-365-D07) et le double mutant *sweet11 / sweet12* (SALK_073629 / SALK_031696). La lignée *suc2*F est une lignée *suc2-2* (SALK_038124) dont l'expression du gène *AtSUC2* a été partiellement restaurée en exprimant le gène *AtSUC2* sous le contrôle du promoteur de la galactinol synthase du melon (*pCmGAS1*) (Srivastava *et al.*, 2008).

Les expériences de localisation de l'expression des gènes étudiés ont été effectuées en utilisant les lignées suivantes :

- SUC1-GUS (*pAtSUC1::SUC1::GUS*), une lignée exprimant le gène rapporteur GUS sous le contrôle du promoteur de *AtSUC1* (2 kb) fusionnée au gène *AtSUC1,* introns et exons compris (Sivitz *et al.*, 2007)
- pSUC2-GUS (*pAtSUC2::GUS*), une lignée exprimant le gène rapporteur GUS sous le contrôle du promoteur de *AtSUC2* (2,3 kb) (Truernit and Sauer, 1995b)
- pSUC2-GFP (*pAtSUC2::GFP*), une lignée d'écotype C24, exprimant le gène de la GFP soluble sous le contrôle du promoteur de AtSUC2 (0.9 kb) (Stadler *et al.*, 2005a).
- pSWEET11-GUS (*pAtSWEET11::GUS*), une lignée exprimant le gène rapporteur GUS sous le contrôle du promoteur du gène *AtSWEET11* (1 kb).
- pSWEET12-GUS (*pAtSWEET12::GUS)*, une lignée exprimant le gène rapporteur GUS sous le contrôle du promoteur du gène *AtSWEET12* (1 kb).

Toutes les lignées utilisées sont listées dans le **tableau 1**.

2 Méthodes

L'étude du compartiment racinaire nécessite l'utilisation de systèmes de culture permettant la récolte de racines non contaminées par la terre. Les premières expérimentations

Tableau 2 *Composition du milieu de culture hydroponique, d'après Gibeaut et al. (1997).*

	Elements	Concentration (mM)
Macroéléments	$Ca(NO_3)_2$, 4 H2O	1,5
	KNO_3	1,25
	$MgSO_4$, 7 H_2O	0,75
	KH_2PO_4	0,5
	FeNa-EDTA	7,2 x 10^{-5}
Microéléments	KCl	5 x 10^{-2}
	$MnSO_4$, H2O	10^{-2}
	$CUSO_4$, 5 H2O	1,5 x 10^{-3}
	$ZnSO_4$, 7 H2O	2 x 10^{-3}
	H_3BO_3	5 x 10^{-2}
	$(NH_4)6Mo_7O_{24}$	7,5 x 10^{-5}

Tableau 3 *Masse de PEG à ajouter dans le milieu nutritif des plantes subissant la contrainte osmotique pour chaque augmentation de la concentration en PEG du milieu nutritif.*
Le passage à la concentration de 2,5% est marqué en gras pour indiquer un changement de milieu nutritif à cette étape. Ceci explique la grande quantité de PEG (375g) à devoir ajouter à cette étape.

Concentration finale en PEG (%) (p/v)	Masse de PEG dans les 15L de milieu (g)	Masse de PEG à ajouter en enlevant 1L
0,5	75	75
1	150	80
1,5	225	85
2	300	90
2,5	**375**	**375**

ont été effectuées en hydroponie. Dans un second temps, les plantes d'*A. thaliana* ont été cultivées en rhizobox, un système de culture innovant permettant la récolte de racines propres s'étant développées en présence d'un « vrai » sol. Enfin les expérimentations de micro-greffes nécessitent la culture des plantules d'*A. thaliana* en boite de Pétri.

2.1 Culture des plantes en hydroponie

2.1.1 Le système d'hydroponie

Les plantes ont été cultivées dans un système Araponics® (Araponics SA). Chaque système est composé de 4 blocs permettant chacun la culture de 18 plantes, soit 72 plantes par système. Chaque système est relié à un bac réservoir d'une contenance de 15 L de milieu de culture (**Figure 9A**). Les graines sont déposées dans une goutte de milieu $MS_{1/2}$ (M0233, Duchefa Biochemie) gélosé (Agar Type A, 0.65%, Sigma) préalablement placée sur un porte-graine rempli de laine de roche autoclavée (**Figure 9B**). Le système d'hydroponie utilisé permet la récolte en grand nombre de racines propres.

Le milieu nutritif utilisé pour la culture des plantes est le milieu de culture utilisé pour la culture d'*A. thaliana* par Gibeaut *et al.* (1997) (**Tableau 2**). Le milieu de culture est propulsé depuis le réservoir vers le système grâce à une pompe électrique (NJ400, Newjet™). Le milieu de culture est oxygéné *via* la circulation du milieu au sein du système et par la présence d'un bulleur électrique dans le réservoir (RenaAir 100, Rena®). Le milieu nutritif est remplacé une fois par semaine afin d'éviter le développement de micro-organismes et d'éventuelles carences en nutriments.

Les systèmes d'hydroponie sont disposés dans un phytotron (Plasteurop Serre.S-S-00.01) permettant de contrôler la température (Jour, 23°C ; Nuit, 18°C), l'humidité relative (Jour, 50% ; Nuit, 70%), et la photopériode (Jour, 10h ; Nuit, 14h). Le phytotron est éclairé par des tubes fluorescents (Master TL-D 36W/830, Philips). Les plantes disposées à approximativement 40 cm de la source lumineuse reçoivent une intensité lumineuse comprise entre 60 et 80 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$.

Quinze à vingt jours après le semis, les racines des plantes ont atteint une taille de 3 à 4 cm et peuvent par conséquent s'entremêler. Aussi, une partie des plantes est enlevée de façon à ne laisser que 7 plantes par bloc, soit 28 plantes par système. Ceci permet aussi aux rosettes de se développer pleinement sans entrer en contact avec les plantes à proximité. De plus, les plateaux des blocs sont régulièrement soulevés chaque jour, puis un mouvement vertical de va

et vient est alors délicatement effectué afin d'éviter l'enroulement des racines les unes aux autres.

2.1.2 Expérimentation « circadienne »

Pour l'expérimentation « circadienne », seul le stade jeune a été étudié (31 jours après semis (JAS)). Les racines et les rosettes des plantes ont été successivement récoltées à 9h (correspondant au début de la photopériode), 13h, 17h, 21h, 1h et 5h, puis congelées dans l'azote liquide pour l'extraction des ARNs et des sucres. Les récoltes nocturnes ont été effectuées en lumière verte pour ne pas perturber les plantes.

2.1.3 Expérimentation « Développement »

Pour l'expérimentation « développement », six principaux stades de développement ont été définis en accord avec Boyes *et al.* (2001) et les plantes ont été récoltées au milieu de la photopériode : 31 JAS pour le stade jeune (Y), 60 JAS pour le stade émergence de la hampe florale (IE), 70 JAS pour le stade floraison (F), 98 JAS pour le stade maturation des siliques (SR) et 125 JAS pour le stade récolte des siliques (SH). Les racines, les rosettes, les hampes et les siliques ont été récoltées séparément et congelées dans l'azote liquide pour extraire les ARNs et les sucres. La répartition de la biomasse et le « Root/Shoot » ratio (R/S) ont été calculés à partir du poids sec. L'allocation du carbone a aussi été évaluée lors de cette expérimentation *via* l'étude du transport du [U-^{14}C]-saccharose 0,5 mM depuis une feuille source vers les compartiments puits (jeunes feuilles, racines, hampes).

2.1.4 Expérimentation « Contrainte osmotique »

Pour l'expérimentation « Contrainte osmotique », la contrainte a été appliquée sur des plantes âgées de 24 jours en ajoutant une première dose de polyéthylène glycol (PEG) de poids moléculaire moyen 6000 (PEG 6000, WWR) correspondant à 0,5% (p/v) du volume de milieu nutritif contenu dans le système d'hydroponie, soit 75 g pour 15 L. La dose de PEG est ajoutée en retirant 1L de solution nutritive puis en rajoutant 1L de milieu supplémenté de la quantité nécessaire de PEG pour l'obtention de la concentration souhaitée.

Ensuite la même dose de 0,5% est ajoutée tous les deux jours jusqu'à ce que la dose de 2.5% soit atteinte (32 JAS). Le milieu nutritif est renouvelé le jour où la dose 2,5% est appliquée. Cette dose est ensuite maintenue pendant 3 jours jusqu'à 35 JAS. Les quantités de PEG à ajouter pour chaque augmentation de la concentration en PEG sont présentées dans le **tableau 3**.

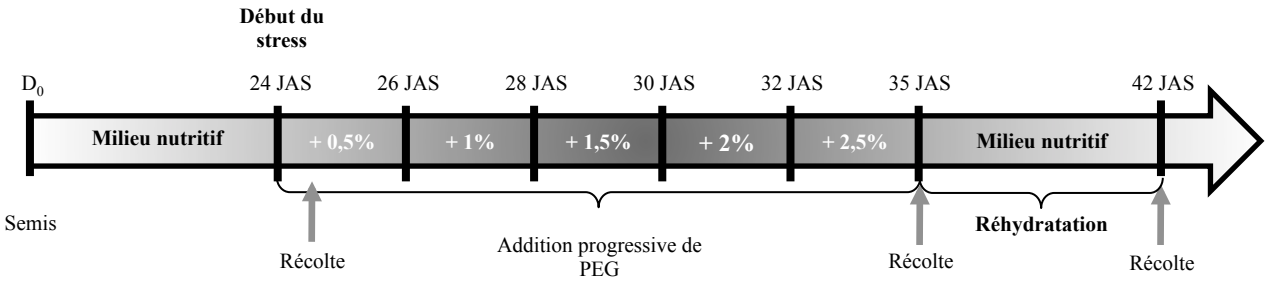


Figure 10 *Représentation schématique du protocole de la contrainte osmotique appliquée*.
La contrainte osmotique est appliquée progressivement, à partir de 24 jours après semis (24 JAS), par ajout de doses progressives de 0,5% de PEG tous les deux jours jusqu'à atteindre la concentration finale de 2,5% à 32 JAS. Cette concentration est maintenue pendant 3 jours jusqu'à 35 JAS. La période de contrainte osmotique est ensuite suivie par une période de réhydratation (de 35 JAS à 42 JAS) au cours de laquelle les plantes préalablement contraintes sont alimentées avec du milieu nutritif ne contenant pas de PEG. Des récoltes sont effectuées au début de la contrainte (24 JAS), à la fin de la période de contrainte osmotique (35 JAS) et à la fin de la période de réhydratation (42 JAS).

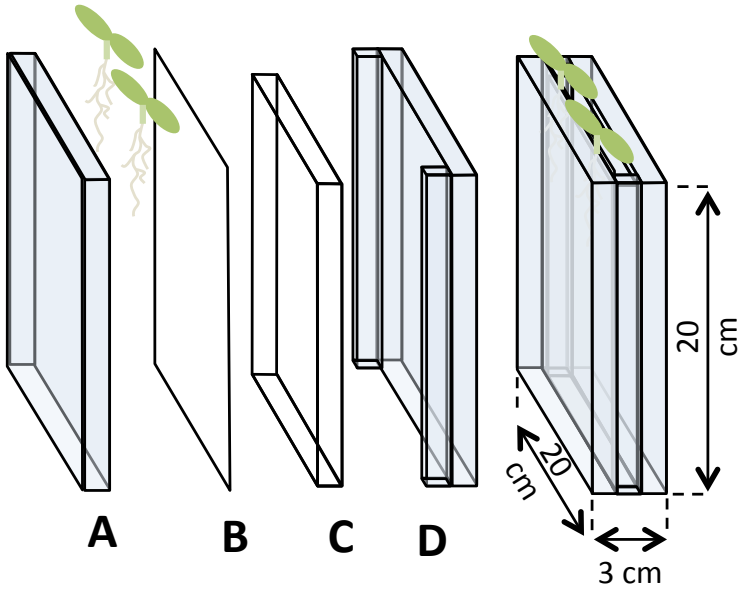


Figure 11 *Vue éclatée de la rhizobox*.
Deux à quatre plantes d' *A. thaliana* sont cultivées entre une plaque de Plexiglas amovible (A) et une membrane de nylon (B) séparant la racine du sol (C), lui-même placé dans la plaque de Plexiglas fixe (D).

A l'issue des 3 jours d'exposition à la dose 2,5% (35 JAS), le milieu nutritif supplémenté de PEG est remplacé par du milieu nutritif « frais », c'est à dire ne contenant pas de PEG, puis l'expérimentation est prolongée durant une semaine jusqu'à 42 JAS. La période allant de 35 JAS jusqu'à 42 JAS est appelée période de réhydratation. Le protocole de la contrainte appliquée est présenté en **figure 10**.

Les récoltes sont effectuées avant l'application de la contrainte (24 JAS), après la période de contrainte osmotique (35 JAS) et après la période de réhydratation (42 JAS). Les rosettes et les racines ont été récoltées séparément et congelées dans l'azote liquide pour extraire les ARNs et les sucres. Des rosettes additionnelles ont aussi été récoltées pour mesurer divers paramètres physiologiques (biomasse, statut hydrique). L'allocation du carbone a également été évaluée lors de cette expérimentation *via* l'étude du transport du [U-^{14}C]-saccharose 0,5 mM depuis une feuille source vers les compartiments puits (jeunes feuilles, racines).

2.2 Culture des plantes en rhizobox

2.2.1 La rhizobox : un système de culture innovant

Afin d'étudier le compartiment racinaire des plantes d'*A. thaliana*, tout en se rapprochant au maximum des conditions de culture en pots, la rhizobox a été développée au laboratoire. Les premières publications faisant état de la culture de plantes en rhizobox datent des années 1980 (Kuchenbuch and Jungk, 1982; Youssef and Chino, 1988). Un tel système permet la croissance de la racine de la plante entre deux membranes poreuses dont la maille est suffisamment large pour autoriser le passage de l'eau et des nutriments, mais aussi suffisamment resserrée pour empêcher la racine de croître dans le sol. Ainsi ce système, en plus de permettre l'analyse de l'architecture racinaire en deux dimensions et la récolte de racines propres, est compatible avec l'application de la carence hydrique en modulant le régime hydrique. De plus, ce système permet le développement complet de la plante *A. thaliana* depuis le semis jusqu'à la récolte des graines. La rhizobox utilisée dans nos expérimentations a été conçue en s'inspirant des travaux de Xiong *et al.* (2006b) pour le bloc de plexiglas et Wenzel *et al.* (2001) pour la membrane de nylon.

La rhizobox est constituée de deux plaques de Plexiglas, (Largeur x Longueur x Epaisseur, 20 cm x 20 cm x 1 cm) dont une plaque est amovible et l'autre fixe, séparées par deux espaceurs en Plexiglas (Largeur x Longueur x Epaisseur, 1 cm x 20 cm x 1 cm) disposés de chaque coté de la plaque fixe. La plaque amovible est solidement attachée à la plaque fixe

avec de la toile adhésive (Largeur, 50 mm) au niveau de la partie basse de la rhizobox. De multiples trous sont réalisés dans la toile adhésive une fois posée, afin de faciliter l'évacuation de l'excès d'eau. La membrane séparant la racine du sol, d'une largeur de maille de 0,7 µm (Sefar Nitex® 03-7/2, Buisine), est placée entre la plaque amovible et la plaque fixe, après que la rhizobox ait été remplie de terreau en position ouverte. La vue éclatée de la rhizobox est présentée en **figure 11**. Afin de maintenir le compartiment racinaire à l'obscurité et ainsi limiter l'apparition d'algues, la rhizobox est entourée d'un cache en plastique noir. Le tout est maintenu fermé avec deux pinces à ressort (Wolftcraft 40 mm, Leroy Merlin) disposées de part et d'autre de la rhizobox. Les rhizobox sont ensuite disposées au nombre de six dans des caisses en plastique (Largeur x Longueur, 40 cm x 60 cm).

La rhizobox est remplie avec 500 mL de terreau (EGO, Tref) tamisé et autoclavé. Le terreau est au préalable humidifié avec de l'eau supplémenté d'engrais ($1g.L^{-1}$) (Peters Professional, Everris) selon le rapport suivant : 200 mL d'eau-engrais pour 1 L de terreau autoclavé. A l'issue de la préparation du terreau, la teneur en eau du sol est de 0,8 g d'eau par g de terreau frais ce qui correspond à la capacité au champs. Avant de placer la membrane sur le terreau, ce dernier est au préalable bien étalé avec une taloche de telle sorte que la surface soit bien lisse. La rhizobox est ensuite fermée avec attention pour éviter tout plissement de la membrane. La rhizobox est pesée avant et après remplissage afin de connaître la masse exacte de terreau déposé à l'intérieur. Ceci permet de calculer et d'ajouter quotidiennement la quantité d'eau nécessaire au maintien de l'hygrométrie du sol.

La rhizobox peut accueillir 1 à 4 plantes en fonction du stade de développement choisi pour la récolte des plantes. Les graines d'*A. thaliana* sont semées dans une goutte de milieu $MS_{1/2}$ (M0233, Duchefa Biochemie) gélosé (Agar Type A, 0.65%, Sigma) déposée entre la plaque fixe de Plexiglas et la membrane à une profondeur maximum de 1 cm. Les gouttes sont déposées à équidistance les unes des autres. Afin d'assurer un meilleur taux de germination, plusieurs graines (4 à 8) sont déposées par goutte de gélose. L'efficacité de germination sera meilleure si les graines sont déposées en profondeur (maximum 1 cm). En effet, la gélose en surface sèche rapidement et les graines en surface au contact de l'air ne peuvent s'humidifier et germer. Il convient de noter que le nombre de gouttes de gélose déposées dans la rhizobox correspond au nombre de plantes souhaitées dans la rhizobox. Après le semis, des cônes de plastiques jaunes sont enfoncés dans le sol de part et d'autre de la rhizobox de façon à surélever de 2 cm environ le plastique alors déposé. Ainsi, les futures

plantules ne toucheront pas le plastique. Déposer un film plastique sur les rhizobox permet de maintenir une hygrométrie de l'air relativement importante et facilite donc la germination.

Les rhizobox sont ensuite disposées dans un phytotron (Plasteurop Serre.S-S-00.01) permettant de contrôler la température (Jour, 23°C ; Nuit, 18°C), l'humidité relative (Jour, 50% ; Nuit, 70%), et la photopériode (Jour, 10h ; Nuit, 14h). Le phytotron est éclairé par des tubes fluorescents (Master TL-D 36W/830, Philips). Les plantes disposées à approximativement 40 cm de la source lumineuse reçoivent une intensité lumineuse comprise entre 60 et 80 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$.

Pour faciliter la germination, les rhizobox sont arrosées matin et soir avec 0.5 mL d'eau déposé sur chaque goutte de gélose. Après 6 à 7 jours, les plantules sont dépressées de façon à ne laisser qu'une plante par emplacement dédié (= par goutte de gélose). De même, les graines n'ayant pas germé sont retirées. Les plastiques sont enlevés dans le même temps. A partir de cette étape, l'arrosage des rhizobox est réalisé quotidiennement avec de l'eau. Pour ce faire, les rhizobox sont pesées, et la quantité d'eau manquante, alors calculée, est ajoutée avec une seringue de 10 mL. L'eau est déposée de façon homogène sur toute la longueur de la rhizobox.

2.2.2 Expérimentation « Carence hydrique en rhizobox »

La rhizobox est un système de culture qui permet d'appliquer une carence hydrique. La carence hydrique est appliquée depuis le semis jusqu'à la récolte des plantes (30 JAS ou 49 JAS selon les expérimentations). La teneur en eau du sol des plantes soumises au déficit hydrique est diminuée de moitié par rapport à celle des plantes témoins, soit 0,4 g d'eau par g de terreau frais. La préparation des rhizobox dites « stressées » (« St ») est de ce fait quelque peu différente. Les rhizobox « St » sont remplies de la même façon que les rhizobox dites « Témoins » (« Tm »). Cependant, avant de déposer la membrane, les rhizobox « St » sont disposées sous une hotte à flux laminaire afin de les sécher pendant quelques heures (le temps dépend de la température ambiante). Le flux d'air de la hotte permet d'évaporer l'eau du sol de façon à atteindre l'humidité du sol souhaitée qui est contrôlé à l'aide de pesées régulières. La membrane est ensuite déposée sur les rhizobox. Le protocole (semis, culture, arrosage) par la suite ne diffère pas des rhizobox « Tm ».

2.3 Suivi physiologique des plantes

2.3.1 Nombre de feuilles et surface foliaire projetée

Le nombre de feuilles et la surface foliaire projetée ont été établis à partir des photographies des plantes prises de dessus avec une règle graduée pour déterminer l'échelle.

- **Nombre de feuilles**

Le nombre de feuille a ensuite été déterminé en comptant manuellement les feuilles à partir des photographies.

- **Surface foliaire projetée**

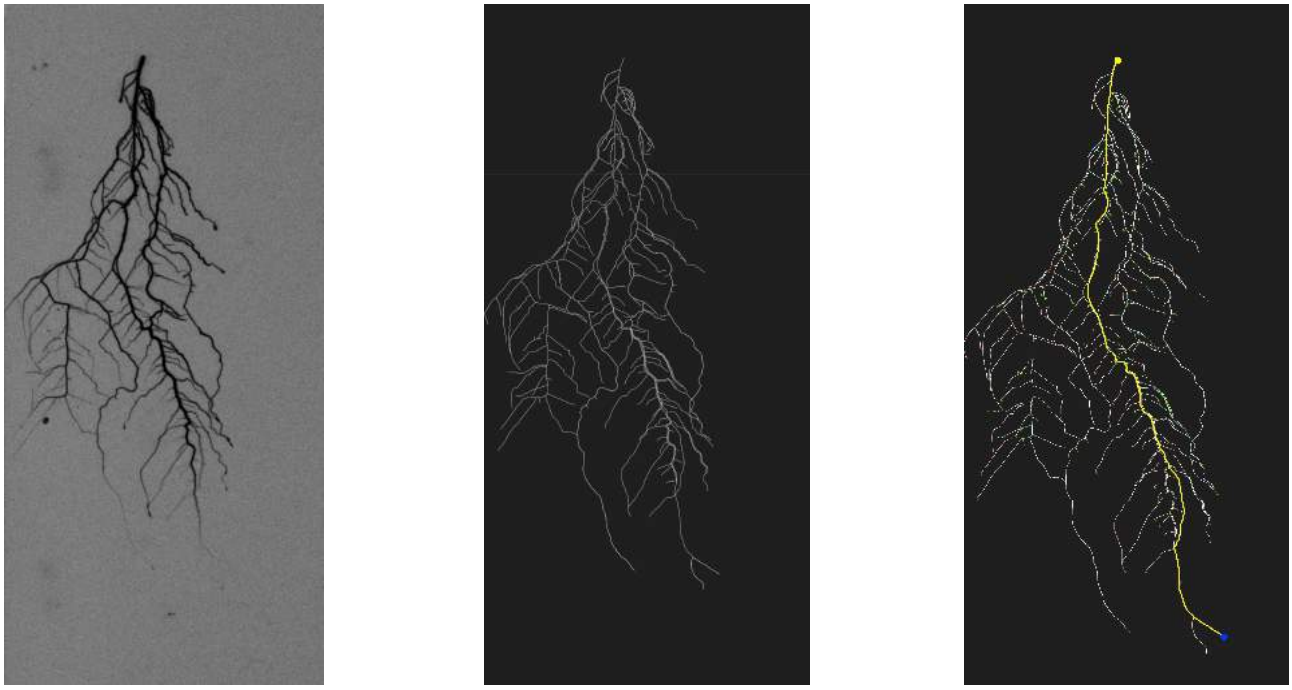
La surface foliaire projetée a été déterminée sur la base des photographies des plantes en utilisant le plugin « Threeshold Color » du logiciel d'analyse d'image ImageJ. La première étape de l'analyse consiste à éliminer tous les pixels différents du vert afin d'isoler les rosettes. Puis les pixels restants (les pixels verts) sont transformés en pixels noirs. Un outil de sélection des formes de couleur noire permet ensuite de sélectionner les rosettes alors entièrement constituées de pixels noirs. Enfin, un outil de mesure du nombre de pixels sélectionnés calcule l'aire de la rosette en pixel, qui avec le calibrage de l'échelle (règle graduée) est convertie en unité de mesure de surface (cm^2 ou mm^2). Le protocole utilisé est très bien décrit dans la thèse de Dany Mainson (2013).

2.3.2 Analyse du système racinaire

L'analyse du réseau racinaire a été effectuée sur des plantes cultivées en rhizobox, mais elle n'a pas pu être réalisée directement sur des photographies du système racinaire par manque de contraste entre la racine et la membrane. L'analyse du système racinaire (longueur, aire, et forme) a donc été effectuée à partir des images des systèmes racinaires radiomarqués préalablement scannés avec une résolution de 25 µm par pixel. Pour plus de détails concernant l'obtention des images, se référer à la partie **2.3.7** du matériel et méthode.

- **Longueur de la racine principale et des racines latérales**

Pour déterminer la longueur totale du système racinaire (racine principale + ensemble des racines latérales), les systèmes racinaires des plantes ont été entièrement dessinés manuellement sur ordinateur à partir des images des systèmes racinaires radiomarqués *via* le logiciel « Gimp ». A partir des images générées, la taille de la racine principale et de l'ensemble des racines latérales a été estimée en utilisant le logiciel RootReader2D (Clark *et*



A **B** **C**

Figure 12 *Méthode pour déterminer la taille du système racinaire*.
A, L'autoradiographie du système racinaire radiomarqué est utilisée pour analyser l'architecture racinaire. **B**, Le système racinaire est entièrement dessiné manuellement sur ordinateur avec le logiciel « Gimp ». La taille de la racine principale et des racines latérales est finalement déterminée avec le logiciel RootReader2D (Clark et al., 2013).

al., 2013) (**Figure 12**). Le protocole est présenté en détail en **annexe I**. Afin de vérifier que la mesure n'est pas dépendante de l'expérimentateur, la même expérimentation a été analysée par 3 manipulateurs différents. Après avoir confirmé que la mesure n'était pas subjective, les analyses ont été effectuées par plusieurs manipulateurs.

- **Forme du système racinaire**

La forme du système racinaire a tout d'abord été générée en délimitant le réseau racinaire avec plusieurs points de coordonnées (*x ; y*) avec le logiciel ImageJ. Cela nous a permis d'obtenir une forme « brute » du système racinaire où le point (0 ; 0) correspond au point de départ de la racine principale. A partir de la forme « brute », les coordonnées (*x ; y*) ont été extraites avec un intervalle spécifique vertical (= en profondeur) de 0,5 cm en utilisant le logiciel « PlotDigitilizer ». Une forme du système racinaire « nette » a ainsi été produite avec une résolution en profondeur de 0,5 cm. De chaque côté de la racine (gauche et droit), les valeurs des coordonnées *x* avec la même coordonnée *y* (la même profondeur) ont été moyennées pour générer une forme moyenne des systèmes racinaires des plantes cultivées en rhizobox à différents régimes hydriques. Le protocole est présenté en détail en **annexe II**.

- **Aire colonisée par le système racinaire**

A partir de la modélisation de la forme nette de chacun des systèmes racinaires, l'aire colonisée par le système racinaire a été déterminée en calculant l'intégrale avec un pas de 0,5 cm de part et d'autre du système racinaire. Le protocole est présenté en détail en **annexe III**.

2.3.3 Suivi du statut hydrique des plantes

Le Water Content (WC), aussi nommé teneur en eau en français, ainsi que le potentiel osmotique (Ψ_{osm}) ont été utilisés pour évaluer le statut hydrique des plantes.

- **Water Content (WC)**

Le WC a été évalué dans les feuilles et les racines lors des expériences de carence hydrique appliquée en rhizobox, et uniquement dans les feuilles lors des expériences de stress osmotique appliqué en système d'hydroponie.

Pour déterminer le WC, la masse fraîche (MF) de l'organe considéré a immédiatement été mesurée après séparation de la racine et de la rosette. La masse sèche (MS), elle, a été mesurée après séchage à 80°C pendant 24h. Le WC est ensuite déterminé comme suit : *WC = (MF – MS) / (MF)*. Pour les rosettes, les mesures ont été effectuées sur plante individuelle. Quant aux racines, les mesures ont été effectuées sur des pools de 2 à 3 plantes s'étant

développées dans la même rhizobox pour des raisons de faisabilité de la pesée sur matériel sec.

- **Potentiel osmotique (Ψ_{osm})**

Le Ψ_{osm} a été mesuré à partir de 3 à 5 feuilles par plante provenant de différents rangs foliaires. Ces feuilles sont placées dans des seringues de 2 mL. Les seringues sont ensuite successivement congelées dans l'azote liquide puis décongelées à température ambiante, et ce 3 fois. Pour extraire les liquides cellulaires, les seringues de 2 mL sont disposées dans des tubes de 15 mL, et l'ensemble est centrifugé (8000 g, 10 min). Dix µL du liquide cellulaire obtenu sont analysés pour déterminer l'osmolarité de la solution à l'aide d'un osmomètre calibré (Vapro 5520, Wescor). La mesure est répétée trois fois par échantillon. Le Ψ_{osm} est ensuite déterminé à partir de la mesure de l'osmolarité selon l'équation de Van't Hoff à 23°C.

$$\Psi_{osm} = -R.T.(Osm)$$

où Ψ_{osm} est exprimé en kPa (1 $J.L^{-1}$)

R est la constante des gaz parfait (8.314 $J.mol^{-1}.K^{-1}$)

T est la température en °K (23 °C = 296.15 °K)

Osm est l'osmolarité mesurée par l'osmomètre ($osm.L^{-1}$).

2.3.4 Suivi de l'allocation de la biomasse (Root/Shoot)

Pour déterminer la répartition de la biomasse entre le compartiment racinaire et le compartiment aérien de la plante, le rapport Root/Shoot (R/S) a été déterminé. Ce rapport a été calculé à partir des masses sèches des deux compartiments (80 °C, 24h). Ce ratio a été calculé sur plante individuelle pour l'expérimentation « Développement » alors qu'il correspond à une division des masses moyennes (racines et rosettes) pour l'expérimentation « Contrainte osmotique ». Quant aux expérimentations de carence hydrique menées en rhizobox, le ratio R/S a été déterminé sur rhizobox individuelle (plusieurs plantes).

2.3.5 Suivi du contenu en sucres solubles et amidon

Les teneurs en sucres solubles (saccharose, glucose, fructose) et en amidon ont été mesurées dans chacun des compartiments de la plante. Les extractions ont été effectuées sur matériel préalablement broyé dans l'azote liquide (TissueLyser II, Quiagen) et lyophilisé (minimum 48h à -30 °C) (Freezone[6], Labconco), excepté pour les expérimentations « Micro-greffes » où elles ont été menées sur matériel frais broyé dans l'azote liquide.

- **Sucres solubles**

Les sucres solubles ont été extraits à partir de 4 à 12 mg de tissus préalablement lyophilisés. Les masses utilisées diffèrent selon les quantités de matériel disponible. Les échantillons, une fois aliquotés dans des tubes de 2 mL puis pesés, sont extraits 3 fois (1,5 mL puis deux fois 0,5 mL) avec une solution de méthanol-chloroforme-eau (MCE) (12-5-3, v-v-v). Chaque lavage est suivi d'une centrifugation (6000 g, 2 min), puis les surnageants contenant les sucres solubles sont récupérés dans un tube de 15 mL. A la fin des trois lavages, le volume de surnageant est mélangé à 0,6 fois son volume d'eau. Le culot contenant l'amidon, auquel est ajouté 200 µL d'éthanol 80%, est conservé à -20 °C jusqu'à son dosage. Le mélange surnageant-eau est centrifugé (2500 g, 15 min), ce qui conduit à la formation de deux phases : une phase aqueuse avec les sucres solubles et une phase organique avec notamment les pigments. La phase supérieure aqueuse est alors collectée et évaporée (50°C, 3 à 4 h) avec un concentrateur (MiVac Quattro, Genevac). Les sucres solubles sont ensuite suspendus dans 200 à 500 µL d'eau, en fonction de la quantité de matériel utilisée pour l'extraction. Les sucres solubles sont finalement dosés en utilisant le « Sucrose/Fructose/D-Glucose Assay Kit » (Megazyme). Le protocole détaillé du kit est présenté en **annexe IV**.

- **Amidon**

L'amidon est dosé à partir des culots obtenus après l'extraction des sucres solubles. L'amidon est dégradé en glucose par l'action d'une α-amylase et d'une amyloglucosidase. Les unités glucose produites sont ensuite dosées avec un kit de dosage enzymatique (D-Glucose Assay Kit, Megazyme). Le protocole détaillé est présenté en **annexe V**.

2.3.6 Suivi de l'expression des gènes

- **Extraction des ARN**

Les ARN des différents compartiments sont extraits à partir du matériel préalablement congelé dans l'azote liquide puis broyé (TissueLyser II, Quiagen) suivant la méthode d'extraction au REB (RNA Extraction Buffer : Tris HCl 25 mM, pH 8 ; EDTA 25 mM ; NaCl 75 mM ; SDS 1% p/v ; β-mercaptoethanol 7,8% v/v) adapté de Kay *et al.* (1987). Après extraction, la quantité et la qualité des ARN ont respectivement été évaluées à une DO de 260 nm et sur électrophorèse en gel d'agarose.

- **Rétro-transcription**

Tableau 4 *Récapitulatif des couples d'amorces utilisés pour mesurer l'expression des gènes au cours des différentes expérimentations*.

Genes	Locus	Amorce sens (F)	Amorce anti-sens (R)
AtSUC1	AT1G71880	GACCTTTCGACGCCTTGTTC	AATACTCCACTAATCGCCGCTG
AtSUC2	AT1G22710	GGTAAGTGGTGTATTGGCGTTG	GAGCCAAACAACCACTGCTAAA
AtSUC3	AT2G02860	CAAGAACCGCAGCCGTAATC	CTTGACCGCCACCGGAAT
AtSUC4	AT1G09960	AGTGTCAAGCGAGGAACGCATA	AGTCACACGAGAAGCCATTGC
AtSUC5	AT1G71890	GGGCTATGGGATTCCATTAG	TAAAAGACAGACGACCAAGG
AtSUC6	ATG543610	TCCTGTCTCCGGCCTGCTT	AGGCGCCCATAGCGATGA
AtSUC7	AT1G66570	GTCTTTAAGAGACAAGCCCAC	AGACTGTCTATCCACAGTCGT
AtSUC8	AT2G14670	CTAGCTTCCATAATCTCAAGT	TTGGTAAGTTTCCACCTCCAAAA
AtSUC9	AT5G06170	GTGGTTCCTGATGAGCCG	GAGAAGCTGAACGTATGGG
AtSWEET9	AT2G39060	ACGCCGTCATGTGGTTCTTT	TGCTAGTTGGTTCTCTGTTGGC
AtSWEET10	AT5G50790	AACTCCTTTGCCTTTGTCGTACA	GTCAACACGAAGATTGCGCC
AtSWEET11	AT3G48740	TCCTTCTCCTAACAACTTATATACCATG	TCCTATAGAACGTTGGCACAGGA
AtSWEET12	AT5G23660	AAAGCTGATATCTTTCTTACTACTTCGAA	CTTACAAATCCTATAGAACGTTGGCAC
AtSWEET13	AT5G50800	CTTCTACGTTGCCCTTCCAAATG	CTTTGTTTCTGGACATCCTTGTTGA
AtSWEET14	AT4G25010	AAACGCTGTGGGATGCTTCA	TTCAAGAGCCCAAGAACCTTCA
AtSWEET15	AT5G13170	CAATGACATATGCATAGCGATTCCAA	GGACTCATCACGACAATACTCTTAAG
AtSAG12	AT5G45890	TGGATACGGCGAATCTACTAACG	GCTTTCATGGCAAGACCACATAG
AtRD29a	AT5G52310	GAAAGGAGGAGGAGGAATGGTT	GGAGCCAAGTGATTGTGGAGA
AtRBCS	AT1G67090	ACGGTACTGGACAATGTGG	CGAATCCGATGATCCTAATG
AtCAB1	AT1G29930	CCAGAGGCATTCGCTGAGTTG	CCTTACCAGTGACGATGGCTTG
AtTIP1.2	AT3G26520	CAAGAACGGTAGTCTCGGAACA	GACCAGCCCAGTAAACCCAGT
Réference	AT5G12240	AATATCGCTTTGCAGCTTCTG	GATTTTGCAAGGCTTTCGAG
AtSUC1 ADNc pleine longueur	AT1G71880	CACCTGATAATGGGAGCCTATGAA	AAACTAGTGGAATCCTCCCATG
AtSUC5 ADNc pleine longueur	AT1G71890	CACCTTTTCATAATGGGAGCCTTG	TAACTAATGGAATCCCATAGCC

Les ADNc sont synthétisés à partir de 1 µg d'ARN après traitement DNase (1 µL soit 1 unité) (Sigma-Aldrich) en utilisant la MML-V reverse transcriptase (1µL soit 200 unités) (Promega).

- **PCR**

L'expression du gène de référence *At5g12240* (Czechowski *et al.*, 2005) est alors contrôlé par PCR (40 cycles, 95°C, 30 s; 60°C, 30 s; 72°C, 30 s) en utilisant la GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega) (5 µL d'ADNc, 4 µL de tampon Flexi 5X, 1,6 µL de $MgCl_2$ 25 mM, 0,4 µL de dNTP 10 mM, 0,25 µL d'amorces sens (F) 20 µM, 0,25 µL d'amorces anti-sens (R) 20 µM, 0,2 µL (1 unité) de Go Taq, 8,3 µL d'eau) afin de vérifier le bon fonctionnement de la rétro-transcription. Les amplicons sont ensuite analysés en électrophorèse sur gel d'agarose 2%.

Le même protocole de PCR a été effectué afin de déterminer la présence ou l'absence de l'expression des gènes de transporteurs de saccharose dans les différents compartiments de la plante lors des expérimentations « Développement » et « Carence hydrique en rhizobox». Les amorces utilisées sont présentées en **tableau 4**.

- **qPCR**

Après vérification du bon fonctionnement de la rétro-transcription par PCR, l'expression des gènes dont l'expression a été retrouvée dans les différents organes a été étudiée en détail par qPCR.

La qPCR a été effectuée dans un volume total de 15 µL par puits (7,5 µL de SYBRGREEN GoTaq® Master Mix 2X (Promega), 0,1875 µL d'amorce sens (F) 20 µM, 0,1875 µL d'amorce anti-sens (R) 20 µM, 2,125 µL d'eau milliQ et 5 µL d'ADNc dilué au 1/10) en plaque de 96 puits. Le programme de qPCR comprend :

- Une première étape d'activation de la polymérase (95°C, 2 min)
- Une deuxième étape d'amplification des ADNc (40 cycles ; 95°C, 15 s ; 60°C, 60 s)
- Une troisième visant à déterminer les courbes de fusion des amplicons produits (95°C, 15 s ; 60°C ➔ 95°C, 20 min ; 95°C, 15 s).

L'expression des gènes étudiés est normalisée par le gène de référence *At5g12240* (Czechowski *et al.*, 2005). L'expression de ce gène est constante dans les plantes témoins et

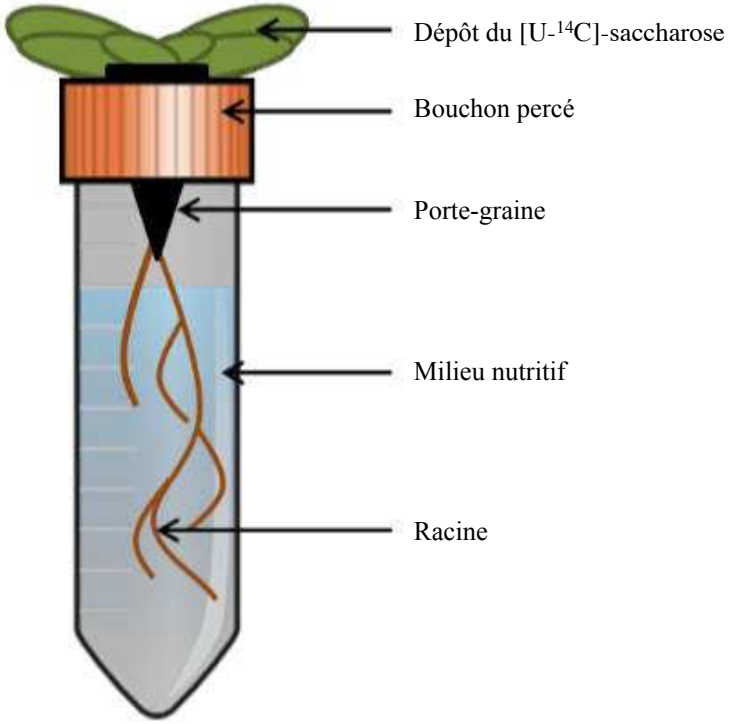


Figure 13 *Schéma du système utilisé pour l'absorption du [U-^{14}C]-saccharose*.

les plantes stressées au cours du temps. L'expression relative est définie selon la méthode du $2^{-\Delta Ct}$. Les gènes étudiés et les amorces correspondantes sont indiqués dans le **tableau II.3**.

2.3.7 Suivi des relations source-puits pour le carbone

Les relations source-puits pour le carbone ont été évaluées via l'étude du transport du [U-^{14}C]-saccharose 0,5 mM et des expériences d'assimilation du $^{14}CO_2$.

- **Etude du transport du [U-^{14}C]-saccharose 0,5 mM**

L'étude du transport du [U-^{14}C]-saccharose 0,5 mM a uniquement été effectuée au cours des expérimentations menées en système d'hydroponie, plus précisément lors des expérimentations « Développement » et « Containte osmotique ».

Les plantes individuelles sont transférées dans des tubes de 50 mL remplis de milieu de culture la veille de l'expérimentation (**Figure 13**). Les plantes sont ensuite placées sous une rampe lumineuse (80 µmol.m^{-2}.s^{-1}) dans la pièce habilitée pour la manipulation de la radioactivité jusqu'au début de l'expérimentation le lendemain.

Deux microlitres de [U-^{14}C]-saccharose 0,5 mM, (18,5 kBq) (Perkin Elmer) dissout dans du tampon MES (10 mM, pH 5,5), sont déposés sur une feuille source délicatement abrasée avec du carborundum (∅ 60 µm, Prolabo). Afin d'éviter l'évaporation de la goutte, cette dernière est entourée de vaseline, et le tout est recouvert d'une lamelle de verre. Le transport du [U-^{14}C]-saccharose 0,5 mM est effectué durant 5 h sous une rampe lumineuse (80 µmol.m^{-2}.s^{-1}).

Après 5 h, la rosette est immédiatement séparée de la racine et de la hampe (si présente). La feuille source radiomarquée est isolée de la rosette, et tous les organes sont placés entre une feuille de papier Whatman® 3MM et une feuille de Mylar. L'ensemble est disposé entre deux plaques d'acier préalablement refroidies à -80°C. Les échantillons sont ensuite lyophilisés (1 semaine, -30 °C) (Freezone^6, Labconco).

Après lyophilisation, la répartition de la radioactivité est visualisée en exposant les échantillons sur des écrans PhosphorImager (Storage Phosphor Screen, Molecular Dynamics). Après une semaine d'exposition, le marquage est révélé, à une résolution de 200 µm par pixel, à l'aide d'un scanner (Scanner Typhoon, GE Healthcare).

La quantité de radioactivité présente dans chacun des organes est ensuite déterminée. Chaque organe est pesé et incubé dans 200 µL de tampon de digestion (Acide perchlorique-Eau oxygénée 30%-Triton X100 0,1% ; 56-17-27 ; v-v-v) à 55°C pendant 24 h. Le liquide de

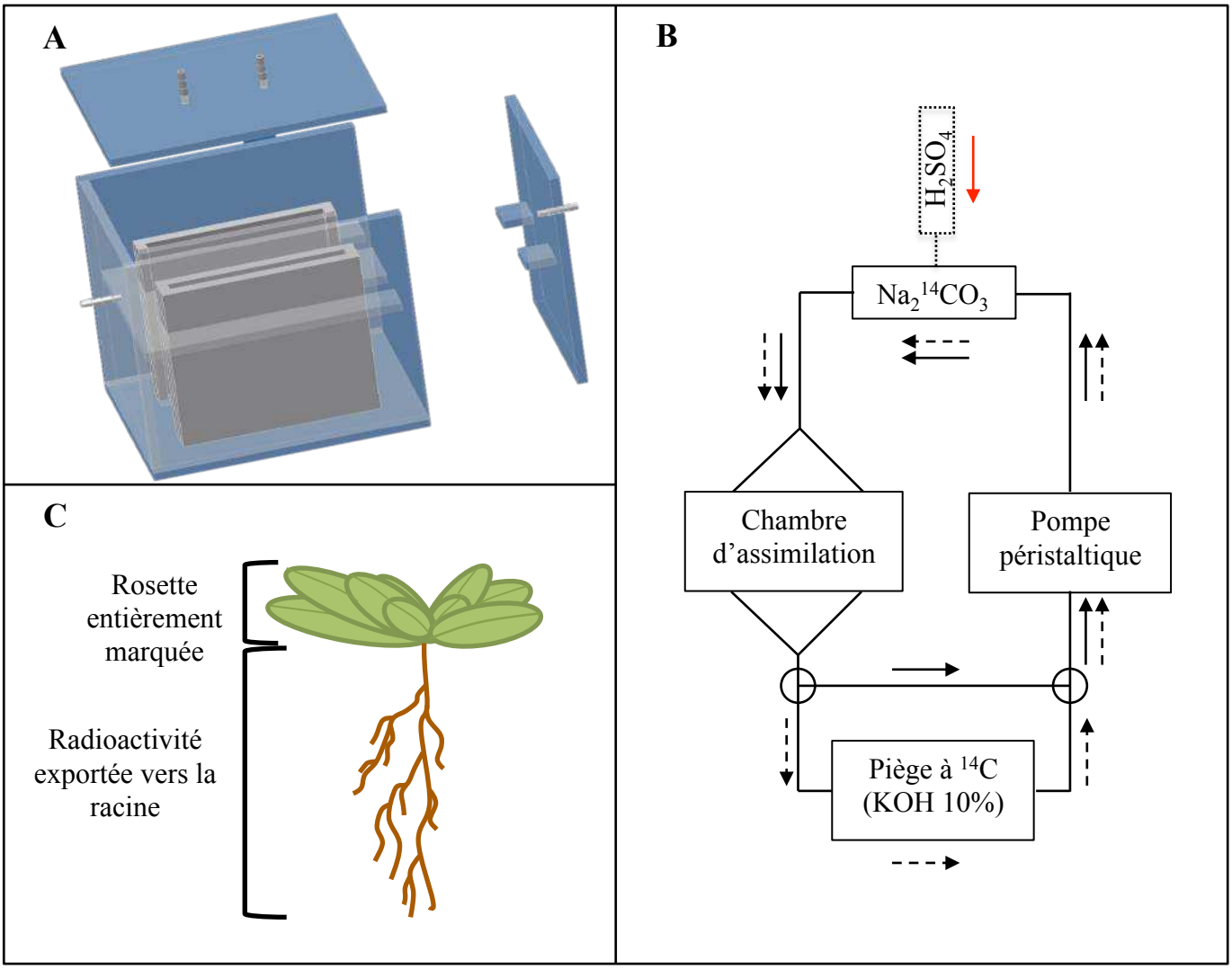


Figure 14 *Dispositif pour l'étude de l'allocation du ^{14}C.*
A, Chambre d'assimilation spécifiquement construite pour les rhizoboxes. **B**, Circuit dans lequel est incluse la chambre d'assimilation. La phase de « pulse » (flèches pleines noires), initiée par l'ajout d'acide sulfurique (flèche rouge) au bicarbonate de soude radiomarqué, est suivie par une période de piégeage du ^{14}C (flèches en pointillés noirs). **C**, Après la période de chasse, la radioactivité retrouvée dans la racine correspond à la radioactivité exportée depuis les feuilles vers la racine.

scintillation (Ecolite^{TM}) est ensuite ajouté (4 mL) et la radioactivité est quantifiée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Tri-Carb2910, Perkin Elmer).

- **Etude de l'allocation du ^{14}C**

L'étude de l'allocation du ^{14}C après un pulse de $^{14}CO_2$ a uniquement été effectuée lors des expérimentations « Carence hydrique en rhizobox ».

Les expériences de marquage de la plante entière ont été effectuées sur des plantes âgées de 30 jours cultivées en rhizobox, à l'intérieur d'une enceinte de Plexiglas placée sous une rampe lumineuse (80 µmol.m^{-2}.s^{-1}) (**Figure 14A**). Cette enceinte, dont la partie supérieure d'un volume de 5 L est en contact avec l'air additionné de $^{14}CO_2$, a spécifiquement été construite pour accueillir deux rhizobox, une « Tm » et une « St » contenant chacune deux plantes. Les rosettes qui seront en contact avec le $^{14}CO_2$ se trouvent dans la partie supérieure, alors que les systèmes racinaires sont dans la partie inférieure. Les deux parties sont séparées par une plaque empêchant l'entrée du $^{14}CO_2$ dans la partie inférieure. L'enceinte de Plexiglas est incluse dans un système étanche permettant de faire circuler le $^{14}CO_2$ (**Figure 14B**). Il doit être pointé que les plantes sont toujours placées sous une rampe lumineuse (80 µmol.m^{-2}.s^{-1}) dans la salle habilitée à la manipulation de la radioactivité 24 heures avant l'expérimentation.

Le $^{14}CO_2$, initialement présent sous forme de $Na_2{}^{14}CO_3$ avec une activité spécifique de 54 mCi.mmol^{-1}, est libéré dans la chambre étanche en acidifiant le bicarbonate de soude (20 µCi) *via* l'ajout de 2 mL d'acide sulfurique 10% (**Figure 14B**). La phase de libération du $^{14}CO_2$, aussi appelée phase de « pulse », génère une augmentation de la teneur en CO_2 inférieure à 2 ppm dans le système. La teneur en CO_2 dans la pièce est habituellement de 480 ppm. Le $^{14}CO_2$ est distribué à l'ensemble du système *via* la pompe péristaltique. Après une période de « pulse » de 15 minutes, le flux d'air est dirigé vers le piège à CO_2 (KOH 10%) pendant 5 minutes pour supprimer toute trace de radioactivité dans l'air circulant dans le circuit (**Figure 14B**). La chambre est ensuite ouverte et les plantes sont ensuite déplacées sous une rampe lumineuse (80 µmol.m^{-2}.s^{-1}) pour effectuer la période de « chasse » d'une durée de 45 min durant laquelle la radioactivité sera transportée dans la plante (**Figure 14C**).

A la fin de la période de « chasse », la rosette est immédiatement séparée de la racine et les organes sont ensuite placés entre une feuille de papier Whatman® 3MM et une feuille de Mylar. L'ensemble est disposé entre deux plaques d'acier préalablement refroidies à -80°C. Les échantillons sont ensuite lyophilisés (1 semaine, -30 °C) (Freezone^{6}, Labconco).

Après lyophilisation, la répartition de la radioactivité est visualisée en exposant les échantillons sur des écrans PhosphorImager (Storage Phosphor Screen, Molecular Dynamics). Après 5 jours d'exposition, le marquage est révélé, à une résolution de 25 µm par pixel, à l'aide d'un scanner (Scanner Typhoon, GE Healthcare).

La quantité de radioactivité présente dans chacun des organes a ensuite été déterminée selon le même protocole que pour l'étude du transport du [U-^{14}C]-saccharose 0,5 mM.

2.4 Etude de la localisation de transporteurs de saccharose

2.4.1 Etude de la localisation de l'expression *via* l'utilisation de plantes exprimant le gène de la β-glucuronidase (GUS)

La localisation de l'expression de *AtSUC1*, *AtSUC2*, *AtSWEET11* et *AtSWEET12* a été visualisée dans la racine de plantes âgées de 30 jours cultivées en rhizobox en régime hydrique classique ou restreint. La description des lignées utilisées est présentée en **tableau 1** (*AtSUC1*, SUC1-GUS ; *AtSUC2*, pSUC2-GUS ; *AtSWEET11*, pSWEET11-GUS ; *AtSWEET12*, pSWEET12-GUS). La membrane sur laquelle reste fixée la racine est déposée dans une solution d'acétone 80% pendant 30 min à -20°C. La membrane est rincée successivement 3 fois dans du tampon sodium-phosphate (NaP) (50 mM, pH7). La membrane est ensuite disposée dans un tampon contenant le X-glu (5-Bromo-4Chloro-3-indolyl-B-D-glucopyranoside), molécule qui modifiée par la β-glucuronidase donnera le composé de couleur bleue (Tampon NaP, 50mM ; $K_4[Fe(CN)_6]$, 0,5 mM ; $K_3Fe(CN)_6$, 0,5 mM ; X-glu, 1 mM ; Triton X100 0,1%). Le tout est placé dans une cloche à vide pendant 5 min pour faciliter l'infiltration du tampon à l'intérieur des tissus. L'incubation a ensuite lieu pendant 4 à 12h à 37°C à l'obscurité, de telle sorte à ce que la coloration bleue soit bien visible. La réaction est arrêtée en effectuant un rinçage avec du tampon NaP (50 mM, pH 7), puis l'échantillon est décoloré dans l'alcool 96% et enfin conservé dans l'alcool 70%. Il convient de noter que pour un même génotype, les racines « Tm » et « St » ont été traitées en même temps, dans le même récipient, avec les même temps d'incubation, afin de pouvoir comparer la localisation et le niveau d'expression locale entre les condition « Tm » et « St ».

Afin d'essayer de déterminer plus précisément la localisation du marquage GUS, nous avons essayé d'observer des portions de racines marquées au microscope confocal (FV1000, Olympus). Les échantillons sont préalablement fixés (Méthanol/Eau/Acide Acétique, 5/4/1, v/v/v) durant 12 heures à 4°C. Les échantillons sont ensuite rincés à l'eau, puis incubés 40 min à température ambiante dans de l'acide périodique (Eau/Acide Périodique, 9/1, v/v).

Après avoir été rincés, les échantillons sont incubés dans le réactif de Shiff (Métabisulfite de sodium 100 mM, HCl 15% v/v, Iodure de propidium 0,01% p/v) pendant 2 heures. Les échantillons sont ensuite placés sur des lames de verre en présence de quelques gouttes d'une solution de chloral hydrate (Chloral-hydrate/Eau/Glycérol, 4/2/1, p/v/v) pendant une nuit en veillant à ce que la solution ne sèche pas. Le lendemain le surplus de la solution de chloral hydrate est enlevé, et les échantillons sont montés entre lame et lamelle dans une goutte de solution de Hoyer (Chloral hydrate/ Eau/Gomme arabique/ Glycérol, 100/25/15/10, p/v/p/p).

2.4.2 Localisation de AtSUC2 par immunolocalisation

Parmi les transporteurs de saccharose étudiés au cours de ces travaux, seul un anticorps spécifique de AtSUC2 est disponible au laboratoire. Les études de la localisation de la protéine AtSUC2 ont principalement été réalisées sur la hampe florale et la racine.

Les hampes ont été récoltées sur des plantes Col-0 et *suc2*F (**Tableau 1**) cultivées en pots. La hampe est découpée en morceaux d'environ 1 à 2 cm. Chaque des morceau est ensuite placé dans un tube de 2 mL dans lequel est coulée une gélose 6% (Agar type A, Sigma).

Les racines sont récoltées sur des plantes Col-0 âgées de 30 jours en rhizobox. La rosette est séparée de la racine, la rhizobox ouverte, puis la membrane sur laquelle est accrochée la racine est placée dans une boîte de Pétri (12 cm x 12 cm) et recouverte de gélose 2% (Agar Type A, Sigma) (environ 1 cm d'épaisseur). Après polymérisation de la gélose, des morceaux de 1 à 2 cm de la partie supérieure de la racine principale sont découpés et placés dans des tubes de 2 mL dans lesquels est coulée une gélose 6% (Agar Type A, Sigma).

Les cylindres obtenus après solidification de la gélose sont collés sur des supports métalliques ensuite intégrés au niveau du vibratome (Microm HM650V, Thermo Scientific) pour réaliser des coupes de 25 à 50 µm d'épaisseur. Comme le cylindre métallique est immergé dans une solution de PBS 1X (137 mM NaCl ; 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 ; 1,76 mM KH_2PO_4), les coupes générées sont donc recueillies dans ce tampon puis transférées dans un petit « panier » en toile, servant de filtre, disposé dans un récipient contenant du PBS. Ce « panier » est déplacé de bain en bain et évite ainsi la manipulation directe des coupes lors des différentes étapes menant à la fixation des anticorps.

La fixation des coupes est effectuée dans une solution de paraformaldéhyde 4% - PBS 1X (30 min, sous agitation sur glace). La fixation est suivie de 6 rinçages de 10 min dans du PBS 1X sous agitation sur glace. La saturation est ensuite effectuée dans du PBS 1X – BSA

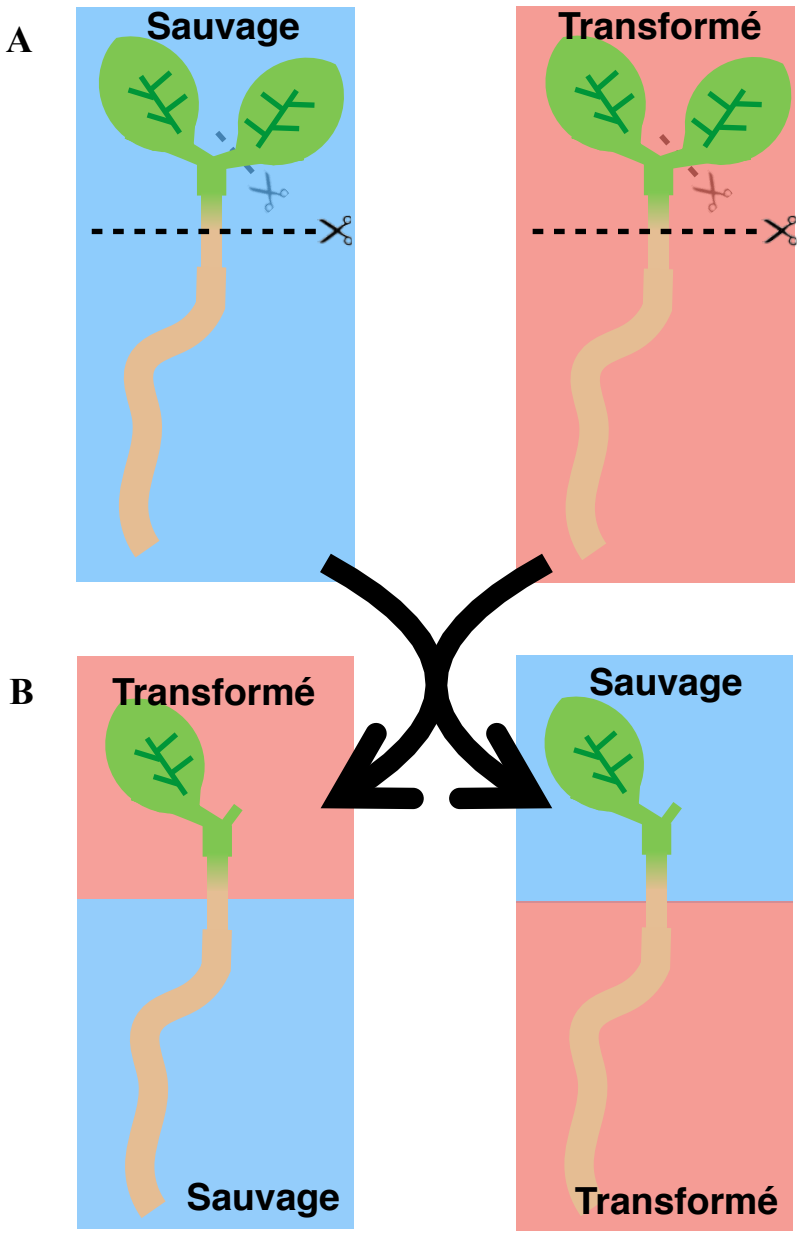


Figure 15 *Schéma explicatif du protocole de micro-greffe*.
A, Une section nette est effectuée avec une lame de scalpel (n°11) au niveau de l'hypocotyle des plantules âgées de 4 jours du « sauvage » et du « transformé ». Un des cotylédons est coupé sur chaque plantule avec la même lame de scalpel. **B**, La racine de la plantule « sauvage » est ensuite posée au niveau de l'hypocotyle de la partie aérienne de la plantule « transformé ». De même la racine de la plantule « transformé » est apportée au niveau de l'hypocotyle de de la plantule « sauvage ».

(Bovine Serum Albumine) 3% (p-v) durant 1h sous agitation sur glace. La saturation est suivie de 2 rinçages post-saturation de 10 min en PBS 1X – BSA 2% sous agitation sur glace. Les coupes sont ensuite placées dans une solution contenant l'anticorps primaire anti-AtSUC2 (SD22 lapin n°1) dilué au 1/200 dans du PBS 1X – BSA 2% pendant une nuit à 4°C sous agitation. Le lendemain les coupes sont rincées dans du PBS – BSA 2% (5 fois, 5 min) puis placées au contact de l'anticorps secondaire (Alexa 488 Chèvre anti-lapin, excitation 490 nm, émission 525 nm) dilué au 1/300 dans du PBS 1X – BSA 2% pendant 3h sous agitation à 28°C. Les coupes sont rincées dans du PBS 1X, colorée durant 5 min dans une solution de Bleu Evans (0,01%) et finalement rincées dans du PBS 1X (5 fois, 5 min). Les coupes peuvent alors être conservées à l'obscurité à 4°C jusqu'à une semaine.

Les coupes sont ensuite montées entre lame et lamelle dans une goutte d'eau et observées au microscope optique confocal (FV1000, Olympus).

2.5 La micro-greffe : une technique pour étudier spécifiquement l'impact d'une mutation au niveau racinaire

Des micro-greffes ont été effectuées dans le but d'étudier l'effet de la présence, de l'absence, ou encore de la surexpression d'un transporteur de saccharose au niveau de la racine, et ce indépendamment du génotype de la rosette. La technique utilisée est celle récemment publiée par Regnault *et al.* (2015) (**Figure 15**).

Les graines de l'écotype Col-0 ou de lignées transformées sont stérilisées par un premier rinçage dans l'éthanol 70% (1 min) suivi d'un passage dans une solution d'hypochlorite de sodium commerciale diluée au ¼ (5 min). Les graines sont ensuite lavées plusieurs fois dans de l'eau stérile (5 fois, 1 min).

Les graines stérilisées sont alors semées en ligne droite en boîte de Pétri (12 cm x 12 cm) sur milieu MS ½ (M0233, Duchefa Biochemie) gélosé (0,7%, Agar Type A, Sigma) supplémenté de 0,5% ou 2% (p/v) de saccharose (en fonction du génotype). Jusqu'à 60 à 70 graines réparties sur 3 lignes peuvent être semées par boîte. Les boites sont ensuite placées 2 jours à l'obscurité à 4°C.

Les boîtes sont ensuite disposées verticalement dans une chambre climatique (Sneijders Scientific), permettant de contrôler la température (Jour, 23°C ; Nuit 18°C), la photopériode (Jour, 16 h ; Nuit, 8 h), l'humidité relative (Jour, 50% ; Nuit, 70%) et l'intensité lumineuse (120 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$), pendant 4 à 5 jours (en fonction du génotype).

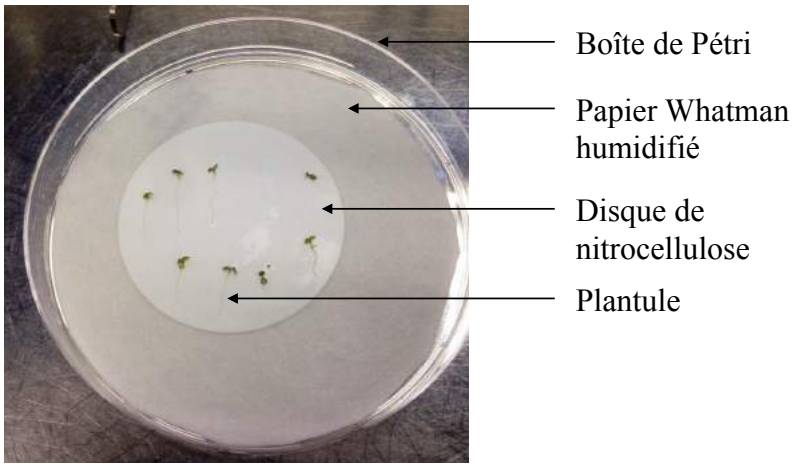


Figure 16 *Présentation du système de micro-greffe utilisé*.
La greffe est effectuée sur des plantules déposées sur un disque de nitrocellulose, lui-même disposé sur un disque de papier Whatman® 3MM humidifié. L'ensemble est placé dans une boite de Pétri de 9 cm de diamètre.

Les greffes sont effectuées sur des plantules âgées de 4 à 5 jours sous hotte dont le flux d'air est éteint afin d'éviter le dessèchement des plantules. Les greffes se réalisent sous une loupe binoculaire dans une boite de Pétri (∅ 9 cm) dans laquelle a été disposé un cercle de papier Whatman 3MM préalablement autoclavé puis humidifié (0,5 mL à 1 mL pour une boîte Pétri) avec de l'eau stérile. Un disque de papier filtre en nitrocellulose (Pore : 0,45µm, Millipore) est ensuite disposé sur le papier Whatman (**Figure 16**). Les plantules de génotype *A* (6 à 8) sont ensuite disposées sur le disque de nitrocellulose (**Figure 16**).

Un des deux cotylédons est tout d'abord sectionné avec une lame de scalpel (n°11). Couper un des cotylédons permet de maintenir la plantule dans une position à plat facilitant la jonction de la racine lors de la greffe. La racine est ensuite sectionnée au niveau de l'hypocotyle avec la même lame de scalpel (**Figure 17A**). Les cotylédons coupés et les racines sont ensuite éliminés. Il ne reste alors que les parties aériennes des plantules auxquelles il manque un cotylédon dans la boîte.

Six à huit plantules du génotype *B* sont ensuite disposées dans la même boîte. Une section est effectuée au niveau de l'hypocotyle et les parties aériennes sont éliminées. Sont alors présentes dans la boite, les parties aérienne du génotype *A* et les racines du génotype *B* (**Figure 17B**).

Les parties *A* et *B* sont ensuite délicatement rapprochées le plus possible dans le prolongement de leur fragment d'hypocotyle et de manière à ce que leurs sections coïncident parfaitement (**Figure 17B**). Cette étape est cruciale et requiert un temps conséquent, il faut donc s'assurer que le papier Whatman reste suffisamment humide tout au long de la manipulation des plantules. La boîte est ensuite refermée, scellée avec du film plastique et maintenue 5 à 6 jours dans la chambre climatique en position horizontale légèrement inclinée.

Le succès de la greffe est vérifié sous loupe avant repiquage en terre (pot ou rhizobox). Les micro-greffes sont ensuite cultivées en condition classique en rhizobox par la suite (**voir 2.2.1**). Le repiquage est réalisé par dépôt de la plantule greffée dans un trait de milieu MS ½ (M0233, Duchefa Biochemie) gélosé 0,7% (Agar Type A, Sigma) déposé sur la paroi de Plexiglas amovible de la rhizobox ouverte. La rhizobox est ensuite refermée. Les plantes sont ensuite traitées comme les graines lors de la germination classique (**voir 2.2.1**). En revanche dans ce cas, la présence du film plastique est maintenue 2 à 3 jours après le repiquage. Les plantes greffées sont cultivées pendant 21 jours à partir du jour de repiquage.

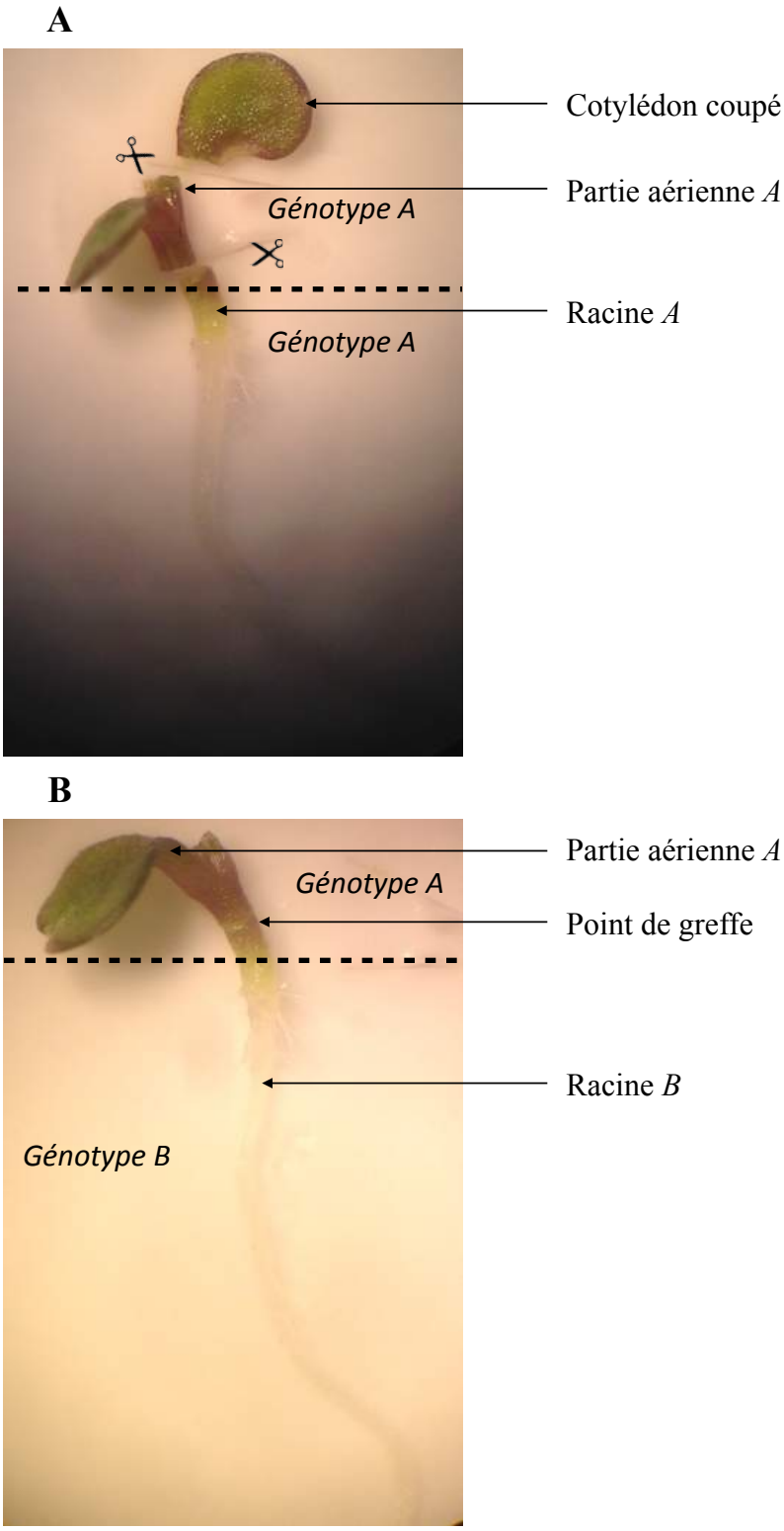


Figure 17 *Vue en détail de la micro-greffe effectuée*.
A, Un des cotylédons ainsi que la racine d'une plantule de génotype *A* sont sectionnés. **B**, La racine de génotype *B* est rapprochée de la partie aérienne de génotype *A* au niveau du point de greffe situé à la jonction des hypocotyles respectifs de *A* et *B*.

Dans la suite de ce rapport, les différentes greffes seront dénommées par le génotype de la rosette en numérateur et celui de la racine au numérateur (ex : A/B).

III. Chapitre « Etude des relations source-puits dans des situations contrastées »

Avant propos

L'objectif de ce chapitre est d'apporter un bref aperçu de l'expression des transporteurs de saccharose dans les différents compartiments de la plante au cours de différents scénarios connus pour modifier les relations source-puits pour le carbone.

C'est ainsi que nous avons effectué dans un premier temps une cartographie de l'expression des transporteurs de saccharose au cours du développement complet (6 stades) de plantes *A. thaliana* cultivées en hydroponie.

L'étude a aussi été menée dans un contexte de contrainte osmotique sur des plantes adultes présentant une rosette source et un système racinaire puits, la réduction de la disponibilité en eau étant connue pour modifier les relations source-puits pour le carbone.

L'expression des principaux transporteurs de saccharose exprimés a, dans chacun des scénarios (développement et contrainte osmotique), été discutée en lien avec les contenus en sucres de chacun des organes ainsi qu'avec la répartition du saccharose radiomarquée exportée depuis une feuille source vers les différents organes de la plante.

Carbon source/sink relationship in *Arabidopsis thaliana*: from a sucrose transporters genes point of view

Mickaël Durand, Dany Mainson, Benoît Porcheron, Laurence Maurousset, Rémi Lemoine and Nathalie Pourtau

Affiliation and address: Université de Poitiers, UMR CNRS 7267 EBI Ecologie et Biologie des Interactions, Equipe "Sucres & Echanges Végétaux-Environnement", Bâtiment B31, 3 rue Jacques Fort, TSA 51106, 86073 Poitiers Cedex 9, France.

Corresponding authors: Nathalie Pourtau (nathalie.pourtau@univ-poitiers.fr)

Abstract

Source-sink transport of sucrose is one of the major determinants of plant growth. In plants, sucrose produced in leaves by photosynthesis is exported to sink organs as roots, flowers and siliques through the phloem. Whole-plant carbohydrates partitioning requires the specific activity of membrane transporter: sugar transporter. In *Arabidopsis thaliana* plants, two types of transporters are known to be involved in the phloem loading of sucrose in source organs: AtSUCs and AtSWEETs transporters but until now, little is known about sucrose transporters and their activity during phloem unloading in sink organs especially in roots. This study is focused on the identification of sucrose transporters in leaves and sink organs (*e.g.* roots, stem and siliques) at different stages of development. We have also reported their role in source-sink carbohydrates partitioning during a circadian-clock period, a fully development cycle and in response to an osmotic stress (hydroponic culture with poly-ethylene glycol 6000 [PEG] addition), situations known to modify C repartition in whole plant. With a specific attention on C demand in root, we noticed that root remained a C consuming organ coping with diurnal fluctuations in available C and trophic competition with others sinks during plant development. During osmotic stress, amount of translocated [U-^{14}C] sucrose decreased for both organs: rosette and root. All these results highlighted that source/sink relationship might be linked with the regulation of sucrose transporters gene expression and sugar content.

INTRODUCTION

Plant growth autotrophically and perform photosynthesis by assimilating CO_2 and using light and water to produce carbohydrates. Photosynthates make C available for growth and maintenance of non-photosynthetic organs. C fixation occurs in source organ such as mature leaves that are photosynthetically active tissues. C fixed in excess could be exported to the non-phostoynthetic tissues, sinks organs such as roots, reproductive organs, fruits, tubers and meristems (Koch, 2004). However, assimilated carbon can either be transiently stored as starch in chloroplasts or as sucrose in the vacuole and then remobilised when sink demand exceeds photosynthetic C supply, as for example during the night (Smith and Stitt, 2007). During the day, sucrose was supplied through photosynthesis and was linked during the night with starch degradation to maintain growth metabolism (Graf *et al.*, 2010; Smith and Stitt, 2007). The circadian clock regulation of the source/sink carbon allocation has been proposed to be strongly fine tuned by efficient resources management and starch was proposed to be a 'major integrator' of growth plant (Stitt and Zeeman, 2012; Sulpice et al., 2009).

Because up to 80% of C fixed is exported to sinks (Kalt-Torres and Huber, 1987), regulation of C partitioning is vital for plant growth and development (Gifford *et al.*, 1984). The amount of C available depends on the type of organs, their state of development and environmental conditions (Farrar, 1993; Paul and Foyer, 2001; Stitt, 1991). Source-to sink transport of sugar is one of the major determinants of plant growth and implicates a fine-regulation of carbon distribution across plant organs through the phloem (Lemoine *et al.*, 2013). During its life cycle, a plant has to face changes in C allocation linked with the competition status among various sinks for sugars availability. Carbon partitioning in whole plant is dependent of the stage of development. During vegetative stages, root and young leaves are major sinks whereas fruits and seeds become dominant sink during reproductive stages (Wardlaw, 1990). At the end of the development it can be assumed that, two sinks, root and seeds, enter in competition for carbon which flux will be determined by their respective "sink strength" (Ho, 1988).

Environmental factors are also known to impact on source/sink relationship and can affect C allocation and plant growth (Lemoine *et al.*, 2013). In the future, water availability is predicted to decrease dramatically in several area of the world with large impacts on crop productivity. As a results of water deficit, photosynthesis decreases (Cornic, 2000) and has an impact on carbon translocated to sink organs especially roots (Hummel *et al.*, 2010). In leaves, carbohydrates level increases as a consequence of growth leaf limitation. Excess of C

could be stored as starch or kept as soluble carbohydrates, both participating to increase availability of C for the roots (Hummel *et al.*, 2010). Sugar accumulation might play a role in osmotic adjustment to maintain metabolic activity in source leaves (Chen and Jiang, 2010).

Even if it assumed that growth and development in plant is an integrated process in which primary assimilation in source tissues is balanced by the metabolic needs of heterotrophic sinks, the control of partitioning of photosynthates is not so well understood but likely involves a complex regulatory network dependant on plant age, species and environmental conditions (Afoufa-Bastien *et al.*, 2010). As in many plants, in *Arabidopsis thaliana*, the major photosynthetic compound exported from source leaves is sucrose and it is allocated to heterotrophic sink tissue through the phloem (Lemoine, 2000). Sucrose produced in mesophyll cells of mature leaves moved symplastically through plamodesmata to the phloem parenchyma (PP) cells closed to collection phloem cells. In apoplastic loading species as *A. thaliana*, sucrose is actively loaded from the apoplast into the companion cell-sieve element (CC/SE) complex (Haritatos *et al.*, 2000). Active phloem loading requires proteins to facilitate efficient movement across membranes. The release of sucrose into the apoplast is supposed to be facilitated by members of the SWEETs transporters family (AtSWEET11 and AtSWEET12) (Chen *et al.*, 2012) and sucrose is then accumulated in the Companion Cell (CC) by an energy dependent AtSUC2 H+/sucrose symporter (Gottwald *et al.*, 2000a; Stadler and Sauer, 1996) and finally passes to the sieve element (SE) through plasmodesmata. The high concentration of sucrose in the SE increases turgor pressure generating high hydrostatic pressure allowing sucrose transport in the sieve tubes to the sink organ according to the Mass-Flow model (Münch, 1930). Unloading of sucrose from the phloem can occur through the symplastic or apoplastic pathways depending of tissue types or development stages, but always where the hydrostatic pressure drops. Apoplastic sucrose unloading involves sucrose transporters in sink organs or it conversion to hexoses by a cell-wall invertase (Ayre, 2011; Ludewig and Flügge, 2013; Ruan, 2014).

The expression of many sucrose transporters genes has been reported in the roots of *Arabidopsis*, such as *SUC2* (Stadler and Sauer, 1996; Truernit and Sauer, 1995b), *SUC1* (Sivitz *et al.*, 2007; Sivitz *et al.*, 2008), *SUC3* (Meyer *et al.*, 2004), *SUC4* (Schneider *et al.*, 2012) and *SUC5* (Baud *et al.*, 2005), but their exact role in roots, especially for SUC2, has not been completely unveiled. A role in sucrose unloading has been suggested, based on data on orthologous *ZmSUT1* (Carpaneto *et al.*, 2005) demonstrating that ZmSUT1 can work in the efflux mode in sink phloem, due to reduced proton motive force and favourable gradients.

Moreover, when the potato orthologous *StSUT1* expression was reduced, the growth of young tubers was transiently reduced, indicating a role for SUT1 in sucrose unloading (Kühn *et al.*, 2003). Finally, many data on *Arabidopsis* were obtained from young seedlings grown in agar plates and therefore concerned the early stages of development.

So, to get more information about source/sink transport regulation, we have settled an experimental system allowing the rapid and easy collection of integral roots systems. Plants were grown hydroponically in an Araponics® growing system (Araponics). The expression of sucrose transporter genes was monitored in shoots and roots under several conditions where source/sink relations could be altered. We first checked that transporter gene expression was not too altered by the day-night cycle so that a convenient time for harvest was chosen. The same analysis was conducted in two contrasting situations: during the whole development cycle with four components (rosette, roots, stems and slliques), and in response to osmotic stress on two compartments (rosette and roots). Altogether, our results point to the important role of transporters involved in phloem loading (SUC2 and SWEET11-12) in all situations in the leaves and also to the contrasting roles of SUC2 and SUC1 in the roots.

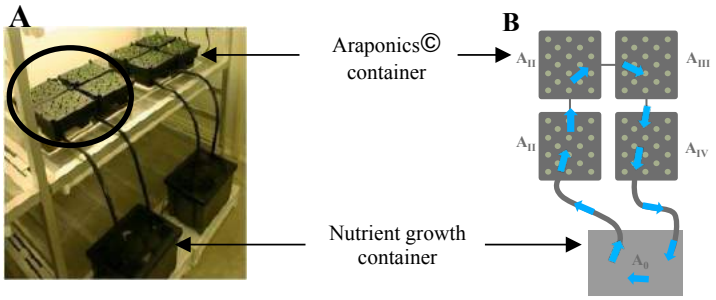


Figure 1. *Hydroponic system.*
(A) The material used for growing *Arabidopsis thaliana* plants is the Araponics© growing system (Araponics, SA Belgium) included a nutrient growth container of 15 L connected to four Araponics© containers for plant cultivation. **(B)** The Gibeaut medium (Gibeaut *et al*., 1997) circulated permanently between the Araponics© containers and the nutrient growth container in order to exposed all plants to the nutrient solution.

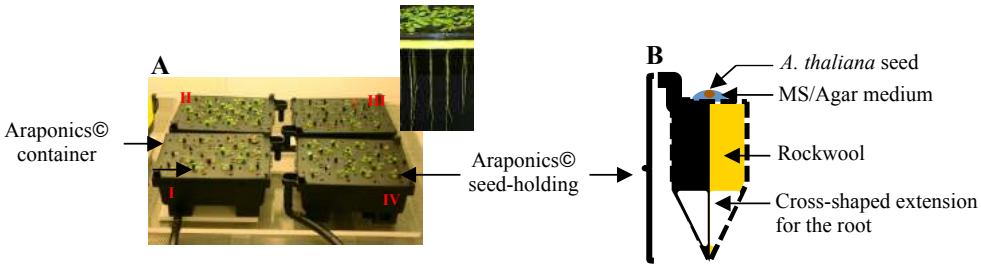


Figure 2. *Hydroponic device for growing A. thaliana plants*.
(A) A block culture is composed of four Araponics© containers associated and allowing the growing of 72 plantlets (18 x 4 Araponics© containers). The roots plunged into the nutrient solution whereas plant shoots grew on top of the container. **(B)** Seed-holder (18) allowing growth of individual plant. Rockwool pieces are placed on the upper of the seed-holder, seed is sowed on the top in a droplet of MS/Agar medium and the whole is placed in the Araponics© containers cover. The bottom of the seed-holder presents a cross-shaped extension allowing the root to be immersed in nutrient solution.

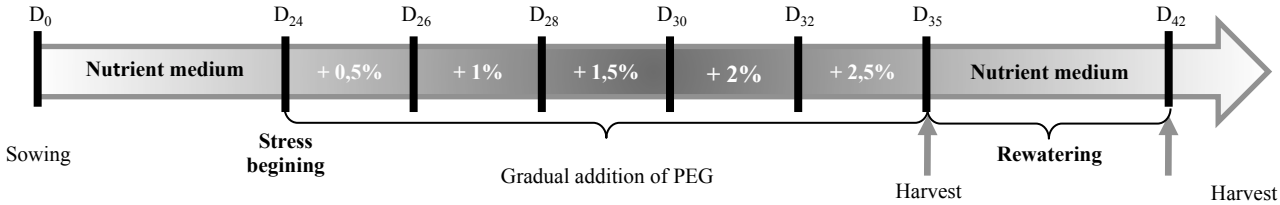


Figure 3. *Schematic representation of the osmotic stress protocol applied.*
After sowing, stressed plants grow in nutrient medium during 24 days. Osmotic stress is applied by gradual addition of polyethylene-glycol (+ 0,5% PEG) in nutrient medium every 2 days, since D+24 to D+32, until the medium reach 2,5% of PEG dose. During the rehydration phase starting at D+35, the entire PEG is removed and changed by fresh nutrient medium. Plants grown in only nutrient medium are used as control. In the end of the stress D+35 and after the rehydration phase D+42, control and stressed plants are harvested for further analyses.

RESULTS

Growth of Arabidopsis thaliana plant in the hydroponic system

The aim of our work was to measure different physiological, biochemical and molecular parameters on *Arabidopsis thaliana* roots. For this end, we used the hydroponic growth system (Araponics©) (Fig. 1), a convenient and versatile system. It is an easy system to use and to produce a large amount of plants (Gibeaut *et al.*, 1997) and all the root system is readily accessible (Siedlecka and Krupa, 2002) (Fig. 2). Growth conditions of hydroponically grown plants can be tightly controlled. Indeed, different parameters of the culture medium were followed during all the growth period of plant, to allow a better plant development (data not shown). The temperature measured in the nutrient growth container during the photoperiod was 20°C to 24°C during the day and 18°C during the night. As described by Gibeaut *et al.* (1997), a normal root growth development of *A. thaliana* plants can be observed when the temperature medium is comprise between 16°C and 25°C (Walter and Schurr, 2005). The nutrient medium was changed every week and the pH of the solution was followed during seven days. The pH of the fresh medium is 5.7 and increases around +0.2 and +0.7 pH unit after seven day depending on the age of plants. The alkalinisation of the rhizosphere is classically observed du to nitrate assimilation by roots (Stitt, 1999). Many studies on hydroponic plant culture recommend to work at pH between 5.5 and 6 pH units (Gibeaut *et al.*, 1997; Toda *et al.*, 1999). All the physical parameters measured here are in the range of values used for hydroponic grown plant and are very stable (Arteca and Arteca, 2000; Siedlecka and Krupa, 2002; Smeets *et al.*, 2008).

A – An insight in circadian clock regulation

Circadian clock expression pattern of specific AtSUCs and AtSWEETs genes in rosette and roots of A. thaliana

In order to identify the sucrose transporters genes expressed in rosette and roots, we examined the temporal pattern of *AtSUCs* and *AtSWEETs* genes expression in *A. thaliana* plants cultivated on hydroponic system (10h of light and 14h of dark). The expression study of the nine *AtSUCs* and seven *AtSWEETs* genes (clade III as they have been reported to transport sucrose) has been performed by RT-qPCR. Thirty-one old days plants were harvested every 4 hours over a 24 hours period (9h00, 13h00, 17h00, 21h00, 1h00, and 5h00). Rosette was composed of mature source leaves and young leaves considered as sink organs. On the contrary, at this development stage, roots were the only true sink organ on plants.

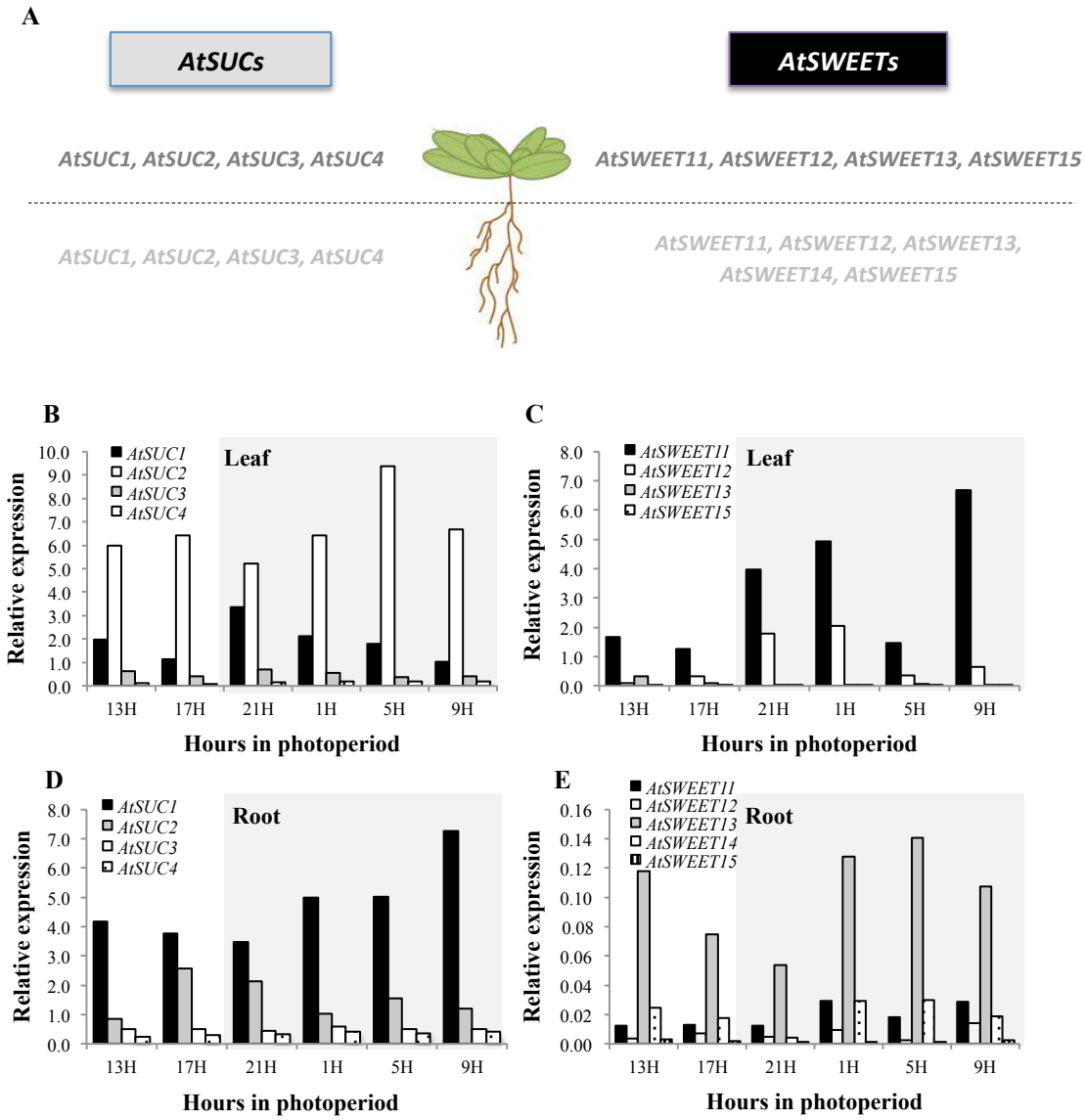


Figure 4. *Expression pattern of sucrose transporters and relative expression of specific AtSUCs and AtSWEETs genes in leaf and root during a 24-h cycle of 31 day-old A. thaliana plants developed in hydroponic system.*

Schematic representation of preferential *AtSUCs* and *AtSWEETs* gene expression in leaf and root **(A)**. Relative expression of four *AtSUCs*: *AtSUC1, 2, 3* and *4* in leaf **(B)** and root **(D)** has been analysed by RT-qPCR. Relative expression of four *AtSWEETs: AtSWEET 11, 12, 13* and *15* in leaf **(C)** and five *AtSWEETs: AtSWEET 11-15* in root **(E))** has also been analysed by RT-qPCR. Data are expressed as normalized expression (no unit) to the reference gene *At5g12240* expression level (Czechowski et *al.* 2005) and are the mean of measures obtained from the pool of five plants.

Among the nine *AtSUCs* genes studied, four of them: *AtSUC1*, *AtSUC2*, *AtSUC3* and *AtSUC4* were found expressed in rosette and roots. Concerning the *AtSWEETs* genes, four of them were expressed concurrently in rosette and roots: *AtSWEET11, AtSWEET12, AtSWEET13* and *AtSWEET15*, while *AtSWEET14* transcripts were specifically present in roots (Fig.4A). The relative expression measured in the rosette indicated that *AtSUC1* and *AtSUC2* genes were detected at a higher level than *AtSUC3* and *AtSUC4* (Fig.4B). For these two last genes, the pattern of expression remained similar and low during all the circadian cycle. The result indicated that *AtSUC2* gene was the most expressed *AtSUC* gene in the rosette (Table S2) and its diurnal level of expression was high and stable. After a slight decrease at the beginning of the night (21h00), its expression rose again during the night (21h-5h) to reach its maximum level at 5h00. The expression of *AtSUC1* in leaves was lower than that of *AtSUC2*. The results indicated that its level of transcripts remained stable during the circadian cycle with a slightly increase at the beginning of the night from 21h00 to 1h00 (Fig.4B).

In rosette, four *AtSWEETs* genes were expressed: *AtSWEET11-13* and *AtSWEET15*. During the diel cycle, the expression levels of both *AtSWEET13* and *AtSWEET15* were very low (Fig.4C). Even if the expression of *AtSWEET11* was higher than that of *AtSWEET12*, both genes presented a similar diel cycle pattern of expression. Their level of expression remained low and stable during the light period then increased during the first half of the dark period (21h00 and 1h00). During the second half of the dark period, the expression level of these genes showed a strong reduction followed by a surprising high increase at the next point time (9h00), where *AtSWEET11* presented its maximum expression (Fig. 4C).

In root, the expression pattern of both genes *AtSUC3* and *AtSUC4* remained stable and low while *AtSUC1* and *AtSUC2* were the most *AtSUC* expressed genes (Fig. 4D). Contrary to leaves, *AtSUC1* was more expressed than *AtSUC2* in the roots. Its expression was high during the light period and increased during the dark period to reach a maximum level at the end of the dark period (9h00). All the *AtSWEETs* genes detected in roots (*AtSWEET11-15*) were lesser expressed than in shoot (Fig. 4E).

Diurnal turnover of sugar content in rosette and roots of A. thaliana during 24h cycle

To evaluate the light/dark variation of C balance in rosette and root, the concentration of the three soluble sugars (sucrose, glucose and fructose) and starch was determined for each time point studied.

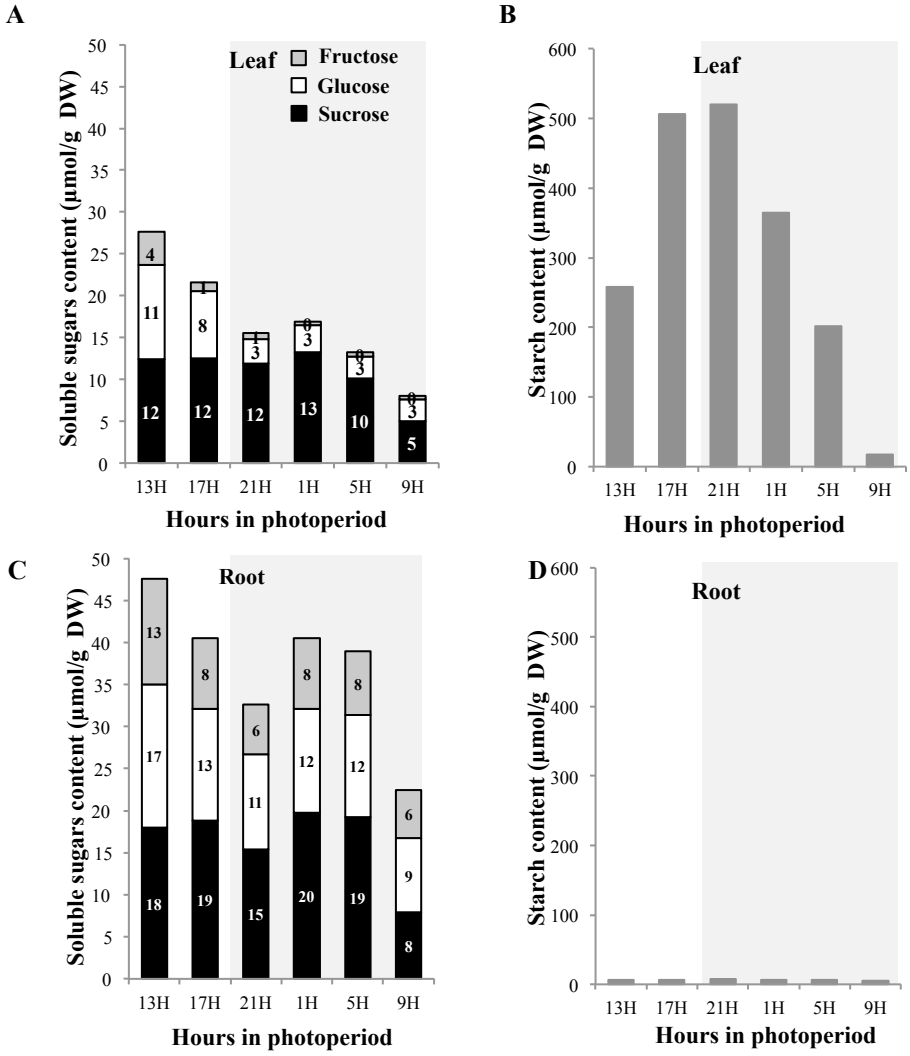


Figure 5. *Sugar content in leaf and root during a 24-h cycle of 31 day-old A. thaliana plants developed in hydroponic system.*

Sucrose (black), glucose (light grey) and fructose (white) content have been measured in leaf **(A)** and root **(C).** Measure of starch content has been performed in leaf **(B)** and root **(D)**. Data are expressed as the mean of three measures obtained from the pool of five plants.

In leaves, the total soluble sugars content was higher at 13h00 during the peak of the photosynthesis activity and decreased until the beginning of the dark period (21h00) (Fig. 5A). After, the amount of sugar remained stable until 5h00 and then presented their lowest level at the end of the dark period (9h00). Sucrose was the major soluble sugar accumulated in rosette and its amount remained unchanged between 13h00 and 5h00, but at the end of the dark period (9h00) a 2-fold decrease (10 μmol/gDW to 5 μmol/gDW) was noticed. The circadian variations of the total soluble sugars observed in leaves were due to hexoses, mainly glucose. Indeed, glucose is strongly accumulated in the middle of the photoperiod (13h00). Its amount started to decrease at the end of the light period (17h00) to reach a minimum level (11 μmol/gDW to 3 μmol/gDW) at the beginning of the dark period (21h00). Concerning starch, it was synthetized in leaves during the day to reach a maximum amount (520 μmol/gDW) early in the dark period (21h00). During the dark period, starch was continually degraded to reach a very low amount (17 μmol/gDW) at the end of this period, indicating that starch turn over was almost complete at this point (Fig. 5B).

In roots, sucrose level was stable from 13h00 until 5h00 and decreased at the end of the dark period (9h00) as already noticed in leaves. The total soluble sugars amount decreased from 13h00 to 21h00. This was due to a lower level of glucose (17 μmol/gDW to 11 μmol/gDW) and fructose (13 μmol/gDW to 6 μmol/gDW) in roots, while sucrose remained stable. During the dark period, total sugar level increased first then decreased to reach the lowest level measured during all the circadian cycle at the end of this period (Fig. 5C). Starch amount in roots was very low (around 6-7 μmol/gDW) compared to the one in leaves and did not show noticeable variation during the circadian cycle (Fig. 5D). In the hydroponic plant, a very slight starch amount was detected in root (Fig. 5D), since *A. thaliana* root is not a storage organ (Streb and Zeeman, 2012).

B - Source/sink C partitioning during *Arabidopsis thaliana* development

Plant growth during a complete cycle of development in hydroponic system

The hydroponic culture system used in this experimentation allowed the full development of *A. thaliana* (Col-0) plants from germination to seed harvest. In this experiment, six main stages of development were studied after sowing (D=0): young stage (Y; D+31), adult stage (A; D+48), inflorescence emergence stage (IE; D+60), flowering stage (F; D+70), silique ripening (SR; D+98) and silique harvest (SH; D+125). The three first stages corresponded to the vegetative phase while the others represented the reproductive

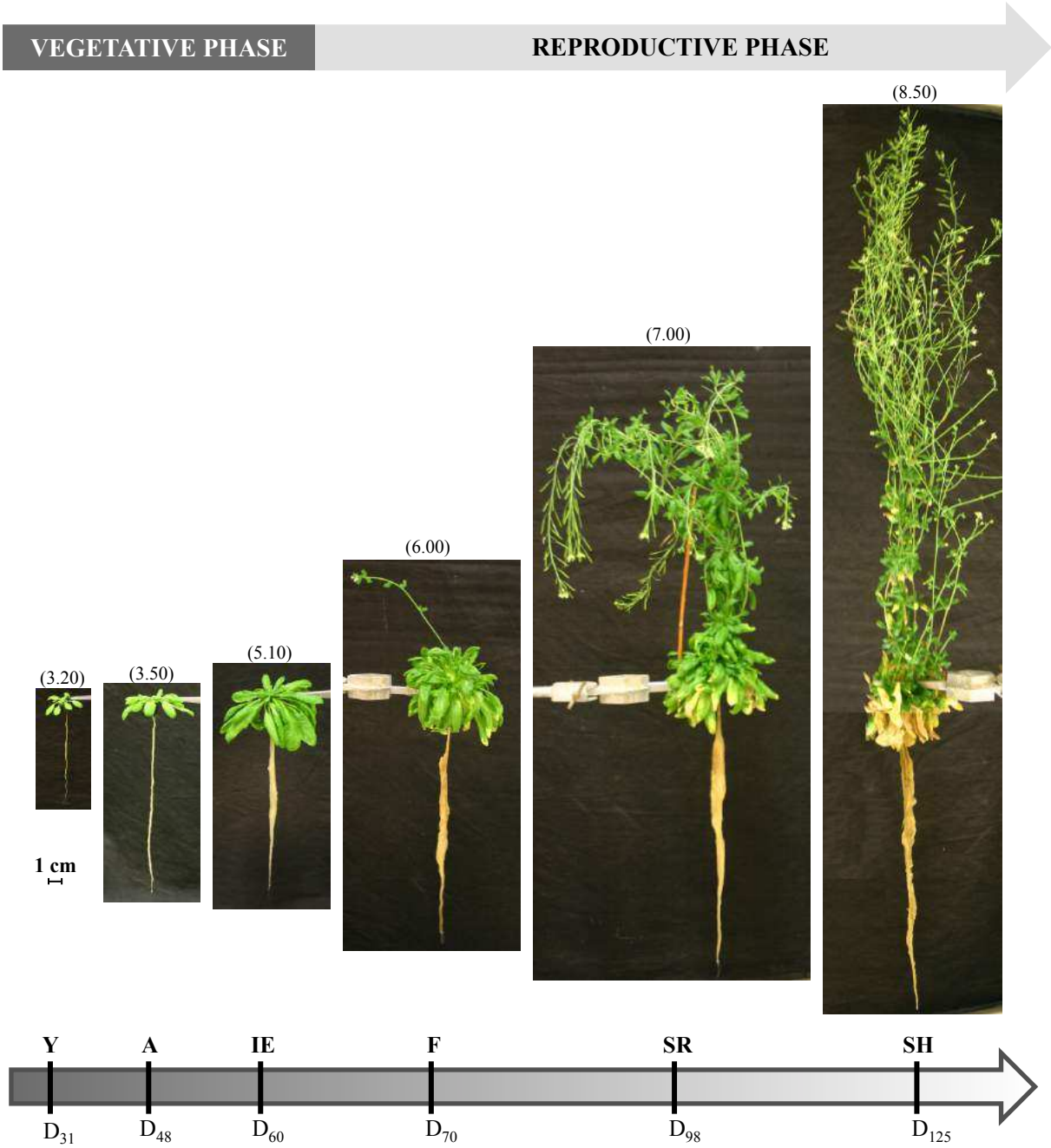


Figure 6. *Photographs of six principal growth stages of the ecotype 'Columbia' of A. thaliana plant developed in the hydroponic system.*

(Y) young stage, D+31 after sowing; (A) adult stage, D+48 after sowing; (IE) inflorescence stage, D+60 after sowing; (F) flowering stage, D+70 after sowing; (SR) silique ripening, D+98 after sowing and (SH) silique harvest, D+125 after sowing. The different stages were defined as described in Boyes *et al*. (2001) and indicated on the top of each photograph. (Y), (A) and (IE) corresponding to the vegetative phase of *A. thaliana* plant development. (F), (SR) and (RH) corresponding to the reproductive phase of *A. thaliana* plant development.

phase (Fig.6). The transition between these two phases appeared at the inflorescence stage (D+60). Plants at the young stage (Y) were the same as those tested for the circadian experiment.

For each stage of development, the growth of rosette (photosynthetic source organ), root (sink organ) and stem (if present, sink organ with flowers and seeds) was estimated by the measurement of organ dry weight (DW) (Table 1). Roots and rosette DW increased up to D+70 (Flowering stage). Then roots DW increased more slowly while rosette DW tended to level off. From this stage, stem DW increased dramatically to become the biggest organ at seed harvest, D+115, (Table 1). The shoot (rosette plus inflorescence) to the root ratio increased since the Y to the SH stages of development with a greatest rise up at D+70, corresponding to the inflorescence growth on stem (Table 1).

The relative proportion of each organ was calculated from their DW (Fig.7). Up to the (IE) stage, the biomass distribution between rosette (84-86%) and roots (16-14%) was stable. At (F) stage, when inflorescences grew, the rosette contribution decreased to 76% while the root contribution remained stable at 12%. At this stage, roots and stems each accounted for 12% of the total plant weight. For the two last stages (SR, SH), the stem part in the total weight increase to become the biggest organ of the plant (64% of the plant DW). Conversely, rosette biomass part contributed less and less in the total weight of the plant. Concerning the roots, their proportion declined at the (SR) stage but remained stable at the (SH) (Fig.7).

Soluble sugars and starch accumulation in rosette, root, stem and silique during A. thaliana development

The amount of the three major soluble sugars and starch was determined in rosette, roots, stems and siliques at the six stages previously described. For the following experiments plants were collected at 13h00, when total sugar amount was highest in source leaves.

In rosette, total soluble sugars increased from (Y) stage to (SR) stage then decreased at the last stage (Fig.8A). Glucose accumulated gradually between (Y) and (SR) stages, with a strong increase at the (F) stage corresponding to the appearance of a new sink organ (stem). At the last stage (SH) where seeds were fully filled, glucose level dramatically decreased. Glucose was the major soluble sugar, except at the (Y) stage. Fructose also accumulated in rosette but to a lesser extent and decreased at the last stage. Sucrose level presented less variation in leaves during plant development. (Fig. 8A) Starch decreased continually during plant development (Fig. 8B).

Tableau 1. *Growth of A. thaliana (cv Columbia) in hydroponic system.*
Dry weight (DW) measurements on root, rosette and stem at six principal growth stages of plant grown in Gibeaut medium, (Gibeaut *et al*., 1997) under a 10h/14h day/night photoperiod (at 80 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$), a 70%/50% day/night RH and a 23°C/18°C day/night temperature. Shoot/Root ratio calculated from DW of the same samples. Data are expressed as the mean ± SE of seven to eight individual plants from two separated experimentations. (-) organ not present.

	Plant stage development					
	Young	**Adult**	**Inflorescence emergence**	**Flowering**	**Silique ripening**	**Seed harvest**
Root DW (mg)	4,1 (0,3)	41,4 (3,6)	108,9 (8,6)	205,4 (23,1)	219 (26,4)	376,6 (24)
Rosette DW (mg)	22,2 (1,7)	232,6 (17,1)	693,7 (61)	1274,6 (97,6)	1511,3 (200,8)	1626,6 (146,4)
Stem DW (mg)	-	-	2,3 (0,5)	193,9 (44,9)	1008,7 (93)	3515,1 (742,4)
Shoot:Root DW	5,5 (0,4)	5,7 (0,2)	6,4 (0,2)	7,3 (0,3)	12 (0,8)	13,3 (1,3)

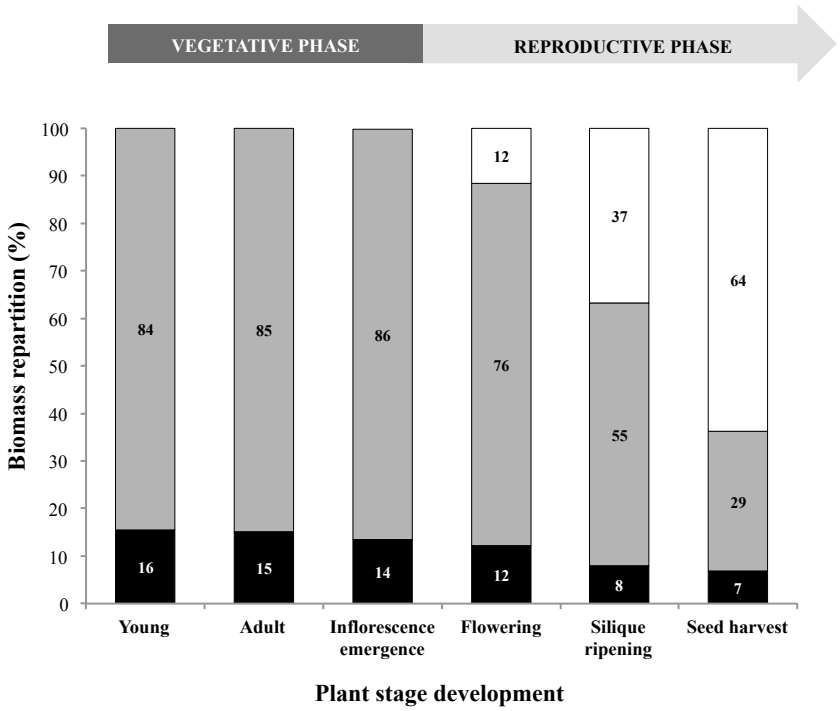


Figure 7. *Biomass repartition in different organs of plants for six principal growth stages of A. thaliana developed in hydroponic system.*
Three organs have been considered: root (black), rosette (grey) and stem (white). The percentage of biomass has been calculated from the mean of dry weight of seven to eight individual plants from two separated experimentations. A biomass part of 100 % corresponding to the sum of all organs dry weights at the developmental stage considered.

In roots, sucrose was the major sugar and its level remained high and stable in this sink organ, with a slight increase at the reproductive phase. Fructose, as glucose, showed its highest level during the two first stages of development studied (Y and A) but decreased after and remained stable (Fig. 8C).

In stems, sugars were measured from the (F) stage to the (SR) stage. At the (F) stage, the stem was very short (Fig.6) and can be considered as a full sink organ. The soluble sugars level was low, but at the (SR) stage corresponding to the filling of the seeds, it increased, especially due to the glucose. This glucose amount was the highest found in the four organs studied during plant development. Our result also indicated a steady increase of fructose level in stem between (F) and (SH) stage. At the last stage studied (SH) where the seeds are fully filled, the sucrose level dramatically decreased and the glucose amount was half of that observed at the (SR) stage. The starch content slightly decreased in stem until the (SH) stage, but remained high (Fig. 8F).

In siliques, the last sink organ to develop on plant, the soluble sugar content was important at both stages studied (SR and SH). At the (SR) stage, it was noteworthy that sucrose and glucose content were similar (Fig. 8G). Concerning starch, its content was very high in siliques and even with a slight decrease at the (SH) stage its level remained high (Fig. 8H).

Study of [U-^{14}C] sucrose transport during A. thaliana development

In order to know more about C allocation among the different organs we have measured quantitatively the distribution of [U-^{14}C] sucrose fed to one source leaf. The pattern of ^{14}C allocation was obtained after 5 hours of transport, at each development stages studied. The data present (in %) the export of [U-^{14}C] sucrose from one mature leaf and to the rosette (sink leaves), roots, stems (if present) and external medium bathing the roots.

At the (Y) stage, ^{14}C was measured in rosette (62.7%), in roots (17.5%) and in the external medium (19.8%) (Fig.9). ^{14}C found in the external medium was considered as carbon which has passed through the roots and excreted into the medium. So, the total carbon translocated to the root is the sum of the amount radioactivity found in roots and external medium: for the (Y) stage this value was 37.3%. At the (A) stage, ^{14}C amount decreased in rosette (46.4%) for the benefit of roots (34.3%) and remained stable in the external medium (19.3%). Therefore, the ^{14}C translocated to roots corresponded to 53.6% of the total, meaning that at this stage the C allocation was equal between rosette and roots. At the (IE) stage, ^{14}C

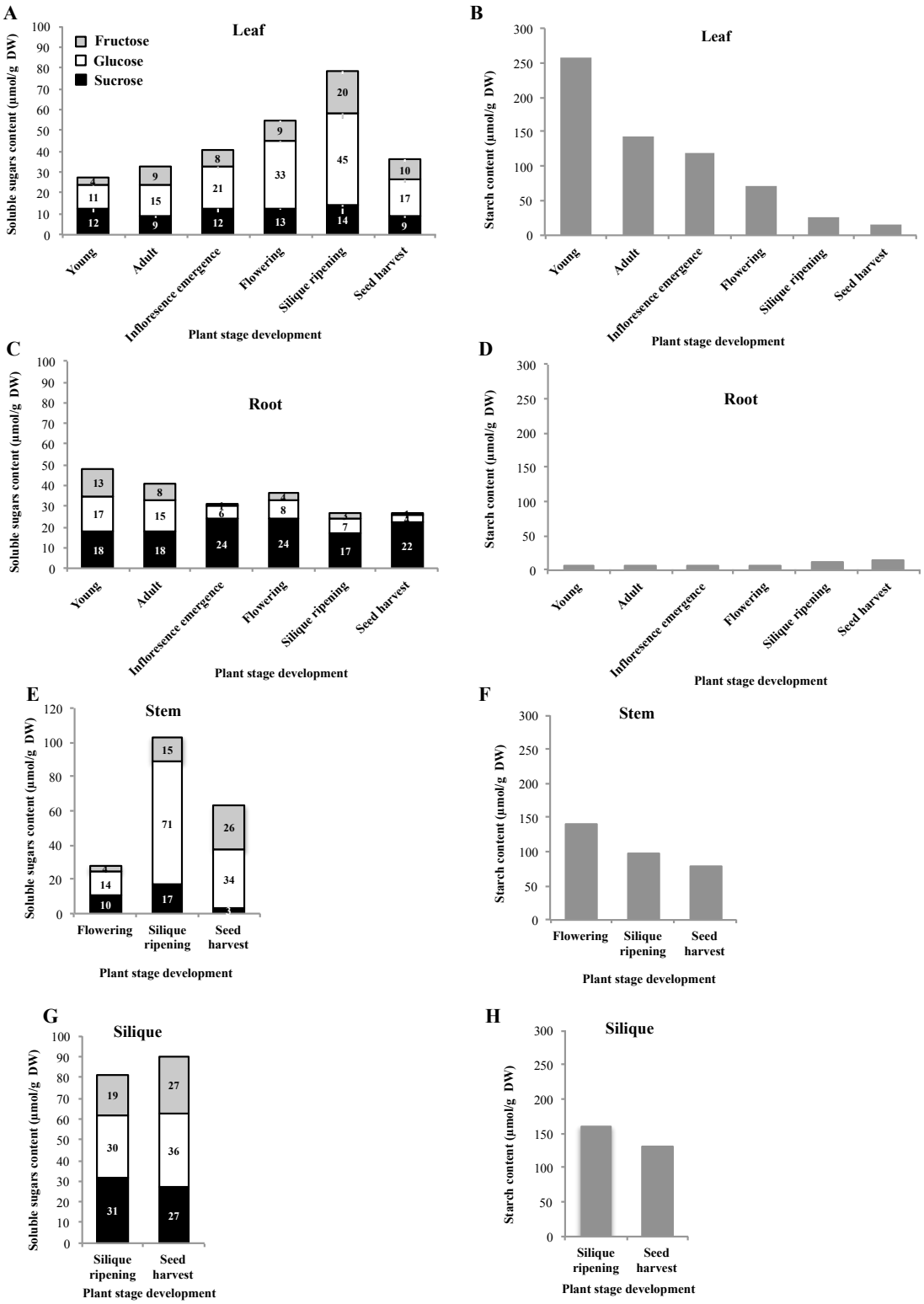


Figure 8. *Sugar content in different organs of plants for six principal growth stages of A. thaliana developed in hydroponic system.*
Sucrose (black), glucose (light grey) and fructose (white) contents measured on leaf **(A),** root **(C),** stem **(E)** and silique **(G).** Starch content measured on leaf **(B),** root **(D),** stem **(F)** and silique **(H).** Data are expressed as the mean of three measures obtained from the pool of five plants.

repartition between rosette and root turned back as at the (Y) stage but a strong ^{14}C decreased is noticed in the external medium (4.1%).

During the reproductive phase, the amount of ^{14}C in roots decreased drastically at the last three stages of development studied (F, SR and SH), respectively (6.5%, 22.3% and 11.9%), as in external medium respectively (1.8%, 2% and 0.9%). These results indicated that less part of labelled carbon has been exported from the source leaf to the roots. Indeed, at the reproductive phase, a new sink organ has appeared: stem so carbon translocation was preferentially routed to the stem than to the roots. Indeed, from the (F) stage ^{14}C measured in stem was significant (33.4%) and increased (38.8%) at the (SR) stage highlighting C translocation from the source leaf to flowers and maturing fruits present on stems. Conversely, in rosette, ^{14}C was high (58.4%) at (F) stage and decreased (37.8%) at the (SR) stage. At the last stage (SH), less ^{14}C was exported to stem (23.3%) and was preferentially allocated to rosette (63,9%)(Fig.9).

Identification of sucrose transporters genes expressed in rosette, roots, stem and siliques during A. thaliana development

After determining circadian regulated expression of the main sucrose transporters (*SUCs* and *SWEETs*) genes in rosette and roots, the same approach was followed to identify those genes expressed in rosette, roots, stem and silique during the hydroponic development of *A. thaliana*. The expression of nine *AtSUCs* and seven *AtSWEETs* (clade III) genes was studied by RT-PCR for the 6 development stages described before. The data set corresponded of presence (+) or absence (-) of amplification after 40 cycles of PCR (Table 2).

In the circadian experiment, four *AtSUCs* genes *(AtSUC1-4)* were found expressed in young rosette and roots (Fig.4B and D) and the results in Table 2 confirmed that all of them were expressed in both organs whatever the development stages (Fig. 10A). In stem, the same pattern of expression was observed for these 4 genes with the additional expression of *AtSUC5* and *AtSUC9* (Table 2, Fig. 10A). In siliques, the same sucrose transporters genes than those observed in stem were detected, except *AtSUC9*, (Table 2, Fig. 10A).

Concerning the *AtSWEETs* genes, five of them, *AtSWEET11-15* were expressed in roots during the circadian experiment (Fig.4E). The same pattern of expression was observed for the four first development stages (Y, A, IE and F) studied (Table 2, Fig. 10A). For the two last development stages (SR and SH), the expression of *AtSWEET11* gene was not detected in roots anymore. *AtSWEET9* and *AtSWEET10* expression was not found in roots at any stage of

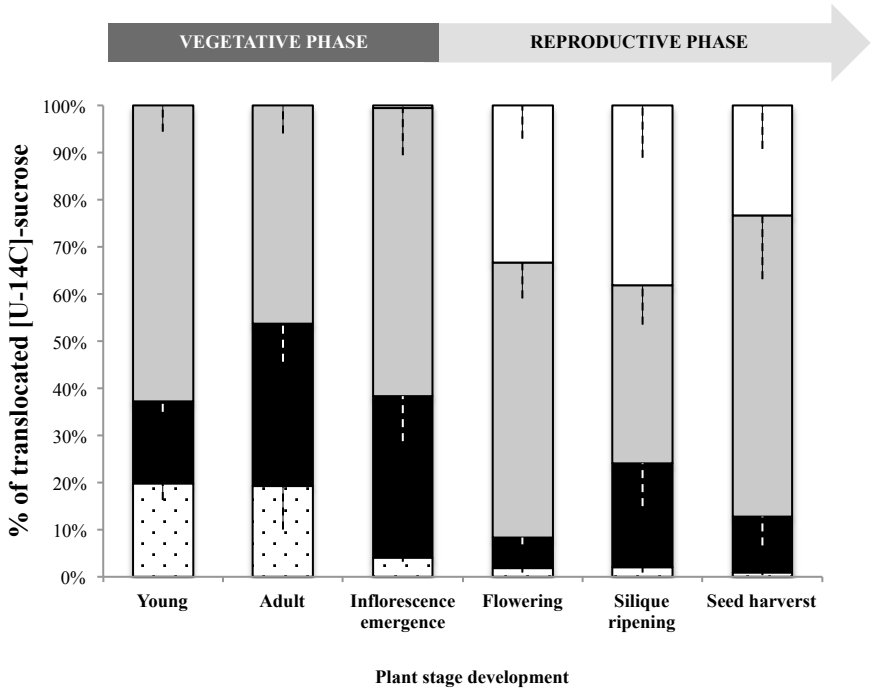


Figure 9. *[U-^{14}C] sucrose partitioning (%) from a mature leaf of A. thaliana (Col 0) plants to root, stem (if present) and external medium.*

For each development stage studied, plants were fed with ^{14}C sucrose drop off on a crimped mature leaf. After 5 hours of transport, the radiolabelled was counted in the rosette, roots and external medium and the distribution of radioactivity calculated among the three compartments. Each result is the mean ± SE of measures obtained from three to eight individual plants from two separated experimentations.

development (Table 2). In rosette, the data indicated that four *AtSWEET* genes were expressed, *AtSWEET11-13* and *AtSWEET15,* for all the development stages. These genes are the same that were detected during the circadian experiment (Fig.4C).

In stem, the expression of all *AtSWEET* genes was detected at the SR and SH development stages, while at F stage, *AtSWEET9* expression was not found. In siliques, the expression of all the *AtSWEET* genes was detected except for *AtSWEET9* at the SR stage (Table 2).

Evolution of the expression pattern of specific AtSUCs and AtSWEETs genes in rosette, roots, stem and siliques during A. thaliana development

To get more information about *AtSUCs* and *AtSWEETs* genes regulation during *A. thaliana* development, only genes detected by PCR (Table 2) were analysed by RT-qPCR. Fold change values (Fig.10 and Table S2) were obtained by comparison with the adult stage (A) for rosette and roots, with the flowering stage (F) for stems and finally, ripening stage (SR) for siliques. In parallel of the sucrose transporters genes expression, we have also followed the expression of two main genes implicated in photosynthesis (*AtRBCS* and *AtCAB1)* and one gene involved in leaves senescence *AtSAG12,* in order to estimate the physiologic status of leaves during our experiment.

Among the four *AtSUCs* genes (*AtSUC1-4*) expressed in rosette (Fig. 10A), only *AtSUC1* displayed a variation of transcripts level with a higher expression observed at the flowering stage. Both *AtSUC2* and *AtSUC3* appeared slightly more expressed during the young stage (Y) than in the five others stages. *AtSUC4* displayed the same expression level at all stages.

Concerning *AtSWEETs* genes, 3 of them, *AtSWEET11, AtSWEET12* and *AtSWEET15* presented a similar level of expression with an increase at the 2 last stages of development. *AtSWEET13* presented the same level of expression at the six stages of development (Fig. 10B and Table S2). The measurement of the *AtRBCS* and *AtCAB1* expression in leaves indicated that the level of those both transcripts decreased from the (IE) stage until the end of the plant development (Fig. 10F and Table S3). For the senescence marker gene *AtSAG12*, its expression presented strong increase at the two last stages of development (SR and SH) (Fig. 10F and Table S3).

In roots (Fig. 10B and Table S2), only *AtSUC2* presented a noticeable variation of expression with an increase during the two last stages. *AtSUC1* is the more expressed sucrose

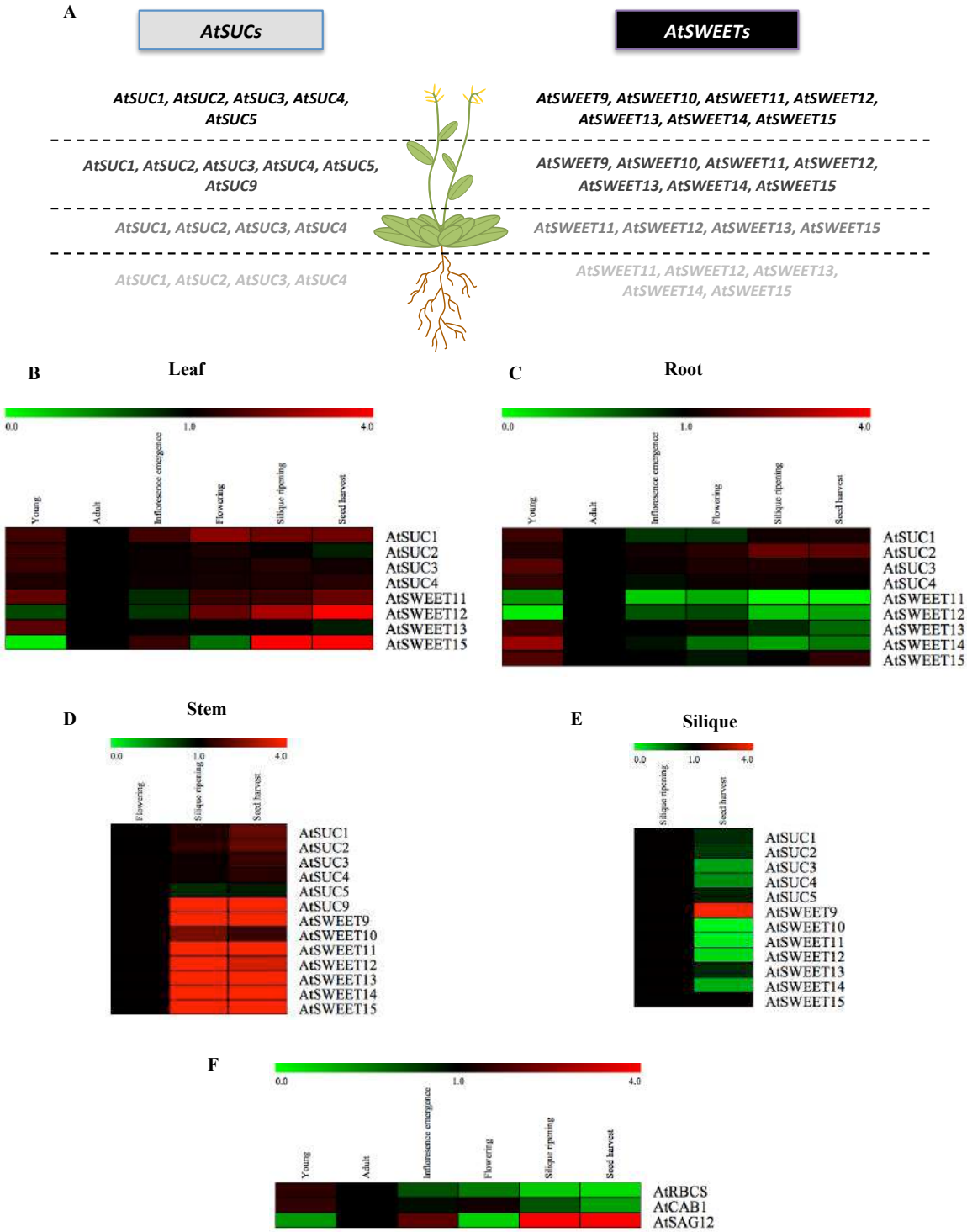


Figure 10. *Evolution of fold change expression of specific AtSUCs and AtSWEETs genes in different organs of plants for six principal growth stages of A. thaliana developed in hydroponic system.*

Fold change of expressed *AtSUCs* and *AtSWEETs* genes in rosette (**A**), root (**B**), stem (**C**) and silique (**D**) has been studied. Fold change of expressed *AtRBCs, AtCAB1* and *AtSAG12* genes in rosette **(F)** Fold change values are displayed in a two colours heat-map view, which rows correspond to the genes of interest and columns to the 6 development stages performed with MeVsoftware (http://www.tm4.org/mev.html). Fold change values are obtained by comparison with the adult stage after normalization to the reference gene *At5g12240*, (Czechowski *et al.* 2005). Data are the mean of measures obtained from the pool of five plants.

transporter gene in root and displayed a high and stable expression with only a slight decrease at the (IE) and (F) stages. All five *AtSWEETs* genes present in roots (*AtSWEET11-15,* Fig. 10A) showed a weak transcript level except during the Y stage, where *AtSWEET13-15* were detected at a higher level than at the A stage (Fig.10B and Table S2).

In stems, six *AtSUCs* (*AtSUC1-5* and *AtSUC9*) genes were expressed and an increasing expression of *AtSUC1* and *AtSUC2* could be noticed at the three last stages of development (F), (SR) and (SH) (Fig. 10C and Table S2). The results indicated that *AtSUC9* started to be expressed at in stems at the 2 last stages (SR) and (SH).

Among the 7 *AtSWEETs* genes expressed (Fig. 10A), five of them (*AtSWEET11-15)* presented an increasing pattern of expression at the three stages studied, while transcripts level of *AtSWEET10* decreased at (SH) and *AtSWEET9* started to be expressed at (SR) (Fig.10C and Table S2).

In siliques, five *AtSUCs* genes *(AtSUC1-5*, Fig. 10A) were expressed and it was noteworthy to observe that *AtSUC2* displayed the higher level of expression among all the organs studied Our results indicated also a high level of expression of *AtSUC1*, *AtSUC3* and *AtSUC5* at (SR), while their expression dropped at (SH) (Fig.10D and Table S2),

Among the seven *AtSWEETs* genes studied (Fig. 10A), six of them (*AtSWEET10-15*) presented a higher level of expression at (SR) compared to (SH). The expression of *AtSWEET9* was only observed at the last stage (Fig.9D and Table S2).

C - Impact of an osmotic stress to source/sink C allocation

Impact of osmotic stress/rewatering scenario on phenotype and water status of sink/source organs

As water deficit is known to alter plant physiology and carbohydrates redistribution between source and sink organs, the impact of an osmotic stress was studied on hydroponically grown *A. thaliana*. The study was performed on plants at the (A) stage while one source (rosette) and one sink (root) were present Fig. 6). In order to mimic a water stress on hydroponically-grown plants, osmotic stress was applied by gradual addition of PEG 6000 in growth medium, starting 24 days after sowing (Fig. 3). After 11 days of osmotic stress (2,5 % final PEG), growth medium was substituted by medium without PEG, allowing a rewatering phase for the next 7 days. Plants were sampled at the end of the osmotic stress and rewatering periods. The impact of osmotic stress on plants was estimated by analysing some physiological and growth parameters.

Table 3. *Impact of osmotic stress and rewatering on a set of physiological, growth and parameters.*

The measurements (except growth rates) have been performed 11 days after the onset of osmotic stress (D+35) and 7 days after the beginning of rewatering (D+42). Growth rate, leaf growth rate and root growth rate have been calculated during the osmotic stress phase (D+24 to D+35) and the rewatering phase (D+35 to D+42). Rosette DW was obtained from 31 (D+24) and 26 plants (D+35 and D+42) per condition control (C) and stressed (St) plants from three experimentations. Root DW was obtained from 11 (D+24), 16 (D+35) and 20 plants (D+42) per condition (C and St) from three experimentations. The projected leaf area (PLA) was determined using picture of plants from three experimentations, with the threshold color plugin of ImageJ software. 120 plants per condition (C and St) were used for D+24 and D+35, and 70 for D+42. Water content was determined with 15 whole rosettes per condition from three experimentations. Osmotic potential was measured on 3 to 5 excised leaves per plant and for 15 plants from three experimentations.

Parameter	Unit	Treatment			
		Osmotic stress phase		Rewatering phase	
		Control (C)	Stressed (St)	Control (C)	Stressed (St)
Projected leaf area	cm^2	46.3 (11.6)	26.8 (7.8)	81.1 (20.1)	44.4 (17.1)
Leaf expansion rate	$cm^2.d^{-1}$	3.1	1.4	5	2.5
Rosette dry weight	mg	132 (32)	106 (34)	302 (88)	175 (52)
Rosette growth rate	$mg.d^{-1}$	10.3	7.9	24.4	9.9
Root dry weight	mg	25.6 (1.6)	23.1 (7)	53.9 (8.9)	33.2 (14)
Root growth rate	$mg.d^{-1}$	2	1.7	4	1.5
Shoot:Root ratio DW	mg shoot . mg^{-1} root	5.1	4.6	5.6	5.3
Water content	g water . g^{-1} fresh weight	0.92 (0)	0.89 (0.02)	0.92 (0)	0.91 (0.01)
Leaf osmotic potential	MPa	-0.88 (0.06)	-1.33 (0.48)	-0.9 (0.11)	-0.92 (0.12)

Osmotic stress effect was visible on rosette as the projected leaf area was smaller in stressed plants (26.8 cm^2) than in control plants (46.3 cm^2) (Table 3). This result was supported by the determination of the leaf expansion rate at the end of the stress period, which was reduced 2.2 fold in stressed plants (1.4 $cm^2.d^{-1}$) compared to control plants (3.1 $cm^2.d^{-1}$). After one week of rewatering, leaf expansion rate of stressed plants increased 1.8 fold compared to stressed plants harvested before rewatering. This highlighted that rosette growth resumed during rewatering, as projected leaf area increased from 26.8 cm^2 to 44.4 cm^2. Concomitantly, rosette weight was reduced after 10 days of osmotic stress (106 mg) compared to control plant (132 mg) corresponding to a leaf biomass reduction of 23.3 %. Root weight was also reduced after osmotic stress (1.7 mg) compared to control roots (2 mg) ie root biomass reduction of 15%. The shoot to root ratio was slightly lower in stressed plants (4.6) compared to the control plants (5.1) indicating that rosette growth was slightly more impacted by osmotic stress than root growth. After rewatering, the rosette biomass of stressed plants increased about 25% compared to plants at the end of stress. This result together with the increased leaf expansion rate, illustrated a physiological recovery of stressed rosettes. Surprisingly, for stressed roots, after one week of rewatering, growth rate was still decreasing (-11.8%) compared to plants at the end of stress (-15%) probably du to the loss of root integrity because of their direct contact with the PEG solution. As a result, the shoot to root ratio of stressed plants increased after one week of rewatering (5.3) compared to plants at the end of stress (4.6) to reach values similar to those of control plants (5.1 for C_{st}; 5.6 for C_{rew}) (Table 3).

In order to estimate the water status of plants, water content and osmotic potential were determined in rosettes. During osmotic stress, water content declined in stressed rosettes (0.89) compared to control ones (0.92) but returned to control level after one week of rewatering (0.91). Rosette osmotic potential was also lower in stressed plants (Ψ_{leaf} = -1.33 MPa) than in control plants (Ψ_{leaf}= -0.88 MPa). After rewatering, the osmotic potential in stressed plants was similar to the one of control plants (-0.92 and -0,90 MPa respectively). These results (WC and Ψ_{leaf}) indicated the complete recovery of hydric status in stressed plants after one week of rewareting (Table 3).

Modification of soluble sugars and starch profiles in rosettes and roots after an osmotic/rewatering scenario

The analysis of soluble sugars and starch content in rosette and roots was performed.

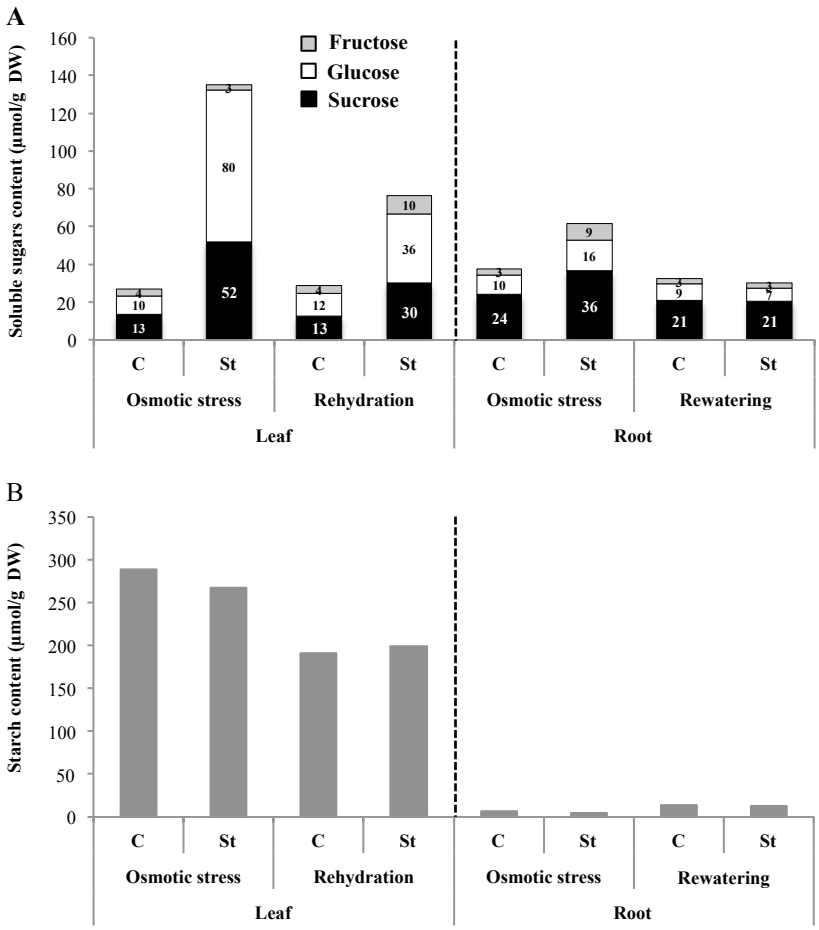


Figure 11. *Impact of osmotic stress and rewatering on sugar and starch contents of rosette and root of plants developed in hydroponic system.*
Sucrose (black), glucose (light grey) and fructose (white) and starch contents measure on leaf **(A)** and root **(B)** after osmotic stress and rehydration phase. Data are expressed as the mean of three measures obtained from the pool of five plants.

In rosettes, a dramatic increase (around 4 fold) of total soluble sugars content was observed at the end of osmotic stress (Fig.11A). This increase was mainly due to sucrose and glucose, 4-fold and 7-fold respectively. After rewatering, soluble sugars content decreased in stressed rosettes but remained still higher than in control rosettes (glucose, 3-fold; sucrose, 2.3-fold; fructose, 2.5 fold) (Fig.11A).

In roots, sugars content increased also after the stress period, but to a lesser extent than in rosettes. This increase was due to a higher level of the three soluble sugars. Indeed sucrose, glucose and fructose concentration rose respectively about 1.5, 1.6 and 3 times. After rewatering, the amount of the three sugars recovered its control level (Fig 11A).

Surprisingly, the amount of starch did not seem impacted by the osmotic stress, as its concentration was the same in stressed (267 μmol/gDW) and control (288 μmol/gDW) rosettes (Fig.11B). In roots, starch content remained very low in any conditions.

During the rewatering phase, even if starch content decreased in both stressed and control rosettes, starch content was closed in stressed (198 μmol/gDW) and control rosettes (191 μmol/gDW) (Fig. 11B).

Study of [U-^{14}C] sucrose transport during an osmotic/rewatering scenario in rosette and roots of A. thaliana

C allocation in rosette and root was estimated after an osmotic stress followed by a rewatering phase of one week. We have measured quantitatively the distribution of [U-^{14}C] sucrose fed to one source leaf. The pattern of ^{14}C allocation was obtained after 5 hours of transport, for each condition studied. The data present the export of [U-^{14}C] sucrose (in DPM, Fig. 12A and in %, Fig. 12B) from one mature leaf and to the rosette (sink leaves), roots and external medium bathing the roots. Our data indicated that less ^{14}C was present in whole stressed plants (St: 19037 DPM) compared to the control plants (C: 33109 DPM) (Fig. 12A). ^{14}C found in the external medium was considered as carbon, which has passed through the roots and excreted to the medium. So, the total carbon translocated to the root is the sum of the radioactivity amount found in roots and external medium. The decrease of C transported in stressed plants reflected a lower level of C exported to the both organs rosette and root (Fig. 12A). Even if less ^{14}C was translocated into stressed plants, the sucrose repartition remained stable in stressed and control plants (Fig. 12B). After one week of rewatering, St plants displayed a higher amount of ^{14}C transported (53500 DPM) compared to C plants (29713 DPM) (Fig. 12A). The sucrose repartition in the different compartments studied

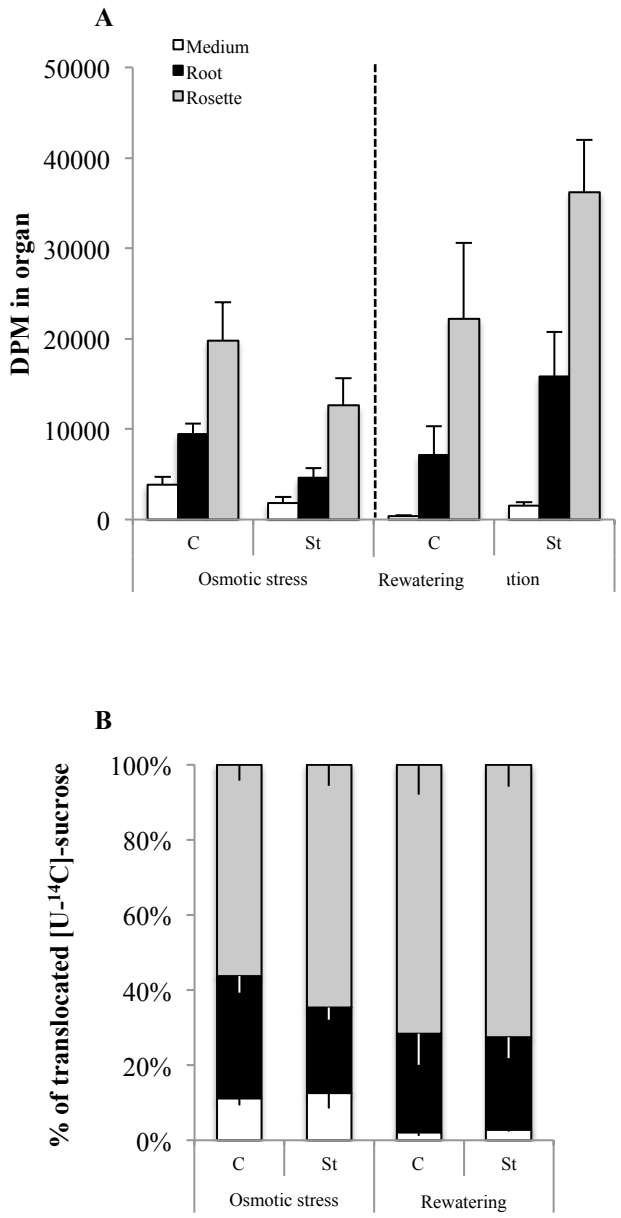


Figure 12. *[U-^{14}C] sucrose partitioning from a mature leaf A. thaliana (Col 0) plants to root, and external medium under osmotic stress and rewatering.*

For each development stage studied, plants were fed with ^{14}C sucrose drop off on a crimped mature leaf. After 5 hours of transport, the radiolabelled was counted in the rosette, roots and external medium and the distribution of radioactivity calculated among the three compartments. Each result is the mean ± SE of measures obtained from seven to ten individual plants from three separated experimentations.

indicated then, as after the stress phase, ^{14}C ratio transported in rosette, root and external medium in St (28%, 25% and 73% respectively) and C plants (22%, 26% and 72%) was the same after a rewatering phase (Fig. 12B).

Variation of AtSUC and AtSWEET genes expression during an osmotic/rewatering scenario in rosette and roots of A. thaliana

The results of RT-qPCR experiments were expressed as the Log2 relative expression ($\Delta Ct^{St}/\Delta Ct^{C}$). After 10 days of osmotic stress, the expression of *AtSUC2*, *AtSUC3*, *AtSUC4* and *AtSWEET11* was not modified in rosettes, while *AtSUC1* was slightly repressed (Fig.13A). On the opposite, 3 sucrose transporters, *AtSWEET12*, *AtSWEET13* and *AtSWEET15* displayed a higher expression level in stressed compared to control rosettes and exhibited a strong expression after rewatering. (Fig.13A). The expression of the *AtRD29* gene, an specific osmotic stress marker in rosettes, indicated that *AtRD29* transcripts level increased after the stress as noticed by Chen *et al.* (2005) and (Xiong *et al.*, 2006b) and then returned close to control rosettes after the period of rewatering (Fig.13B). The expression of *AtSAG12*, a senescence marker gene (Gan and Amasino, 1995) increased during the osmotic phase and decreased but remained high after rewatering (Fig.13 B).

In roots, *AtSUC3*, *AtSUC4,* genes showed the same level of expression after the stress and rewatering phases. The expression of *AtSUC1, AtSUC2, AtSWEET11, AtSWEET1 AtSWEET13* and *AtSWEET15* was repressed (Fig.13C). *AtSUC1, AtSWEET13* and *AtSWEET15*, the more repressed gene during osmotic phase, displayed a higher level of transcripts after the rewatering phase. Surprisingly, *AtSWEET11* and *AtSWEET12* expression appeared to be induced after rewatering (Fig.13C). The osmotic stress was estimated in roots by following the expression of *AtTIP1.2* gene, which is known as a specific osmotic stress marker in roots (Alexandersson *et al.*, 2005b; Boursiac *et al.*, 2005a) and was found repressed in stressed root. After rewatering, the transcripts level of *AtTIP1.2* was slightly induced (Fig.13D).

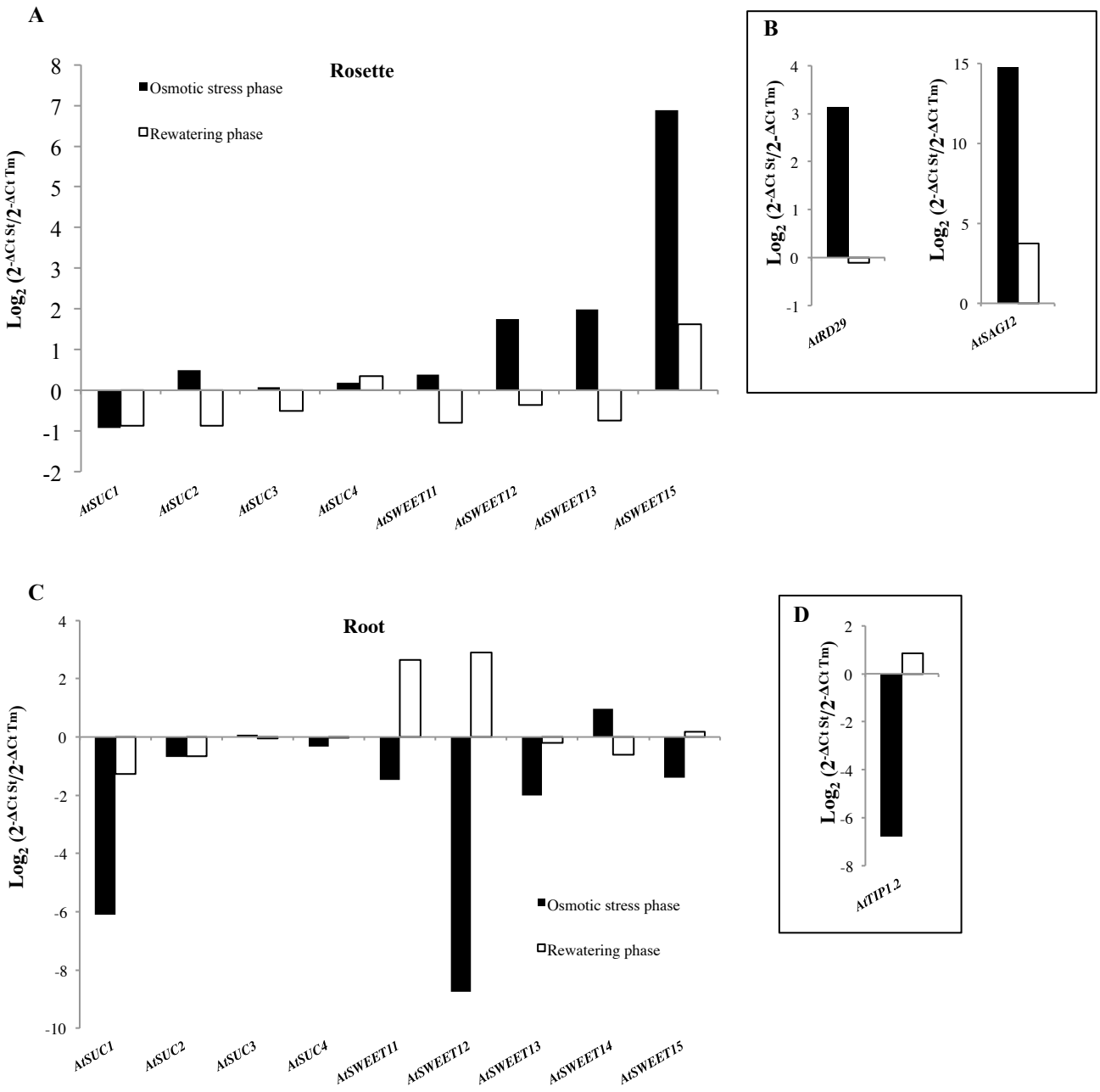


Figure 13. *Impact of osmostic stress and rewatering on log_2 relative expression (St/C) of specific AtSUCs and AtSWEETs genes in leaf and root of plants developed in hydroponic system.*
SUCs and *SWEETs* transcripts level were quantified by RT-qPCR in rosette **(A)** and in root **(C)** after osmotic stress (black) or rewatering (white). Values in each graph represent the log2 relative expression St/C measured by RT-qPCR using *At5g12240* Czechowski *et al.* 2005) gene as reference and represent the mean of measures obtain from a pool of five plants The expression of specific genes as stress markers have been followed in leaf: *AtRD29* and *AtSAG12* (B) and in root: *AtTIP1.2* (D).

DISCUSSION

Hydroponic system culture a useful tool to follow root development

The hydroponic growth of plants allows a full development of *Arabidopsis* until seeds production (Fig.6). Study of the full *Arabidopsis* plant development in the hydroponic growth system indicated, that as in many others studies on Col-0 or others ecotypes, hydroponically grown plants present the same morphological and physiological traits (Fig.6) that plants cultivated in soil (data not shown) (Gibeaut *et al.*, 1997; Norén *et al.*, 2004). The same observation could be noticed for the inflorescences development during the reproductive phase (Arteca and Arteca, 2000). One difference remains in the size of plant with larger leaves, many inflorescence stems and more roots, implicating an increase in weights of both organs (Arteca and Arteca, 2000; Norén *et al.*, 2004). The transition between the vegetative and reproductive phase appear at the day 53 after sowing in a range observed for Col-0 and Ws ecotypes cultivated on soil under a short photoperiod (10h and 8h) (Norén *et al.*, 2004). The full development of *Arabidopsis* plant on hydroponic system was completed after 4 months, rather close to this observed for Col-0 cultivated in pot with a 12h photoperiod (Wingler *et al.*, 2004). Another noticed difference between hydroponic and soil plant was in the apparition of the senescence symptoms. In Col-0 ecotype cultivated in soil, senescence was evidenced by anthocyanins accumulation in leaves and this was not observed in the hydroponic plants, indicating a delayed senescence on hydroponic plants. Besides that, an other study on *Arabidopsis* recombined lines demonstrated that plant with a high dry weigth showed a delayed senescence (Diaz *et al.*, 2008). Hydroponic system is more reproducible that the *in vitro* system, usefully used to study root development. Plant grown in the hydroponic system are photosynthetically active and do not use external sugar as a source of carbon (Huttner and Bar-Zvi, 2003). An other advantage of the hydroponic system is the maintaining of the pH and solute concentration medium which is more difficult in the medium containing agar (Toda *et al.*, 1999). Moreover, hydroponic culture allows to obtain undamaged clean root in a huge quantity (Arteca and Arteca, 2000; Norén *et al.*, 2004) for studying different kinds of environmental stress on roots as water stress mimicked by a polyethylene glycol (PEG) osmotic stress (Arteca and Arteca, 2000; Huttner and Bar-Zvi, 2003; Yang *et al.*, 2013)

Supplemental Table S1. *Specific primers used in this study*.

Genes	Accessions	Forward primers	Reverse primers
AtSUC1	AT1G71880	GACCTTTCGACGCCTTGTTC	AATACTCCACTAATCGCCGCTG
AtSUC2	AT1G22710	GGTAAGTGGTGTATTGGCGTTG	GAGCCAAACAACCACTGCTAAA
AtSUC3	AT2G02860	CAAGAACCGCAGCCGTAATC	CTTGACCGCCACCGGAAT
AtSUC4	AT1G09960	AGTGTCAAGCGAGGAACGCATA	AGTCACACGAGAAGCCATTGC
AtSUC5	AT1G71890	GGGCTATGGGATTCCATTAG	TAAAAGACAGACGACCAAGG
AtSUC6	ATG543610	TCCTGTCTCCGGCCTGCTT	AGGCGCCCATAGCGATGA
AtSUC7	AT1G66570	GTCTTTAAGAGACAAGCCCAC	AGACTGTCTATCCACAGTCGT
AtSUC8	AT2G14670	CTAGCTTCCATAATCTCAAGT	TTGGTAAGTTTCCACCTCCAAAA
AtSUC9	AT5G06170	GTGGTTCCTGATGAGCCG	GAGAAGCTGAACGTATGGG
AtSWEET9	AT2G39060	ACGCCGTCATGTGGTTCTTT	TGCTAGTTGGTTCTCTGTTGGC
AtSWEET10	AT5G50790	AACTCCTTTGCCTTTGTCGTACA	GTCAACACGAAGATTGCGCC
AtSWEET11	AT3G48740	TCCTTCTCCTAACAACTTATATACCATG	TCCTATAGAACGTTGGCACAGGA
AtSWEET12	AT5G23660	AAAGCTGATATCTTTCTTACTACTTCGAA	CTTACAAATCCTATAGAACGTTGGCAC
AtSWEET13	AT5G50800	CTTCTACGTTGCCCTTCCAAATG	CTTTGTTTCTGGACATCCTTGTTGA
AtSWEET14	AT4G25010	AAACGCTGTGGGATGCTTCA	TTCAAGAGCCCAAGAACCTTCA
AtSWEET15	AT5G13170	CAATGACATATGCATAGCGATTCCAA	GGACTCATCACGACAATACTCTTAAG
AtSAG12	AT5G45890	TGGATACGGCGAATCTACTAACG	GCTTTCATGGCAAGACCACATAG
AtRD29a	AT5G52310	GAAAGGAGGAGGAGGAATGGTT	GGAGCCAAGTGATTGTGGAGA
AtRBCS	AT1G67090	ACGGTACTGGACAATGTGG	CGAATCCGATGATCCTAATG
AtCAB1	AT1G29930	CCAGAGGCATTCGCTGAGTTG	CCTTACCAGTGACGATGGCTTG
AtTIP1.2	AT3G26520	CAAGAACGGTAGTCTCGGAACA	GACCAGCCCAGTAAACCCAGT
Reference	AT5G12240	AATATCGCTTTGCAGCTTCTG	GATTTTGCAAGGCTTTCGAG

Cartography of SUCs transporters genes expression in rosette, roots, stems and siliques of Arabidopsis thaliana

In this study we performed the complete sucrose transporters genes cartography in four main organs at six defined development stages of *A. thaliana* plants grown hydroponically (Fig. 6). Among the nine *AtSUCs* genes identified in the *A. thaliana* genome, four of them: *AtSUC1*, *AtSUC2*, *AtSUC3* and *AtSUC4* were found expressed in rosette with a higher level of expression for both *AtSUC1* and *AtSUC2* (Table 2; Table S2). In leaves, *AtSUC1* have been already observed as expressed in the trichomes (Sivitz *et al.*, 2007). Our data indicated that the expression of *AtSUC2* was high and stable during all the rosette development (Table 2; Table S2) that is consistent with its crucial role in sugar aploplastic loading into the phloem (Lalonde *et al.*, 2004; Reinders *et al.*, 2012; Sauer, 2007). *AtSUC3* expression in rosette has been already indicated in the sieve element of *A. thaliana* (Meyer *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2000), while *AtSUC4* one, has been found in the meristematic tissue of the aerial part and localised in the tonoplastic membrane (Endler *et al.*, 2006; Schneider *et al.*, 2012).

Partly because of the presence of stem leaves, *AtSUC* genes expressed in leaves were also found in stem samples (Table 2; Table S2). Nonetheless, presence of *AtSUC1* and *AtSUC3* transcripts was in agreement with their detection in reproductive organs (Meyer *et al.*, 2004; Sivitz *et al.*, 2008; Stadler *et al.*, 1999). In the same way, *AtSUC4* was observed in the anther development (Schneider et al., 2012). During the last stage of the reproductive phase (SR and SH), a weak expression of *AtSUC5* was noticed as it was shown in flowers of C24 ecotype (Baud *et al.*, 2005). Also, our results indicated a very low *AtSUC9* expression in stem, agreeing with its localisation in floral tissue and sink organs throughout the shoot (Sauer *et al.*, 2004; Sivitz *et al.*, 2007).

Concerning siliques, we detected expression of *AtSUC1*, *AtSUC2*, *AtSUC3*, *AtSUC4* and *AtSUC5* (Table 2; Table S2). *AtSUC2* displayed in siliques the strongest expression whatever organs and stages of development and its expression has been already observed in the pod of *A. thaliana* (Truernit and Sauer, 1995b). The presence of *AtSUC3* and *AtSUC5* transcripts in siliques was in accordance with results indicated their role in seed development (Baud *et al.*, 2005; Meyer *et al.*, 2004). The expression of *AtSUC9* was noticed in developed siliques of hydroponic plants whereas its expression has been detected into the embryo (Sivitz *et al.*, 2007).

In the root, as in leaves, we found the expression of the same four *SUCs* transporters: *AtSUC1*, *AtSUC2*, *AtSUC3* and *AtSUC4*. The stronger expression level was measured for

Supplemental Table S2. *Normalized expression of specific sucrose transporters genes expressed in organs at different development stages.*
Data are expressed as normalized expression (no unit) to the reference gene *At5g12240* expression level (Czechowski et *al.* 2005) and are the mean of measures obtained from the pool of five plants.

	Development stage																
	Young		**Adult**		**Infloresence emergence**		**Flowering**			**Silique ripening**				**Seed harvest**			
	Root	Rosette	Root	Rosette	Root	Rosette	Root	Rosette	Stem	Root	Rosette	Stem	Silique	Root	Rosette	Stem	Silique
AtSUC1	4.170	1.966	2.445	1.133	1.932	2.014	1.959	3.010	2.313	2.908	2.621	3.204	1.035	3.138	2.603	4.925	0.853
AtSUC2	0.847	6.000	0.616	3.630	0.753	3.945	0.901	4.757	4.691	1.376	3.918	7.111	16.223	1.301	3.182	9.918	12.641
AtSUC3	0.514	0.642	0.257	0.390	0.287	0.429	0.349	0.470	0.463	0.349	0.555	0.514	0.403	0.314	0.460	0.753	0.145
AtSUC4	0.240	0.123	0.149	0.091	0.140	0.104	0.171	0.112	0.104	0.179	0.120	0.120	0.403	0.157	0.132	0.154	0.173
AtSUC5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.101	ND	ND	0.084	2.676	ND	ND	0.089	2.329
AtSUC6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AtSUC7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AtSUC8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AtSUC9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.001	ND	ND	ND	0.001	ND
AtSWEET9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.304	ND	ND	ND	0.057	0.063
AtSWEET10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.018	ND	ND	0.043	0.697	ND	ND	0.030	0.020
AtSWEET11	0.012	1.670	0.032	0.801	0.006	0.660	0.010	1.310	0.241	ND	1.329	0.966	3.681	ND	1.790	1.283	0.227
AtSWEET12	0.004	0.082	0.060	0.117	0.040	0.092	0.043	0.259	0.063	0.014	0.356	0.275	0.774	0.021	0.500	0.218	0.107
AtSWEET13	0.118	0.318	0.068	0.155	0.069	0.157	0.079	0.164	0.071	0.057	0.157	0.354	0.444	0.040	0.137	0.451	0.366
AtSWEET14	0.025	ND	0.009	ND	0.008	ND	0.005	ND	0.007	0.003	ND	0.062	0.042	0.005	ND	0.039	0.013
AtSWEET15	0.003	0.004	0.002	0.050	0.002	0.080	0.001	0.028	0.009	0.002	0.768	0.232	0.232	0.003	1.231	0.235	0.235

AtSUC1 (Table 2; Table S2), which was consistent with its localisation in the root growing zones (Sivitz *et al.*, 2007; Sivitz *et al.*, 2008). Indeed, it has been suggested that *AtSUC1* was implicated in sucrose uptake from the phloem into growing root cells with no symplastic connection (Sivitz *et al.*, 2008), suggesting a role for AtSUC1 in root development. The expression of *AtSUC2* was constantly increasing during root development (Table 2; Table S2), and this was not surprising since AtSUC2-GUS activity allowed its detection in roots (Truernit and Sauer, 1995b). Concerning *AtSUC3*, its expression was found in many tissues and cells of sink organs (Meyer *et al.*, 2004) while *AtSUC4* expression was confined in the stele of the root (Schneider *et al.*, 2012).

Cartography of sugar efflux carriers, SWEETs genes expression in rosette, root, stem and silique of Arabidopsis thaliana

Our results indicated that, in rosette leaves, four *AtSWEETs* genes were expressed: *AtSWEET11*, *AtSWEET12*, *AtSWEET13* and *AtSWEET15* (Table 2; Table S2). High expression of *AtSWEET11* and *AtSWEET12* in *A. thaliana* leaves (Table 2; Table S2) has been already mentioned and localised to the leaf phloem parenchyma cells next to the SE/CC complex implicated in phloem loading (Chen *et al.*, 2012). *AtSWEET13* gene has been found expressed in leaf at a low level (Chen *et al.*, 2012) as observed in our results (Table 2; Table S2). Analysis performed on the double mutant *atsweet11;12* indicated that the expression of *AtSWEET13* increased about 16 fold, highlighting functional redundancy and possible compensation of *SWEETs* paralogs (Chen *et al.*, 2012; Eom *et al.*, 2015). Our results obtained for *AtSWEET15* expression (Table 2; Table S2), formally named *SAG29* (*SENESCENCE ASSOCIATED GENE 29*) were consistent with other works showing that *AtSWEET15* transcripts were very low in young leaves but increased in senescing leaves (Quirino *et al.*, 1999; Seo *et al.*, 2011).

In root, we detected expression of five *AtSWEETs* genes: *AtSWEET11*, *AtSWEET12*, *AtSWEET13*, *AtSWEET14* and *AtSWEET15* and noticed a weaker transcripts level for all theses genes compared to shoot (Table 2; Table S2). At the moment, little is known about the expression of the *AtSWEETs* genes in *A. thaliana* root. However, one study has indicated the main distribution of GUS activity under control of *SAG29* gene promoter (*AtSWEET15*) in root of young plants, as in our results (Table 2; Table S2). *AtSWEET15* expression was then found in the tips of lateral roots and in the lateral root primordia (Seo *et al.*, 2011). Since *AtSWEET11* was expressed in stem secondary tissues, it was not surprising to detect its expression in root where secondary tissue formation also occurs (Le Hir *et al.*, 2015).

Supplemental Table S3. *Normalized expression of specific marker genes expressed in leaves at different development stages.*

Data are expressed as normalized expression (no unit) to the reference gene *At5g12240* expression level (Czechowski et *al.* 2005) and are the mean of measures obtained from the pool of five plants.

	Young	Adult	Inflorescence emergence	Flowering	Silique ripening	Seed harvest
AtRBCS	4803.93	3147.52	2134.97	1584.71	625.99	415.87
AtCAB1	1552.09	989.12	935.76	1192.69	661.68	372.22
AtSAG12	0.07	0.16	0.34	0.03	1.04	0.90

In stem and siliques, all genes of clade III SWEET family were expressed: *AtSWEET9* to *AtSWEET15* (Table 2; Table S2). *AtSWEET9* has been found expressed during flowering and especially implicated in nectar secretion (Lin *et al.*, 2014). It is not surprising to find the *AtSWEETs* genes localised in the vascular tissue (*AtSWEET11* and *AtSWEET12*) (Chen *et al.*, 2012) and *AtSWEET15* expressed in leaves during senescence (Seo *et al.*, 2011) since a lot of cauline leaves were present on stem (Fig. 6). Moreover, *AtSWEET11* and *AtSWEET12* genes have been identified in phloem tissues of stem (Le Hir *et al.*, 2015). *AtSWEET10*, *AtSWEET13* and *AtSWEET14* were also expressed in stem (Table 2; Table S2) but their function has not been already described.

Concerning siliques, *AtSWEET11*, *AtSWEET12* and *AtSWEET15* were highly expressed in accordance to their recently described involvement in seed filling (Table 2; Table S2) (Chen *et al.*, 2015b). Even though implication of other *SWEETs* expressed has not been demonstrated so far, their expression is consistent with open access micro array data in siliques (https:/www.genevestigator.com/gov/) (Chen *et al.*, 2012).

Even if the regulation of *SWEETs* needs to be defined, they are supposed to play a role in sucrose efflux along the phloem pathway to provide sucrose to lateral organs as roots, stems and seeds (Chen, 2013).

Circadian source/sinks regulation: starch as the major conductor?

During the vegetative phase, qualified as 'limited trophic competition'(Christophe *et al.*, 2008), we first analysed the source/sink carbon partitioning during a diel cycle on plants harvested at the (Y) stage (Fig. 5). In *A. thaliana* rosette, a sugar peak mainly due to hexose was observed in the beginning of the photoperiod (Fig. 5A), likely reflecting the greater growth of rosette observed at dawn (Gibon *et al.*, 2006; Wiese *et al.*, 2007). The progressive drop of sugar content particularly during the night (Fig. 5A), could be related to dark growth slow down (Gibon *et al.*, 2006; Wiese *et al.*, 2007).

In roots, the two sugar peaks followed by a decrease (Fig 5C) might reflect the highest growth in the first light hours, and the recovery during the night (Stitt and Zeeman, 2012; Yazdanbakhsh *et al.*, 2011). This idea is consistent with the fact that root elongation rate and root branching are related to local high sugar content (Freixes *et al.*, 2002). At the end of the night, sugar content was minimal in root concomitantly with the lowest leaf starch content (Fig. 5 B and C). Indeed, the starch pattern observed in hydroponic plants is consistent with the fact that starch accumulation and degradation are linear with 95% of starch hydrolysed at

dawn (Gibon *et al.*, 2009; Graf and Smith, 2011; Smith and Stitt, 2007). In fact, diel regulation of starch turnover is very important to avoid C starvation a the end of night and the manner starch degradation is linked with its conversion to biomass led to propose starch to be a 'major integrator' of plants growth (Graf and Smith, 2011; Stitt and Zeeman, 2012; Sulpice *et al.*, 2009; Yazdanbakhsh *et al.*, 2011). This nocturnal strong degradation of starch observed in leaves in accompanied by increase in expression of three sucrose transporters, *AtSUC2*, *AtSWEET11* and *AtSWEET12,* (Fig. 4B and C), implicated in phloem loading (Chen *et al.*, 2012; Truernit and Sauer, 1995b). This up regulation could sustain sucrose transfer to root after starch hydrolysis. A circadian regulation of these three genes has been already suggested (Chen *et al.*, 2012; Haydon *et al.*, 2011). In roots, our result indicated a higher expression of *AtSUC1* during the dark period (Fig. 4D) in accordance with its putative role in the uptake of sucrose, derived from the phloem, into growing root cells with no symplastic connection, suggesting a role of AtSUC1 in root development (Sivitz *et al.*, 2007; Sivitz *et al.*, 2008). From these results, there are some clues about a tight relationship between diel C partitioning, sucrose transporters regulation and starch degradation in both organs. This proposition supports conclusions by Kolling *et al.* (2015) highlighting the control of carbon partitioning by circadian clock.

The vegetative growth phase: one source, one sink, a state of balance?

During the vegetative stage, shoot/root biomass repartition remained stable between rosette (84 to 86%) and root (16 to 14%) (Fig. 7), highlighting the balance between C supply (source=shoot) and C demand (sink= root). This result is consistent with values found by a predictive growth model which indicated that leaf biomass represented 88% of the total plant biomass at the end of the vegetative phase (Weraduwage *et al.*, 2015). As predicted by a modelling approach (Christophe *et al.*, 2008), shoot growth rate was maximal during the vegetative stage suggesting a strong C investment in production of photosynthetic leaves (Weraduwage *et al.*, 2015). This in accordance with preliminary allometric model, which indicates that, during the vegetative phase, shoot growth is greater than root growth, both increasing with age (Troughton, 1956).

As senescence in *A. thaliana* starts before rosette was fully developed, we cannot exclude that the slight increase in hexose content during this phase (Fig. 8 A) was provided by this process in the older leaves, since leaf sugars increase with leaf ageing (Diaz *et al.*, 2005; Quirino *et al.*, 2001; Stessman *et al.*, 2002). This trend was confirmed by the reduction in starch content which remained however high in whole rosette during this phase (Fig. 8 B).

During these stages (Y and A), roots as the only one constant sink, exhibited high and stable sugar level (Fig. 8C) and the stronger growth rate (Table 1). The C gain in root was provided by phloem transport: 1/3 (Y) to 1/2 (A) of exported [U-^{14}C] sucrose was passed through the root highlighting a strong C allocation toward root probably to sustain its high growth (Fig. 9). Nevertheless, it cannot be excluded that a part of reduction in starch content was caused by a greater C investment in vegetative growth since this stage is C consuming (Troughton, 1956; Weraduwage *et al.*, 2015).

Moreover during this period, the expression of three sucrose transporters genes, *AtSUC2*, *AtSWEET11* and *AtSWEET12*, involved in sucrose loading into the phloem (Chen *et al.*, 2012; Truernit and Sauer, 1995b), was very high in leaves (Fig. 10B; Table S2). In the same way, a strong expression of *AtSUC1* was observed in roots (Fig. 10C; Table S2) with a probable role in sucrose unloading from phloem into growing root cell (Sivitz *et al.*, 2008). All these genes might participate to Shoot/Root C partitioning. At the (IE) stage, the part of [U-^{14}C] decreased in root exudation whereas the part remaining in root stayed stable and increased again in leaves (Fig. 9.) As it is assumed that growth is a consequence of carbohydrates availability and that the onset of inflorescences decreases plant growth rate, the lower C allocation observed in root might reflect the C re-allocation to shoot to sustain growth of a new sink when stem was emerging (Christophe *et al.*, 2008; El ‑ Lithy *et al.*, 2010). This idea could be supported by the fact that *AtSWEET11* and *AtSWEET12* expression in leaves and *AtSUC1* expression in root felled slightly at this point (Fig 9C).

It is interesting to notice that during the (Y) and (A) stages a significant part of C allocated to the root was measured in the external medium (Fig. 9). Indeed, the C loss in root is linked with growth respiratory, ion uptake and root exudation (Farrar and Jones, 2000). Even if root rhizodeposition is often misesteemed in studies, this process include C flux to microflora, dead cells from root cap, mucilage secretion and exudation of low molecular weight compounds (Farrar et al., 2003; Farrar and Jones, 2000; Nguyen, 2003). Moreover it has been proposed that exudation process would increase when sugar concentration was high in root as observed in (A) stage (Fig. 8C) (Fatichi *et al.*, 2014).

The reproductive growth stage: one source, two sinks, a competitive state?

At the reproductive phase, the biomass repartition presented many variations between the three stages studied: (F), (SH) and (SR). Reproductive phase was characterized by stem emergence: a new C consuming sink competing with root for C allocation, leading to a

reduced part for root biomass (Fig. 7) and a strong increase in shoot/root ratio (Table 1). This trend was well illustrated by a great ^{14}C re-allocation to stem mainly at the expense of root, since [U-^{14}C] partitioning to rosette stayed high (Fig. 9). Decreasing C investment in root during reproductive phase was in agreement with previous works of Weraduwage *et al.* (2015). Despite reduced C-allocation to root during reproductive phase, its sugar content stayed stable (Fig. 8C), likely highlighting the continual preservation of root metabolism since sustaining root system requires a substantial C expenditure, and particularly for root respiration (Lambers *et al.*, 1996). Even though C allocation to roots was not favoured during reproductive phase, we noticed fine variations in ^{14}C partitioning to root among stages (Fig. 9). Indeed, ^{14}C allocation to root was minimal at (F) stage when both inflorescences and rosette need C to sustain their growth and metabolism. Thereafter, at (SR) and (SH) stages, root was less disadvantaged as a slight increase in ^{14}C partitioning to roots was noticed (Fig. 9), also likely because photosynthetically active stem leaves could also provide a great amount of C to flowers and siliques (Earley *et al.*, 2009). Interestingly, *AtSUC2* was simultaneously up-regulated in root which might be linked to the slight increase in ^{14}C partitioning to roots since it has been proposed that this transporter, and its homologue *ZmSUT1*, might have a role in phloem unloading (Carpaneto *et al.*, 2005; Truernit and Sauer, 1995b) and in sucrose retrieval along phloem transport to allow a better carbon partitioning between the phloem and the sinks tissues (Gould *et al.*, 2012; Srivastava *et al.*, 2008). In the same way, *AtSUC1* transcripts level were equivalent as in (A) stage, maybe to support a slight increase in C allocation to roots since its role in sucrose unloading from phloem into growing root cell has been suggested (Sivitz *et al.*, 2008). *AtSUC1* and *AtSUC2* gene expression regulation could be useful to maintain and/or increase C demand in root, since sink strength is tightly associated with the capacity to reduce photo-assimilates concentration in the release phloem sieve elements (Wardlaw, 1990). This proves that even if inflorescence stems are strong sinks, root remains an active sink throughout (Christophe *et al.*, 2008).

During the reproductive phase, many inflorescence stems with flowers and fruits at different developmental stages were present on hydroponic plants (Fig. 6) and their part in the total biomass continually increased. Moreover, at this stage, our results showed a stronger increase in S/R ratio as previously observed on grass plants during flowers formation (Troughton, 1956) or by carbon balance model with the apparition of leaves on the inflorescence axes (Christophe *et al.*, 2008). During the two first stages of this phase (F and SR), C allocation in stems rose up, indicating a high C demand of stem axes that contribute to

a strong trophic competition in plant (Christophe *et al.*, 2008). This is consistent with soluble sugars and starch measurements performed on stem containing flowers, indicated a very high content level of both (Fig 8E and F). This could be linked with a high sink activity of this organ at these stages of development, to use sucrose provided by a great C allocation to support reproductive organs development (Ho, 1988; Wardlaw, 1990). Besides that, at this stages (F and SR), stem could assume a source role, so we cannot exclude that high soluble sugars content in stem was produced by photosynthesis since numerous cauline leaves were present on stem axes (Fig. 6) (Christophe *et al.*, 2008; Earley *et al.*, 2009). This last remark was supported by the high level of expression of *AtSUC2*, *AtSWEET*11 and *AtSWEET12* (Fig. 10C), which are involved in sucrose loading into the phloem to nourish new sinks organs as previously proposed. Furthermore at the last stage (SH), ^{14}C partitioning from leaf indicated that stem was less favoured (Fig. 9). In the same way, soluble sugar content decreased, especially sucrose (Fig. 10E) that might indicate a weaker sink strength for the stem likely because a new strong sink (siliques) appears at (SR) and (SH) stages. The soluble sugars content in siliques was very high and hexoses represented 70% of soluble sugars and sucrose 30% (Fig. 8G). A peak of hexoses (fructose and glucose) and a high hexose/sucrose ratio was also observed in the early maturation seeds of the ecotype WS (Wassilewskija), which is supposed to enter in the hexose-P pool to allow storage compounds synthesis at the end of seeds maturation (Angeles-Núñez and Tiessen, 2011; Baud *et al.*, 2008). This strong C gain of seeds was supported by the expression of sucrose transporters genes (Fig. 10E). *AtSUC5* and *AtSUC3* were highly expressed in siliques agreeing with their involvement in sucrose uptake into embryo, since they are expressed in different embryonic tissues during seed development (Baud *et al.*, 2005; Meyer *et al.*, 2004; Stadler *et al.*, 2005a). Moreover, involvement of *AtSWEET11*, *AtSWEET12* and *AtSWEET15* genes has been recently demonstrated in *A. thaliana* seed filling, in accordance with their high expression in siliques (Fig. 9) (Chen *et al.*, 2015b).

During the reproductive phase, the rosette part in total biomass constantly decreased in favour of stem (Fig. 7) as indicated in the carbon balance model (Christophe *et al.*, 2008). This rosette growth reduction was accompanied with the highest soluble sugars level observed in plant at (SR) stage (Fig. 8A). This sugar status could be associated with the strong reduction of *AtRBCS* and *AtCAB1* gene expression noticed during reproductive phase (Fig. 10F) since they are known to be reduced by sugars (Krapp *et al.*, 1993; Sheen, 1990). As C synthesis was probably diminished, the high sugars level observed in leaves was probably the

result of senescence, as leaves displayed senescence symptoms (Fig. 6) and high expression of senescence marker *AtSAG12* (Fig 8A and 10F). Several authors proposed senescence onset to be induced by sugars accumulation in leaves as it could be suggested by (Pourtau *et al.*, 2006; Quirino *et al.*, 2001). The expression of *AtSWEET15* (Fig. 10B), formally named *AtSAG29* was also very high, as previously noticed, at the later stage of senescence (Quirino *et al.*, 1999; Seo *et al.*, 2011). Results of ^{14}C partitioning indicated that, at (SR), rosette presented its lower level of C allocated (Fig 9) highlighting C re-allocation to inflorescence with a dominant assimilate demand at this stage (Christophe *et al.*, 2008). Moreover, our results pointed out an increasing expression of both *AtSWEET11* and *AtSWEET12* at this stage, probably to facilitate the transport of carbon excess from leaf into the phloem until siliques. Indeed, authors have suggested a putative role for SWEETs transporters in carbon remobilization during senescence process (Seo *et al.*, 2011), and recent work demonstrated, that both AtSWEET11 and AtSWEET12 can transport glucose and fructose (Le Hir *et al.*, 2015). In the late stage (SH) of the reproductive phase, part of rosette biomass was the lowest (Fig. 7), soluble sugar and starch contents dropped (Fig. 8 A and B) and symptoms of senescence became very extended on older leaves (Fig. 6) supporting the idea that less carbon was available in rosette. However, ^{14}C partitioning rose up at this stage (Fig. 9) probably to sustain C supply to the stay green leaves observed on hydroponic rosettes (Fig. 6) because hydroponic culture favours vegetative biomass accumulation (Arteca and Arteca, 2000; Gibeaut *et al.*, 1997; Norén *et al.*, 2004). Finally, we showed that C partitioning during development might partly be related to sucrose transporters expression and sugar pattern. In conclusion, involvement of ontogenic development has to be considered because of its impact on C remobilisation and C supplies for sink growth.

No carbon reallocation toward root under osmotic stress

To complete the knowledge on source sink relationship, we applied on osmotic stress on *A. thaliana* plants because abiotic stress alters carbon allocation (Lemoine *et al.*, 2013; Muller *et al.*, 2011).

By mimicking reduced water availability, we aimed at changing carbon shoot root allocation in order to study change in sucrose transporters gene expression. Progressive increasing amount of PEG in the root medium was finally interpreted at the molecular level as reduced water availability by plant as suggested by the strong reduction in *AtTIP1.2* transcripts level (Fig. 13D) and increased *AtRD29a* gene expression (Fig. 13B) in root and shoot, respectively (Alexandersson *et al.*, 2005a; Harb *et al.*, 2010; Sharma and Verslues,

2010). In addition to prevent biomass accumulation in both shoots and roots (Table 3), one of the principal effect of osmotic stress was leaf wilting which appeared in the last days of osmotic stress phase. This suggests an alteration in shoot water status, likely explaining decreased radio-labelled sucrose export capacity of source leaves (Fig. 12A) because sucrose translocation, according to bulk flow, require water efflux from xylem (Münch, 1930). Diminished shoot source strength was accompanied by a strong sugars accumulation in shoot (Fig. 11A), a sugar pattern already reported in response to drought in several crop species as *Vitis vinifera* (Cramer *et al.*, 2007; Medici *et al.*, 2014) and *Zea mays* (Kim *et al.*, 2000) but also in *A. thaliana* plants (Hummel *et al.*, 2010; Sperdouli and Moustakas, 2012; Taji *et al.*, 2002). The sugars accumulation could be explained by the uncoupling between shoot growth rate and carbon assimilation: during water deficit, leaf growth is altered earlier than photosynthesis (Muller *et al.*, 2011). Nonetheless, the higher extent in increase in shoot sugars content compared to several studies (Hummel *et al.*, 2010; Sperdouli and Moustakas, 2012; Taji *et al.*, 2002), and particularly glucose accumulation, underlines another reason for this accumulation. Sugars accumulation is tightly correlated to leaf senescence in *A. thaliana* (Quirino et al., 2001) because senescence is responsive to sugars (Pourtau et al., 2006). Interestingly, *AtSAG12* expression, encoding for a cysteine protease exhibiting a strictly senescence-associated expression pattern in leaves (Gan and Amasino, 1995; Lohman *et al.*, 1994), was highly enhanced in response to osmotic stress (Fig. 13B) suggesting that hexoses accumulation induced by osmotic stress may be senescence-associated. Leaf carbon remobilization associated to senescence, as a preliminary step before floral transition, is known to ensure growth of reproductive organs and finally, seed filling (Buchanan-Wollaston, 1997; Lim *et al.*, 2007). Since SUC and SWEET transporters are involved in sucrose translocation between sources and sink organs, their regulation in shoot under osmotic stress-induced senescence had to be considered. Among the genes expressed in shoots, *AtSWEET12*, *AtSWEET13* and more particularly *AtSWEET15* were up regulated under osmotic stress (Fig. 13A), as seen during reproductive phase (Fig. 10B). *A. thaliana* plants overexpressing *AtSWEET15* showed accelerated senescence and salt hypersensitivity while atsweet15 mutant were less sensitive (Seo *et al.*, 2011). However, translational fusion with GUS under control of its own promoter indicates that AtSWEET15 protein does not accumulate to high level during senescence (Chen *et al.*, 2015b; Eom *et al.*, 2015). For all that, because *AtSWEET15* was not the only SWEET transporter gene induced under osmotic stress and during development in shoot (Fig. 10B and 13A), role of SWEET transporter in carbon recapturing during stress or senescence has to be evaluated in the future.

Root biomass accumulation was reduced after osmotic stress phase (Table 3) but Shoot/Root ratio was only slightly reduced suggesting a very low additional C investment to root growth, a result not expected since drought usually results in a decreased Shoot/Root ratio (Chaves *et al.*, 2003). The slight decrease in S/R was probably due to the osmotic stress protocol because PEG was added progressively (Fig. 3). As a result, the time of stress setting up was likely too short compared to the age of plants to significantly alter final biomass partitioning, a measure integrating whole carbon allocation history. Absence of carbon reallocation suggested by marginal change in Shoot/Root ratio was confirmed by evaluating translocated radiolabelled sucrose repartition in plant, which did not exhibit any increase in root but rather a slight decrease (Fig. 12B). Even though the amount of radiolabelled sucrose translocated to root was reduced (Fig. 12A), sugars content increased in root (Fig. 11A) probably because C exported to root was higher than its consumption. Despite increased sugars content, several sucrose transporters genes (*AtSUC1*, *AtSUC2*, *AtSWEET11*, *AtSWEET12*, *AtSWEET13* and *AtSWEET15*) displayed reduction in their expression.

AtSUC1-induced transport of sucrose in the pollen tube is tightly linked to increased turgor of the pollen tube for growth (Stadler *et al.*, 1999). A similar function in root cannot be excluded since *AtSUC1* is expressed in growing areas of the roots (Sivitz *et al.*, 2008). Hence, decreased *AtSUC1* expression (Fig. 13C) might be associated to the reduced root growth observed (Table 3). This reduced expression of *AtSUC1* could occur through negative control of ABA signalling (Hoth *et al.*, 2010), itself involved in root drought stress response (Davies and Zhang, 1991). As seen before, lower transcript level of *AtSUC2* could be associated to a smaller need for sucrose retrieval along the phloem pathway and unloading, since sucrose translocated to root was reduced under osmotic stress (Fig. 13C). It has been proposed that SWEETs might be involved in sucrose leakage along phloem transport to nourish surrounding tissues (Chen, 2013; Ludewig and Flügge, 2013). From that, *SWEET11-15* (excepted *AtSWEET14*) down-regulation in root in response to osmotic stress (Fig. 13C) might be linked to the need for limiting sucrose leakage in order to maintain phloem sap flux until release phloem.

To check that physiological effects and variations of sugars contents and sucrose transporters gene expression was caused by PEG addition in the nutrient medium, experiment was extended to one additional week, during which PEG has been removed from stressed plants nutrient medium. Growth recovering was partial since growth of shoot and root was still lower than control plants at the end of rewatering phase (Table 3). This trend was also

observed concerning sugar content because we measured higher sugars contents in leaves in stressed plants after rewatering even though osmotic potential and water content had been restored (Table 3). Marker gene expression measurements confirmed that pattern, previously observed, was especially due to PEG since it vanished after rewatering phase (Fig. 13B and D). Concerning shoot and root sucrose transporters gene expression, we also confirmed a global recovery in their gene expression, confirming that modifications previously noted was the consequence of PEG addition in nutrient medium. It has to be pointed out that some SWEET transporters genes even experienced an up-regulation in shoot and root after rewatering phase, and could be linked to the increase in radiolabelled sucrose translocation (Fig. 12B). Finally, we confirmed that effects pointed out after osmotic stress was due to PEG addition even though plant recovery was incomplete for some parameters. Nonetheless, this tends to show that osmotic stress applied was partially reversible.

To conclude about osmotic stress from "a root sucrose transporters point of view", we provide evidence for a transcriptional regulation of root sucrose transporters expression in response to osmotic stress (Fig. 13C). Interestingly, we showed a tight relationship between decreased gene expression of several sucrose transporters and reduction in amount of radiolabelled sucrose translocated towards root. According to the "push hypothesis" of shoot-root interaction (Farrar and Jones, 2000), down regulation of *AtSUC2* and several *AtSWEETs* genes, in osmotic stressed root (Fig. 13), could contribute to alter the sucrose inflow from the shoot to root release phloem.

CONCLUSION

Taking advantage of the hydroponic culture system allowing efficient growth of plants up to seeds harvest and the collection of the entire root system, the study of source to sink carbon allocation in relation to sucrose transporter gene expression in both source and sinks was investigated. To get a large overview of the possible existence of contrasted source/sink relationships, this was followed at two time scales: during a day/night cycle, and during the whole development of plants. The effect of an abiotic (osmotic) stress (progressive addition of PEG) was also studied in parallel. Circadian regulation of carbon allocation between rosette and roots was linked with C metabolism, mostly diel starch synthesis and degradation. Among the whole gene family of sucrose transporter tested, only a subset of SUC and SWEET transporters were expressed but their expression level did not show dramatic changes during this period. This is in accordance with a continuous flow of sugar during the day (sucrose derived from photosynthesis) and during the night (sucrose derived from starch degradation). Therefore the time for harvest in subsequent experiments was set to 13h00.

On a longer time scale (full development), there was a switch between the vegetative (sinks limited to young leaves and roots) and the reproductive stage (with 2 new sinks studied: stem and siliques). Because of the competition of these new sinks, roots represented a decreasing part of the total biomass, with a significant drop between the Flowering (F) and the Silique Ripening (SR) stages. This may be related to the decrease of carbon transport (from the ^{14}C-sucrose transport experiments) at the earlier stage (Inflorescence to Flowering). In the rosette, there was a constant increase in the expression of genes of transporters implicated in sucrose phloem loading (*AtSUC2*, *AtSWEET11*-12) consistent with the former results. In the roots, the major difference was the increase of *SUC2* expression at the latter stages of development, which could be related to the higher competition between sinks (stem and siliques versus roots). During osmotic stress, roots growth was reduced and ^{14}C transport was concomitantly diminished and the expression of the main sucrose transporter genes found in roots (*AtSUC1* and *AtSUC2*) was inhibited. Altogether these data may indicate a role for those transporters in sucrose import in the roots and thus root sink strength, regulated by the development stage and abiotic stress.

MATERIAL AND METHODS

Plant material, Growth conditions and harvests

Plants were grown in four interconnected Araponics® boxes system (Araponics, SA Belgium) (Fig. 1A). Nutrient medium was propelled from the nutrient growth container to the Araponics® boxes by an electric pump (New-Jet 400, Aquarium Systems) (Fig. 1A). Medium was oxygenated with an air pump (Rena Air 100, Rena). Medium was replaced each week by fresh medium. Plants were cultivated in a phytotron, at 23 °C/18 °C, 10 h/14 h day/night with a 80 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ light intensity, and a 50%/70% day/night relative hygrometry. Arabidopsis seeds (*Arabidopsis thaliana* Col-0) were sown in Araponics® seed holders (Fig. 2A) in a drop of nutrient agar medium (0,65% agar, Musrashige and Skoog medium, M0233, Duchefa Biochemie) deposited on the top of an inserted piece of autoclaved rockwool (Fig. 2B).

Plants were harvested at six principal growth stages defined as described in (Boyes *et al.*, 2001): (Y; D+31), Adult stage (A; D+48), Inflorescence Emergence (IE; D+60); Siliques Ripening (SR; D+98) and Siliques Harvest (SH; D+125). For the circadian experiment, only the young stage (Y) was studied. Root and rosette were harvested successively at 9h, 13h, 17h, 21h, 1h and 5h, and frozen in liquid nitrogen for RNA and sugar extractions.

For plant development experiment, six harvests were performed, at the middle of the day, for the six stages of development studied (Y), (A), (IE), (F), (SR) and (SH). Root, rosette, stem and siliques were separately harvested and frozen in liquid nitrogen for RNA and sugar extractions. Biomass repartition and root shoot ratio (R/S) were calculated from dry weight (DW).

For osmotic stress experiment, stress was applied on 24-day-old plants, by gradual addition of 0.5% of polyethylene glycol (PEG) in nutrient medium every 2 days (Fig. 3). The addition of PEG starts from D+24 to D+32 until the medium reached the 2.5% dose of PEG. This last concentration was maintained during 3 days, from D+32 to D+35. Then, the osmotic stress phase was followed by a rewatering phase, where nutrient medium supplied with PEG was replaced by fresh nutrient medium for one week, from D+35 to D+42. Harvests were performed, before stress application (D+24), after osmotic stress phase (D+35) and after rewatering phase (D+42) (Fig. 3). Root and rosette were separately harvested and frozen in liquid nitrogen for RNA and sugar extractions. Additional rosettes were also collected to measure physiological parameters (biomass, water status).

Biomass repartition, R/S, leaf area and growth rate

For the development experiment, plants from two independent experimentations have been used to determine dry weight, biomass repartition and R/S ratio.

For the osmotic experiment, rosette and root DW was obtained (D+24, D+35 and D+42) from three independent experimentations. The shoot growth rate (SGR) was then calculated after stress and rewatering ($SGR = (DW_{t2} - DW_{t1})/(t2-t1)$). Root growth rate (RGR) was then calculated as the same way previously described. R/S ratio was obtained by dividing root average dry weight by rosette average dry weight.

The projected leaf area (PLA) was determined using pictures of plants with the threshold color plugin of ImageJ software (htt://imagej.nih.gov/ij/). Leaf expansion rate (LER) was then calculated after stress and rewatering ($LER = (PLA_{t2}-PLA_{t1})/(t2-t1)$).

Water content, osmotic potential

For the osmotic stress experiment, rosette water status was studied by performing water content (WC) and osmotic potential (Ψ_{osm}) measurements.

Water content was determined as followed. Fresh weight (FW) was scored immediately after excision from the root. Dry weight (DW) was scored after 24h at 80°C. WC was determined as WC= (FW-DW)/FW.

Ψ_{osm} was measured on three to five excised leaves per plant pooled in 2mL syringes. The syringes were successively frozen in liquid nitrogen and thawed at room temperature three times. Sap was then extracted and collected in 15 mL tubes by centrifugation (8000 g, 10 min). Ten microliters of the resulting sap was analysed using a vapor pressure osmometer (Wescor Vapro 5520). Ψ_{osm} was calculated from osmolarity using the Van't Hoff equation at 23°C.

RNA extraction and cDNA synthesis

Samples were ground in liquid nitrogen with a bead mill (TissueLyser II, Quiagen). Total RNA was extracted as described by (Kay *et al.*, 1987). RNA quantity and quality were respectively checked by optical density at 260 nm and agar gel electrophoresis. The cDNA was synthetized from 1 µg of total RNA after DNAse treatment (Sigma-Aldrich) using MML-V reverse transcriptase (Promega).

Gene expression analysis

A set of 16 genes encoding for sucrose transporters from two distinct families, the Sucrose Carriers (*AtSUC1, AtSUC2, AtSUC3, AtSUC4, AtSUC5, AtSUC6, AtSUC7, AtSUC8, AtSUC9*) and the Sugar Will Eventually Exported Transporters (*AtSWEET9, AtSWEET10, AtSWEET11, AtSWEET12, AtSWEET13, AtSWEET14, AtSWEET15*) have been studied in root, rosette, stem and siliques. An initial screen for these genes was performed by RT-PCR after 40 cycles using GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega) (95°C, 30 s; 60°C, 30 s; 72°C, 30 s) and was analysed on 2 % agar gel electrophoresis. For further analyses by RT-qPCR, only genes that showed amplification in RT-PCR were studied. Quantitative PCR has been performed on 96 well-plate with a MasterCycler Realplex^2 (Eppendorf) using GoTaq qPCR Master Mix (Promega). Relative expression has been determined according to the $2^{-\Delta Ct}$ method. Relative expressions are compared to the adult stage for root and leaves, to the flowering stage for stem and to the silique ripening stage for silique. Target gene expression was normalized to the expression of the plant gene *At5g12240* (Czechowshi *et al*., 2005). The primers used are presented in Table S1.

Soluble sugars and starch measurements

Glucose, fructose and sucrose contents were extracted from approximately 10 mg of tissue sample previously lyophilized by three washings (1.5 mL and twice 0.5 mL) in methanol:chloroform:water (MCW) (12:5:3, v:v:v). Supernatants containing soluble sugars were pooled and mixed with 0.6 volume of water and centrifuged. The upper aqueous phase was collected and evaporated at 30°C with a MiVac Quattro (Genevac). Soluble sugars were resuspended in 500 µL of water and quantified using Sucrose/Fructose/D-Glucose Assay Kit (Megazyme). Starch content was measured from the pellet obtained after MCW washings using Total Starch HK Assay Kit (Megazyme).

Transport of [U-^{14}C] sucrose

Individual plants were transferred to 50 mL vials filled with nutrient medium before the experiment. Two microliters of 0.5 mM [U-^{14}C] sucrose (18.5 kBq) (Perkin Elmer) dissolved in MES buffer (10 mM, pH 5.5) were applied on a source leaf gently abraded with carborundum (∅ 60 µm, Prolabo). Transport of [U-^{14}C] sucrose was performed for 5 h, with a 80 µmol.m^{-2}.s^{-1} light intensity. After 5h of transport, rosette was immediately cut from root and stem. Radiolabelled source leaf was isolated from the rosette, and all the organs were placed between a 3MM Whatman® paper and a mylar sheet, and then lyophilized for one week at -30°C. Then, plants were exposed for 1 week on PhosphorImager screens (Storage

Phosphor Screen, Molecular Dynamics), and then scanned with a 200 µm per pixel resolution using scanner (Scanner Typhoon, GE Healthcare).

In order to determine radioactivity, each organ was incubated during 24 h in a digestion buffer (perchloric acid:hydrogen peroxide 30%:Triton X100 0,1%, 56:17:27, v:v:v) at 55°C. Scintillation cocktail (Ecolite) was then added and samples were counted for radioactivity (Tri-Carb2910, Perkin Elmer). Radiolabel was also counted in liquid culture medium.

Acknowledgements

Mickaël Durand and Dany Mainson are supported by a grant from the French Ministry of Research and Higher Education and the Région Poitou-Charente, respectively. We would like to thank all our colleagues for inspiring discussions. CNRS, University of Poitiers and Région Poitou-Charente are gratefully acknowledged for financial support.

Literature cited

Afoufa-Bastien D, Medici A, Jeauffre J, Coutos-Thévenot P, Lemoine R, Atanassova R, Laloi M. 2010. The Vitis vinifera sugar transporter gene family: phylogenetic overview and macroarray expression profiling. *BMC plant biology* **10**, 245.

Alexandersson E, Fraysse L, Sjovall-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, Johanson U, Kjellbom P. 2005a. Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Mol Biol* **59**, 469-484.

Alexandersson E, Fraysse L, Sjövall-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, Johanson U, Kjellbom P. 2005b. Whole Gene Family Expression and Drought Stress Regulation of Aquaporins. *Plant Molecular Biology* **59**, 469-484.

Angeles-Núñez JG, Tiessen A. 2011. Mutation of the transcription factor LEAFY COTYLEDON 2 alters the chemical composition of Arabidopsis seeds, decreasing oil and protein content, while maintaining high levels of starch and sucrose in mature seeds. *Journal of Plant Physiology* **168**, 1891-1900.

Arteca RN, Arteca JM. 2000. A novel method for growing Arabidopsis thaliana plants hydroponically. *Physiologia Plantarum* **108**, 188-193.

Ayre BG. 2011. Membrane-Transport Systems for Sucrose in Relation to Whole-Plant Carbon Partitioning. *Molecular Plant* **4**, 377-394.

Baud S, Dubreucq B, Miquel M, Rochat C, Lepiniec L. 2008. Storage reserve accumulation in Arabidopsis: metabolic and developmental control of seed filling. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists* **6**.

Baud S, Wuillème S, Lemoine R, Kronenberger J, Caboche M, Lepiniec L, Rochat C. 2005. The AtSUC5 sucrose transporter specifically expressed in the endosperm is involved in early seed development in Arabidopsis. *The Plant Journal* **43**, 824-836.

Boursiac Y, Chen S, Luu D-T, Sorieul M, van den Dries N, Maurel C. 2005. Early Effects of Salinity on Water Transport in Arabidopsis Roots. Molecular and Cellular Features of Aquaporin Expression. *Plant Physiology* **139**, 790-805.

Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Görlach J. 2001. Growth Stage–Based Phenotypic Analysis of Arabidopsis: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants. *The Plant Cell* **13**, 1499-1510.

Buchanan-Wollaston V. 1997. The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **48**, 181-199.

Carpaneto A, Geiger D, Bamberg E, Sauer N, Fromm J, Hedrich R. 2005. Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier ZmSUT1 mediates sucrose efflux under the control of the sucrose gradient and the proton motive force. *J Biol Chem* **280**, 21437-21443.

Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS. 2003. Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* **30**, 239-264.

Chen H, Jiang J-G. 2010. Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity. *Environmental Reviews* **18**, 309-319.

Chen L-Q. 2013. SWEET sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition. *New phytologist*, n/a-n/a.

Chen LQ, Lin IW, Qu XQ, Sosso D, McFarlane HE, Londono A, Samuels AL, Frommer WB. 2015. A cascade of sequentially expressed sucrose transporters in the seed coat and endosperm provides nutrition for the Arabidopsis embryo. *Plant Cell* **27**, 607-619.

Chen LQ, Qu XQ, Hou BH, Sosso D, Osorio S, Fernie AR, Frommer WB. 2012. Sucrose Efflux Mediated by SWEET Proteins as a Key Step for Phloem Transport. *Science* **335**, 207-211.

Chen Z, Hong X, Zhang H, Wang Y, Li X, Zhu JK, Gong Z. 2005. Disruption of the cellulose synthase gene, AtCesA8/IRX1, enhances drought and osmotic stress tolerance in Arabidopsis. *Plant J* **43**, 273-283.

Christophe A, Letort V, Hummel I, Cournède P-H, de Reffye P, Lecœur J. 2008. A model-based analysis of the dynamics of carbon balance at the whole-plant level inArabidopsis thaliana. *Functional Plant Biology* **35**, 1147.

Cornic G. 2000. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture – not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science* **5**, 187-188.

Cramer GR, Ergul A, Grimplet J, Tillett RL, Tattersall EA, Bohlman MC, Vincent D, Sonderegger J, Evans J, Osborne C, Quilici D, Schlauch KA, Schooley DA, Cushman JC. 2007. Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Funct Integr Genomics* **7**, 111-134.

Davies WJ, Zhang J. 1991. ROOT SIGNALS AND THE REGULATION OF GROWTH AND DEVELOPMENT OF PLANTS IN DRYING SOIL. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**, 55-76.

Diaz C, Lemaître T, Christ A, Azzopardi M, Kato Y, Sato F, Morot-Gaudry J-F, Le Dily F, Masclaux-Daubresse C. 2008. Nitrogen Recycling and Remobilization Are Differentially Controlled by Leaf Senescence and Development Stage in Arabidopsis under Low Nitrogen Nutrition. *Plant Physiology* **147**, 1437-1449.

Diaz C, Purdy S, Christ A, Morot-Gaudry J-F, Wingler A, Masclaux-Daubresse C. 2005. Characterization of Markers to Determine the Extent and Variability of Leaf Senescence in Arabidopsis. A Metabolic Profiling Approach. *Plant Physiology* **138**, 898-908.

Earley EJ, Ingland B, Winkler J, Tonsor SJ. 2009. Inflorescences contribute more than rosettes to lifetime carbon gain in Arabidopsis thaliana (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **96**, 786-792.

El‐Lithy ME, Reymond M, Stich B, Koornneef M, Vreugdenhil D. 2010. Relation among plant growth, carbohydrates and flowering time in the Arabidopsis Landsberg erecta× Kondara recombinant inbred line population. *Plant Cell Environ* **33**, 1369-1382.

Endler A, Meyer S, Schelbert S, Schneider T, Weschke W, Peters SW, Keller F, Baginsky S, Martinoia E, Schmidt U. 2006. Identification of a Vacuolar Sucrose Transporter in Barley and Arabidopsis Mesophyll Cells by a Tonoplast Proteomic Approach. *Plant Physiology* **141**, 196-207.

Eom JS, Chen LQ, Sosso D, Julius BT, Lin IW, Qu XQ, Braun DM, Frommer WB. 2015. SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. *Curr Opin Plant Biol* **25**, 53-62.

Farrar JF. 1993. Carbon partitioning. *Photosynthesis and Production in a Changing Environment*: Springer, 232-246.

Farrar JF, Jones DL. 2000. The control of carbon acquisition by roots. *New phytologist* **147**, 43-53.

Fatichi S, Leuzinger S, Koerner C. 2014. Moving beyond photosynthesis: from carbon source to sink‐driven vegetation modeling. *New phytologist* **201**, 1086-1095.

Freixes S, Thibaud M-C, Tardieu F, Muller B. 2002. Root elongation and branching is related to local hexose concentration in Arabidopsis thaliana seedlings. *Plant, Cell and Environment* **25**, 1357-1366.

Gan S, Amasino RM. 1995. Inhibition of Leaf Senescence by Autoregulated Production of Cytokinin. *Science* **270**, 1986-1988.

Gibeaut DM, Hulett J, Cramer GR, Seemann JR. 1997. Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using simple, law-maintenance Hydroponic method and favorable environmental conditions. *Plant Physiology* **115**, 317-319.

Gibon Y, Pyl ET, Sulpice R, Lunn JE, Hohne M, Gunther M, Stitt M. 2009. Adjustment of growth, starch turnover, protein content and central metabolism to a decrease of the carbon supply when Arabidopsis is grown in very short photoperiods. *Plant Cell Environ* **32**, 859-874.

Gibon Y, Usadel B, Blaesing OE, Kamlage B, Hoehne M, Trethewey R, Stitt M. 2006. Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal cycles in Arabidopsis rosettes. *Genome biology* **7**, R76.

Gifford RM, Thorne JH, Hitz WD, Giaquinta RT. 1984. Crop productivity and photoassimilate partitioning. *Science* **225**, 801-808.

Gottwald JR, Krysan PJ, Young JC, Evert RF, Sussman MR. 2000. Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 13979-13984.

Gould N, Thorpe MR, Pritchard J, Christeller JT, Williams LE, Roeb G, Schurr U, Minchin PE. 2012. AtSUC2 has a role for sucrose retrieval along the phloem pathway: evidence from carbon-11 tracer studies. *Plant Sci* **188-189**, 97-101.

Graf A, Schlereth A, Stitt M, Smith AM. 2010. Circadian control of carbohydrate availability for growth in Arabidopsis plants at night. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 9458-9463.

Graf A, Smith AM. 2011. Starch and the clock: the dark side of plant productivity. *Trends in Plant Science* **16**, 169-175.

Harb A, Krishnan A, Ambavaram MMR, Pereira A. 2010. Molecular and Physiological Analysis of Drought Stress in Arabidopsis Reveals Early Responses Leading to Acclimation in Plant Growth. *Plant Physiology* **154**, 1254-1271.

Haritatos E, Ayre BG, Turgeon R. 2000. Identification of Phloem Involved in Assimilate Loading in Leaves by the Activity of the Galactinol Synthase Promoter. *Plant Physiology* **123**, 929-938.

Haydon MJ, Bell LJ, Webb AAR. 2011. Interactions between plant circadian clocks and solute transport. *Journal of Experimental Botany*, err040.

Ho LC. 1988. Metabolism and compartimentation of imported sugars in sink organs in relation ti sink strength. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**, 355-378.

Hoth S, Niedermeier M, Feuerstein A, Hornig J, Sauer N. 2010. An ABA-responsive element in the AtSUC1 promoter is involved in the regulation of AtSUC1 expression. *Planta* **232**, 911-923.

Hummel I, Pantin F, Sulpice R, Piques M, Rolland G, Dauzat M, Christophe A, Pervent M, Bouteille M, Stitt M, Gibon Y, Muller B. 2010. Arabidopsis Plants Acclimate to Water Deficit at Low Cost through Changes of Carbon Usage: An Integrated Perspective Using Growth, Metabolite, Enzyme, and Gene Expression Analysis. *Plant Physiology* **154**, 357-372.

Huttner D, Bar-Zvi D. 2003. An improved, simple, hydroponic method for growingArabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology Reporter* **21**, 59-63.

Kalt-Torres W, Huber SC. 1987. Diurnal Changes in Maize Leaf Photosynthesis : III. Leaf Elongation Rate in Relation to Carbohydrates and Activities of Sucrose Metabolizing Enzymes in Elongating Leaf Tissue. *Plant Physiology* **83**, 294-298.

Kay R, Chan AMY, Daly M, McPherson J. 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* **236**, 1299-1302.

Kim J-Y, Mahé A, Brangeon J, Prioul J-L. 2000. A Maize Vacuolar Invertase, IVR2, Is Induced by Water Stress. Organ/Tissue Specificity and Diurnal Modulation of Expression. *Plant Physiology* **124**, 71-84.

Koch K. 2004. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 235-246.

Kolling K, Thalmann M, Muller A, Jenny C, Zeeman SC. 2015. Carbon partitioning in Arabidopsis thaliana is a dynamic process controlled by the plants metabolic status and its circadian clock. *Plant Cell Environ* **38**, 1965-1979.

Krapp A, Hofmann B, Schäfer C, Stitt M. 1993. Regulation of the expression of rbcS and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the 'sink regulation' of photosynthesis? *The Plant Journal* **3**, 817-828.

Kühn C, Hajirezaei M-R, Fernie AR, Roessner-Tunali U, Czechowski T, Hirner B, Frommer WB. 2003. The Sucrose Transporter StSUT1 Localizes to Sieve Elements in Potato Tuber Phloem and Influences Tuber Physiology and Development. *Plant Physiology* **131**, 102-113.

Lalonde S, Wipf D, Frommer WB. 2004. Transport Mechanisms for Organic Forms of Carbon and Nitrogen between Source and Sink. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 341-372.

Lambers H, Atkin OK, Millenaar FF. 1996. Respiratory patterns in roots in relation to their functioning. *Plant Roots. The Hidden Half*, 323-362.

Le Hir R, Spinner L, Klemens PAW, Chakraborti D, de Marco F, Vilaine F, Wolff N, Lemoine R, Porcheron B, Géry C, Téoulé E, Chabout S, Mouille G, Neuhaus E, Dinant S, Bellini C. 2015. Disruption of the sugar transporters AtSWEET11 and AtSWEET12 affects vascular development and freezing tolerance in Arabidopsis. *Molecular Plant*.

Lemoine R. 2000. Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochimica et Biophysica Acta* **1465**, 246-262.

Lemoine R, Camera SL, Atanassova R, Dédaldéchamp F, Allario T, Pourtau N, Bonnemain J-L, Laloi M, Coutos-Thévenot P, Maurousset L, Faucher M, Girousse C, Lemonnier P, Parrilla J, Durand M. 2013. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science* **4**.

Lim PO, Kim HJ, Gil Nam H. 2007. Leaf senescence. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**, 115-136.

Lin IW, Sosso D, Chen L-Q, Gase K, Kim S-G, Kessler D, Klinkenberg PM, Gorder MK, Hou B-H, Qu X-Q, Carter CJ, Baldwin IT, Frommer WB. 2014. Nectar secretion requires sucrose phosphate synthases and the sugar transporter SWEET9. *Nature* **508**, 546-549.

Lohman KN, Gan S, John MC, Amasino RM. 1994. Molecular analysis of natural leaf senescence in Arabidopsis thaliana. *Physiologia Plantarum* **92**, 322-328.

Ludewig F, Flügge U-I. 2013. Role of metabolite transporters in source-sink carbon allocation. *Frontiers in Plant Science* **4**.

Medici A, Laloi M, Atanassova R. 2014. Profiling of sugar transporter genes in grapevine coping with water deficit. *FEBS Lett* **588**, 3989-3997.

Meyer S, Lauterbach C, Niedermeier M, Barth I, Sjolund DR, Sauer N. 2004. Wounding Enhances Expression of AtSUC3, a Sucrose Transporter from Arabidopsis Sieve Elements and Sink Tissues. *Plant Physiology* **134**, 684-693.

Meyer S, Melzer M, Truernit E, Hümmer C, Besenbeck R, Stadler R, Sauer N. 2000. AtSUC3, a gene encoding a new Arabidopsis sucrose transporter, is expressed in cells adjacent to the vascular tissue and in a carpel cell layer. *The Plant Journal* **24**, 869-882.

Muller B, Pantin F, Genard M, Turc O, Freixes S, Piques M, Gibon Y. 2011. Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1715-1729.

Münch E. 1930. Die Stoffbewegungen in der Pflanze. *Jena: Fischer*.

Norén H, Svensson P, Andersson B. 2004. A convenient and versatile hydroponic cultivation system for Arabidopsis thaliana. *Physiologia Plantarum* **121**, 343-348.

Paul MJ, Foyer CH. 2001. Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1383-1400.

Pourtau N, Jennings R, Pelzer E, Pallas J, Wingler A. 2006. Effect of sugar-induced senescence on gene expression

and implications for the regulation of senescence in Arabidopsis. *Planta* **224**, 556-568.

Quirino B, Normanly J, Amasino R. 1999. Diverse range of gene activity during Arabidopsis thaliana leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. *Plant Molecular Biology* **40**, 267-278.

Quirino B, Reiter W-D, Amasino RD. 2001. One of two tandem Arabidopsis genes homologous to monosaccharide transporters is senescence-associated. *Plant Molecular Biology* **46**, 447-457.

Reinders A, Sivitz AB, Ward JM. 2012. Evolution of plant sucrose uptake transporters. *Front Plant Sci* **3**, 22.

Ruan YL. 2014. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annu Rev Plant Biol* **65**, 33-67.

Sauer N. 2007. Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Letters* **581**, 2309-2317.

Sauer N, Ludwig A, Knoblauch A, Rothe P, Gahrtz M, Klebl F. 2004. AtSUC8 and AtSUC9 encode functional sucrose transporters, but the closely related AtSUC6 and AtSUC7 genes encode aberrant proteins in different Arabidopsis ecotypes. *The Plant Journal* **40**, 120-130.

Schneider S, Hulpke S, Schulz A, Yaron I, Imlau A, Schmitt B, Batz B, Wolf S, Hedrich R, Sauer N. 2012. Vacuoles release sucrose via tonoplast-localised SUC4-type transporters. *Plant Biology* **14**, 325-336.

Seo PJ, Park JM, Kang SK, Kim SG, Park CM. 2011. An Arabidopsis senescence-associated protein SAG29 regulates cell viability under high salinity. *Planta* **233**, 189-200.

Sharma S, Verslues PE. 2010. Mechanisms independent of abscisic acid (ABA) or proline feedback have a predominant role in transcriptional regulation of proline metabolism during low water potential and stress recovery. *Plant Cell Environ* **33**, 1838-1851.

Sheen J. 1990. Metabolic repression of transcription in higher plants. *The Plant Cell* **2**, 1027-1038.

Siedlecka A, Krupa Z. 2002. Simple method of Arabidopsis thaliana cultivation in liquid nutrient medium. *Acta Physiologiae Plantarum* **24**, 163-166.

Sivitz AB, Reinders A, Johnson ME, Krentz AD, Grof CPL, Perroux JM, Ward JM. 2007. Arabidopsis Sucrose Transporter AtSUC9. High-Affinity Transport Activity, Intragenic Control of Expression, and Early Flowering Mutant Phenotype. *Plant Physiology* **143**, 188-198.

Sivitz AB, Reinders A, Ward JM. 2008. Arabidopsis Sucrose Transporter AtSUC1 Is Important for Pollen Germination and Sucrose-Induced Anthocyanin Accumulation. *Plant Physiology* **147**, 92-100.

Smeets K, Ruytinx J, Van Belleghem F, Semane B, Lin D, Vangronsveld J, Cuypers A. 2008. Critical evaluation and statistical validation of a hydroponic culture system for Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol Biochem* **46**, 212-218.

Smith AM, Stitt M. 2007. Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell Environ* **30**, 1126-1149.

Sperdouli I, Moustakas M. 2012. Interaction of proline, sugars, and anthocyanins during photosynthetic acclimation of Arabidopsis thaliana to drought stress. *Journal of Plant Physiology* **169**, 577-585.

Srivastava AC, Ganesan S, Ismail IO, Ayre BG. 2008. Functional Characterization of the Arabidopsis AtSUC2 Sucrose/H+ Symporter by Tissue-Specific Complementation Reveals an Essential Role in Phloem Loading But Not in Long-Distance Transport. *Plant Physiology* **148**, 200-211.

Stadler R, Lauterbach C, Sauer N. 2005. Cell-to-Cell Movement of Green Fluorescent Protein Reveals Post-Phloem Transport in the Outer Integument and Identifies Symplastic Domains in Arabidopsis Seeds and Embryos. *Plant Physiology* **139**, 701-712.

Stadler R, Sauer N. 1996. The Arabidopsis thaliana AtSUC2 Gene is Specifically Expressed in Companion Cells. *Botanica Acta* **109**, 299-306.

Stadler R, Truernit E, Gahrtz M, Sauer N. 1999. The AtSUC1 sucrose carrier may represent the osmotic driving force anther dehiscence and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **19**, 269-278.

Stessman D, Miller A, Spalding M, Rodermel S. 2002. Regulation of photosynthesis during Arabidopsis leaf development in continuous light. *Photosynthesis Research* **72**, 27-37.

Stitt M. 1991. Rising CO2 levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant Cell Environ* **14**, 741-762.

Stitt M. 1999. Nitrate regulation of metabolism and growth. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 178-186.

Stitt M, Zeeman SC. 2012. Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. *Curr Opin Plant Biol* **15**, 282-292.

Streb S, Zeeman SC. 2012. Starch metabolism in Arabidopsis. *Arabidopsis Book* **10**, e0160.

Sulpice R, Pyl E-T, Ishihara H, Trenkamp S, Steinfath M, Witucka-Wall H, Gibon Y, Usadel B, Poree F, Piques MC. 2009. Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 10348-10353.

Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2002. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* **29**, 417-426.

Toda T, Koyama H, Hara T. 1999. A Simple Hydroponic Culture Method for the Development of a Highly Viable Root System in Arabidopsis thaliana. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **63**, 210-212.

Troughton A. 1956. Studies on the growth of young grass plants with special reference to the relationship between the shoot and root systems. *Grass and Forage Science* **11**, 56-65.

Truernit E, Sauer N. 1995. The promoter of the Arabidopsis thaliana SUC2 sucrose-H + symporter gene directs expression of p-glucuronidase to the phloem: Evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta* **196**, 567-570.

Walter A, Schurr U. 2005. Dynamics of Leaf and Root Growth: Endogenous Control versus Environmental Impact. *Annals of Botany* **95**, 891-900.

Wardlaw IF. 1990. The control of carbon partitioning in plants. *New phytologist* **116**, 341-381.

Weraduwage SM, Chen J, Anozie FC, Morales A, Weise SE, Sharkey TD. 2015. The relationship between leaf area growth and biomass accumulation in Arabidopsis thaliana. *Front Plant Sci* **6**, 167.

Wiese A, Christ MM, Virnich O, Schurr U, Walter A. 2007. Spatio‐temporal leaf growth patterns of Arabidopsis thaliana and evidence for sugar control of the diel leaf growth cycle. *New phytologist* **174**, 752-761.

Wingler A, Marès M, Pourtau N. 2004. Spatial patterns and metabolic regulation of photosynthetic parameters during leaf senescence. *New Phytologist* **161**, 781-789.

Xiong L, Wang RG, Mao G, Koczan JM. 2006. Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic Acid. *Plant Physiol* **142**, 1065-1074.

Yang Z-B, Eticha D, Führs H, Heintz D, Ayoub D, Van Dorsselaer A, Schlingmann B, Rao IM, Braun H-P, Horst WJ. 2013. Proteomic and phosphoproteomic analysis of polyethylene glycol-induced osmotic stress in root tips of common bean (Phaseolus vulgaris L.). *Journal of Experimental Botany* **64**, 5569-5586.

Yazdanbakhsh N, Sulpice R, Graf A, Stitt M, Fisahn J. 2011. Circadian control of root elongation and C partitioning in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Environ* **34**, 877-894.

IV. Chapitre « Etude de l'allocation du carbone en réponse à la contrainte hydrique en rhizobox »

Avant propos

Après avoir étudié les relations source-puits pour le carbone au cours de la contrainte osmotique, nous avons revu le mode de culture des plantes, mais aussi le mode d'application de la réduction de la disponibilité en eau.

L'objectif de ce chapitre est d'analyser l'allocation du carbone chez *A. thaliana* en réponse à une contrainte hydrique appliquée en rhizobox, un système de culture conçu pour étudier facilement la racine cultivée au contact d'un vrai sol.

L'expression des transporteurs de saccharose a été mesurée en réponse à la contrainte hydrique dans les feuilles et les racines. Les contenus en sucres ainsi que l'allocation du carbone ont aussi étudiés en réponse à la contrainte hydrique. L'ensemble des résultats obtenues est discuté de manière intégrative afin d'avoir un aperçu des principaux acteurs entrant en jeu dans l'allocation du carbone entre rosette et racine.

L'architecture racinaire a aussi été étudiée et discutée vis-à-vis de l'investissement en carbone dans la racine, dans un contexte où la disponibilité en eau est réduite.

Water Deficit Enhances C Export to the Roots in *Arabidopsis thaliana* Plants with Contribution of Sucrose Transporters in Both Shoot and Roots[1][OPEN]

Mickaël Durand, Benoît Porcheron, Nils Hennion, Laurence Maurousset, Rémi Lemoine*, and Nathalie Pourtau

Université de Poitiers, Unité Mixte de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique 7267, Ecologie et Biologie des Interactions, 86073 Poitiers cedex 9, France

ORCID ID: 0000-0001-9877-3682 (N.H.).

Root high plasticity is an adaptation to its changing environment. Water deficit impairs growth, leading to sugar accumulation in leaves, part of which could be available to roots via sucrose (Suc) phloem transport. Phloem loading is widely described in Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), while unloading in roots is less understood. To gain information on leaf-to-root transport, a soil-based culture system was developed to monitor root system architecture in two dimensions. Under water deficit (50% of soil water-holding capacity), total root length was strongly reduced but the depth of root foraging and the shape of the root system were less affected, likely to improve water uptake. $^{14}CO_2$ pulse-chase experiments confirmed that water deficit enhanced carbon (C) export to the roots, as suggested by the increased root-to-shoot ratio. The transcript levels of *AtSWEET11* (for sugar will eventually be exported transporter), *AtSWEET12*, and *AtSUC2* (for Suc carrier) genes, all three involved in Suc phloem loading, were significantly up-regulated in leaves of water deficit plants, in accordance with the increase in C export from the leaves to the roots. Interestingly, the transcript levels of *AtSUC2* and *AtSWEET11* to *AtSWEET15* were also significantly higher in stressed roots, underlying the importance of Suc apoplastic unloading in Arabidopsis roots and a putative role for these Suc transporters in Suc unloading. These data demonstrate that, during water deficit, plants respond to growth limitation by allocating relatively more C to the roots to maintain an efficient root system and that a subset of Suc transporters is potentially involved in the flux of C to and in the roots.

The root system is crucial for the development of sessile plants not only because it anchors them to their substrate but also provides them with water and nutrients. There has been a renewed interest in studying root traits in relation to their foraging capacities both in the context of increased yield (Hammer et al., 2009; Tian and Doerner, 2013) and increased productivity under conditions such as drought (Comas et al., 2013). The depth of rooting is an important parameter for foraging capacities, but the overall distribution in roots in the soil (root system architecture [RSA]) has received attention in different research programs aimed at improving plant resistance to stress (Paez-Garcia et al., 2015).

The model plant Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) has been used to unravel the molecular basis of root traits because it can be easily cultured on agar medium. In Arabidopsis, the root system is formed through a reiterative program in which lateral roots are produced along the length of other roots. Despite this apparent simplicity, and even for genetically identical plants, root system development is highly plastic due to variations in its surrounding environment (e.g. nutrient shortage and water deficit; Satbhai et al., 2015).

When water availability is limited, Arabidopsis seedling primary root growth can be occasionally enhanced but usually reduced, depending on the constraint extent and its duration (van der Weele et al., 2000). Conversely, Arabidopsis lateral root growth is mainly inhibited in response to drought (Xiong et al., 2006). Restricting lateral proliferation and promoting depth growth is interpreted as an adaptive response to drought to improve water uptake. This root development pattern is partly associated with local soil water availability, since roots exhibit hydrotropism and hydropatterning (Takahashi et al., 2003; Bao et al., 2014).

Roots are a typical sink and depend exclusively on Suc imported from the source leaves. During the

[1] This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the University of Poitiers, the Région Poitou-Charentes, and the French Ministry of Research and Higher Education (to M.D. and N.H.).

* Address correspondence to remi.lemoine@univ-poitiers.fr.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) is: Rémi Lemoine (remi.lemoine@univ-poitiers.fr).

M.D. performed most of the experiments, conceived experiments and research plans, analyzed the data, and wrote the article; B.P. and N.H. provided technical support; L.M. performed the $^{14}CO_2$ pulse-chase experiments and data analyses; R.L. supervised the experiments, conceived research plans, and complemented the writing; N.P. conceived the rhizobox system and experiments, supervised experiments and research plans, and complemented the writing; M.D., L.M., R.L., and N.P. discussed the data and revised the article.

[OPEN] Articles can be viewed without a subscription.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.15.01926

 © 2016 American Society of Plant Biologists. All Rights Reserved.
Downloaded from www.plantphysiol.org on March 29, 2016 - Published by www.plant.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

vegetative stage, herbaceous plants are usually composed of one source (mature leaves) and two sinks (developing leaves and roots). For this reason, Suc transport in young seedlings of Arabidopsis has been studied in detail, and the different players involved in this transport have been characterized. In the source leaves, Suc is first released from the cytosol of phloem parenchyma cells to the apoplast surrounding the sieve element/companion cell complex through both AtSWEET11 (for sugar will eventually be exported transporter) and AtSWEET12 Suc effluxers (Chen et al., 2012). Second, Suc is loaded into the companion cell through the activity of the AtSUC2 (for Suc carrier) H^+:Suc symporter (Gottwald et al., 2000) and then passes across plasmodesmata to reach the sieve element, to be finally translocated to sink organs according to the bulk flow model (Münch, 1930). Suc unloading in sinks can occur along different pathways (Patrick, 1997), some of them involving Suc transporters. Any alteration in root growth due to environmental cues will immediately affect the demand on Suc from the source, leading to a new source/sink balance (Lemoine et al., 2013). For example, water deficit preferentially reduces shoot growth rather than root growth, causing an increased root-to-shoot (R/S) ratio because the growth of root and shoot exhibits different sensitivities to reduced water availability (Chaves et al., 2002; Sharp et al., 2004; Verslues et al., 2006). This supposes a reallocation of carbon (C) to the roots, even though C net assimilation rate is reduced because of the lower CO_2 diffusion caused by the limited stomatal aperture preventing water losses (Cornic, 2000). However, water deficit differentially alters rosette expansion and net photosynthesis, potentially resulting in an increased availability of C for the roots (Hummel et al., 2010).

The aim of this work was to investigate the C source/sink exchanges in Arabidopsis plants subjected to water shortage, with emphasis on the root system and on the Suc transporters involved in these exchanges. The expression of many Suc transporter genes has been reported in the roots of Arabidopsis, such as *SUC2* (Truernit and Sauer, 1995; Stadler and Sauer, 1996), *SUC1* (Sivitz et al., 2007, 2008), *SUC3* (Meyer et al., 2004), *SUC4* (Schneider et al., 2012), and *SUC5* (Baud et al., 2005). The expression of several *SWEET* Suc transporter genes has been suggested in roots since the demonstration of the proton-independent transport system of Suc in roots (Chaudhuri et al., 2008). However, the precise role of such Suc transporters in roots has been difficult to evaluate by experiments on mutants, especially for transporters with a strong activity in phloem loading (SUC2, SWEET11, and SWEET12), because the inhibition of phloem loading in leaves potentially masks effects in other organs such as roots.

The initial steps of root development in Arabidopsis are heavily documented (Casimiro et al., 2003; Luijten and Heidstra, 2009; Péret et al., 2009; Petricka et al., 2012), but most of those studies were run on young seedlings grown on agar plates in vitro. To be able to follow root development and architecture at later stages, we developed a rhizobox system where the roots are separated from the soil by a porous membrane with a mesh width that allows an exchange of solutes but does not allow roots to penetrate the soil. The rhizobox system used in this study allowed an almost instant harvest of the root system (for physiological, biochemical, and molecular analyses) and a precise study of the RSA of Arabidopsis in two dimensions.

Taking advantage of this system, we investigated C partitioning between shoot and root in well-watered (WW; 100% soil water-holding capacity) and water deficit (WD; 50% soil water-holding capacity) conditions, two water supplies supposed to lead to discriminating C allocation to the roots (Hummel et al., 2010; Muller et al., 2011). The rhizobox allowed a comparison of the root shape in both conditions, indicating subtle changes in the repartition of roots, and revealed increased C partitioning between shoot and root that are discussed together with variations in Suc transporter gene expression in shoot but also in root.

RESULTS

Choice of the Experimental Procedure

While most studies on root growth and development in Arabidopsis were conducted on seedlings grown in vitro, the data presented in this work were obtained on adult plants (30 d old) grown in rhizoboxes. The rhizobox was first introduced by Kuchenbuch and Jungk (1982) and Youssef and Chino (1988) and consists of a soil culture system where the root is separated from the soil by a porous membrane with a mesh facilitating the exchange of solutes but preventing roots from penetrating the soil. This culture system allows the precise study of RSA over a long period of time through a transparent Plexiglas plate as well as molecular and biochemical measurements on a clean (devoid of soil) and integral (including the finest roots and root hairs) root system. Moreover, this culture system allows the full development of Arabidopsis plants, from germination to seed harvest, and also a quick harvest of roots, without the need for time-consuming washes to clean soil from them, a step that may induce a bias in subsequent measurements. With the rhizobox used in this work (Fig. 1) and adapted from Xiong et al. (2006) and Wenzel et al. (2001), the roots grew between a Plexiglas plate and a nylon membrane (Sefar Nitex 03-7/2; mesh width = 0.7 μm) separating the roots from the soil. For WD experiments, the soil was maintained at two water regimes, WW (0.8 g water g^{-1} fresh soil) and WD (0.4 g water g^{-1} fresh soil). It has to be pointed out that 0.8 g water g^{-1} fresh soil corresponds to the water-holding capacity of the soil. Plants were grown until 30 d after sowing (DAS) to harvest sufficient amounts of material, especially in the case of WD roots. Beyond that date, roots of WW plants reached the bottom of the rhizobox, and this impeded RSA analysis.

Downloaded from www.plantphysiol.org on March 29, 2016 - Published by www.plant.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

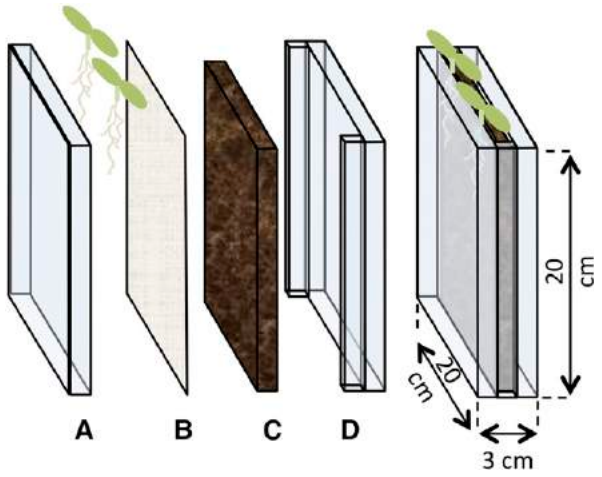


Figure 1. Description of the rhizobox growing system. Two to four plants are cultivated between a Plexiglas plate (A) and a nylon membrane (B) separating roots from the compost (C), itself enclosed in another Plexiglas plate (D). This system allows clean roots to be harvested and analysis of the two-dimensional RSA.

The RSA analysis (main and lateral root length, root system shape, and area colonized by roots) could not be performed directly on photographs of roots due to the lack of contrast preventing a clear separation of roots from the membrane background. Using high-resolution autoradiographs of the labeled root system, this problem was solved (see "Materials and Methods").

$^{14}CO_2$-labeling experiments were also run to study the dynamics of C source/sink allocation. A labeling chamber specific for rhizoboxes was designed (Fig. 2A) and integrated in a standard labeling system (Fig. 2B). Whole rosettes were labeled during a 15-min pulse followed by a 45-min chase period in ambient air, and then ^{14}C exported from the leaves to the roots was determined by counting radioactivity in the different parts of the plant (rosette and roots; Fig. 2C). Preliminary kinetic experiments demonstrated that a 45-min chase was sufficient to allow radiolabel to reach root tips in WW plants.

Water Deficit Reduces Biomass, But Leaf Growth Is More Affected Than Root Growth

From 0 to 30 DAS, leaf development was followed by regularly taking photographs (Fig. 3) that clearly indicated that leaf growth was reduced in WD plants, although no sign of wilting was visible.

The impact of water deficit was evaluated through a set of parameters related to growth and water status, measured on roots and leaves at 30 DAS. Water deficit reduced final leaf area (Fig. 3) by 4-fold (Table I). This reduction in leaf expansion came with a 30% reduction in leaf number. Rosette biomass, expressed as fresh weight and dry weight, decreased by about 80% in WD plants compared with WW plants (Table I). To check leaf water status, water content and osmotic potential were measured in WW and WD plants. The 50% reduction of water supplied to soil was sufficient to diminish leaf water content in WD plants (0.898) compared with WW plants (0.915). Interestingly, the dispersion of rosette water content values was very

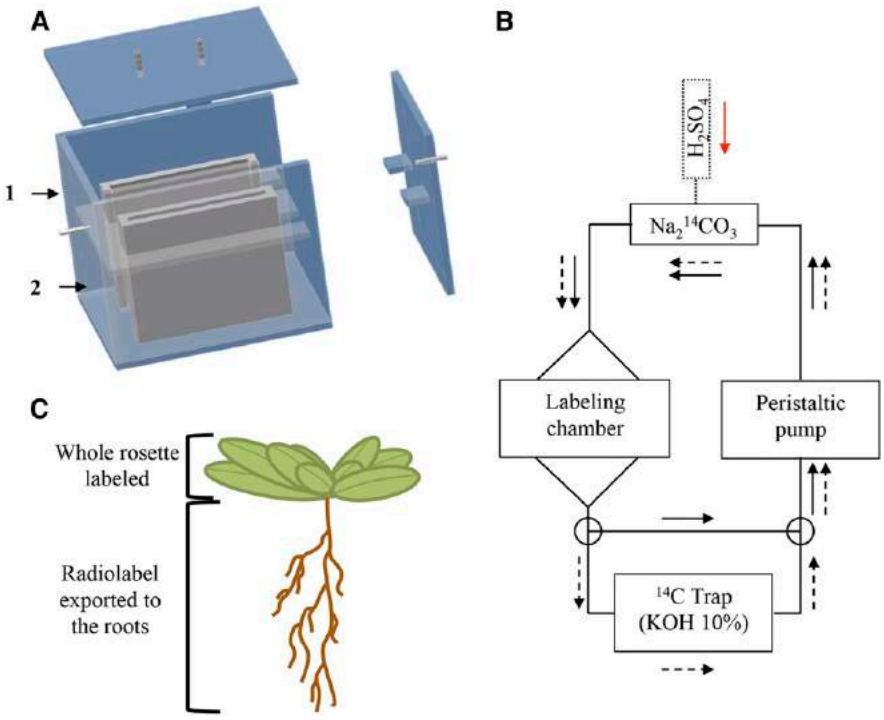


Figure 2. Description of the labeling chamber and protocol used for $^{14}CO_2$ pulse-chase experiments. A, The labeling chamber, built in Plexiglas, can contain two rhizoboxes and is separated into two compartments: one accessible to the radiolabeled air (1) and the other inaccessible (2). B, The system comprises a peristaltic pump, a vial containing the radiolabeled sodium bicarbonate ($^{14}CO_2$ generated with sulfuric acid injection; red arrow), the assimilation chamber, and a flask containing potash (10% KOH), which is dispersed in the system by the peristaltic pump (solid arrows for pulse, dashed arrows for trapping). C, Radiolabel measured in the roots corresponds to ^{14}C exported from the rosette to the roots.

Downloaded from www.plantphysiol.org on March 29, 2016 - Published by www.plant.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

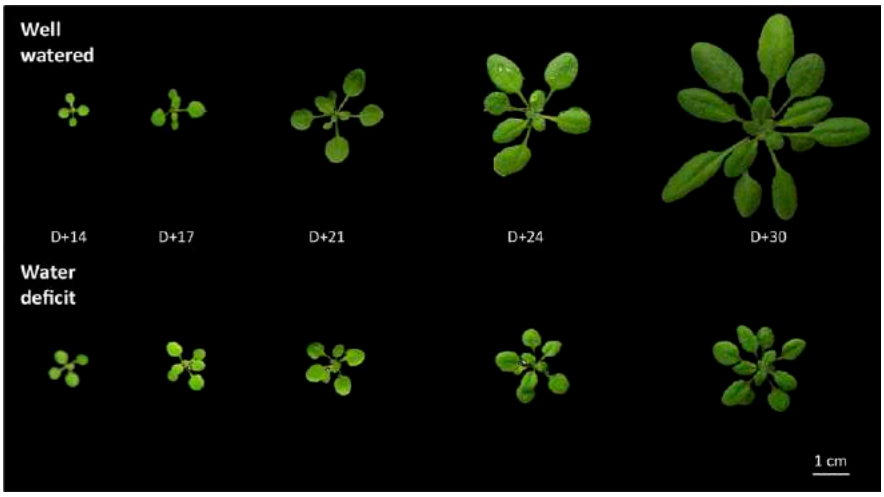


Figure 3. Top view of WW and WD whole rosettes. WW and WD whole rosettes are presented at selected DAS (D+14, D+21, D +24, and D+30). Water deficit started from sowing (D+0).

weak in WW and WD plants (Supplemental Fig. S1A). The rosette osmotic potential was also lower in WD plants (−1.101 MPa) than in WW plants (−0.898 MPa; Table I). The impact of water deficit was also evaluated at the molecular level in rosette by checking the expression of genes related to photosynthesis (*RIBULOSE BISPHOSPHATE CARBOXYLASE SMALL CHAIN1A* [*AtRBCS*] and *CHLOROPHYLL A/B-BINDING PROTEIN1* [*AtCAB1*]), to the establishment of water deficit (*RESPONSIVE TO DESICCATION29A* [*AtRD29a*]), and to senescence (*SENESCENCE-ASSOCIATED GENE12* [*AtSAG12*]). Water shortage negatively impacted *RBCS* expression (0.8-fold, $P < 0.01$), whereas *CAB1* expression was approximately the same in leaves of WW and WD plants (Fig. 4A). The transcript level of *RD29a*, a gene up-regulated by drought (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994), increased in response to water deficit in leaves compared with the control (1.7-fold, $P < 0.05$; Fig. 4B). *SAG12* was poorly expressed in WW leaves, and its expression remained constant in response to water deprivation (Fig. 4C).

In parallel to rosette biomass reduction, the fresh weight and dry weight of WD roots were diminished by about 80% and 65%, respectively. The smaller difference in root dry weight compared with rosette was the consequence of the strong reduction in water content of stressed root (0.921 [WW] and 0.861 [WD]; Table I). It has to be pointed out that the dispersion of water content values was more important in roots than in shoots, whatever the conditions, although the dispersion was higher under water deficit (Supplemental Fig. S1A). Several correlations between the parameters in roots and shoots were tested, but only decreased root water content was tightly associated with decreased rosette dry weight in WD plants (Supplemental Fig. S1B). Although the decrease in water content was larger in roots than in rosette, the reduction of dry weight was less important in root (65%) than in rosette (80%). This

Table I. *Impact of water deficit on a set of growth and water status parameters measured in roots and leaves*

All measurements were performed at 30 DAS. Projected leaf area (28–46 plants), leaf number (28–46 plants), rosette fresh weight (11–14 plants), rosette dry weight (11–14 plants), and rosette water content (11–14 plants) were measured on whole rosettes. Rosette osmotic potential (eight plants) was measured on a pool of three to five leaves. Measurements could not be made on individual roots because of entanglement but rather were made on roots from one rhizobox (two to three root systems). Root fresh weight (five to six rhizoboxes), root dry weight (five to six rhizoboxes), root water content (five to six rhizoboxes), and R/S ratio (five to six rhizoboxes) were measured. Data are means and (SE) of three independent experiments. Asterisks represent significant differences from WW plants as determined by Student's *t* test (*, $P < 0.005$).

Parameter	Unit	Treatment	
		WW	WD
Projected leaf area	cm^2	12.8 (0.6)	3.3 (0.2)*
Leaf number	–	16.6 (0.3)	11.7 (0.3)*
Rosette fresh weight	mg	268.6 (23.3)	48.4 (5.9)*
Rosette dry weight	mg	22.7 (1.8)	4.9 (0.6)*
Rosette water content	g water g^{-1} fresh weight	0.915 (0.002)	0.898 (0.002)*
Rosette osmotic potential	MPa	−0.863 (0.025)	−1.101 (0.034)*
Root fresh weight	mg	61.1 (8.5)	13.3 (2.5)*
Root dry weight	mg	4.6 (0.5)	1.6 (0.2)*
Root water content	g water g^{-1} fresh weight	0.921 (0.004)	0.861 (0.012)*
R/S ratio	–	0.2 (0.01)	0.35 (0.02)*

Downloaded from www.plantphysiol.org on March 29, 2016 - Published by www.plant.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

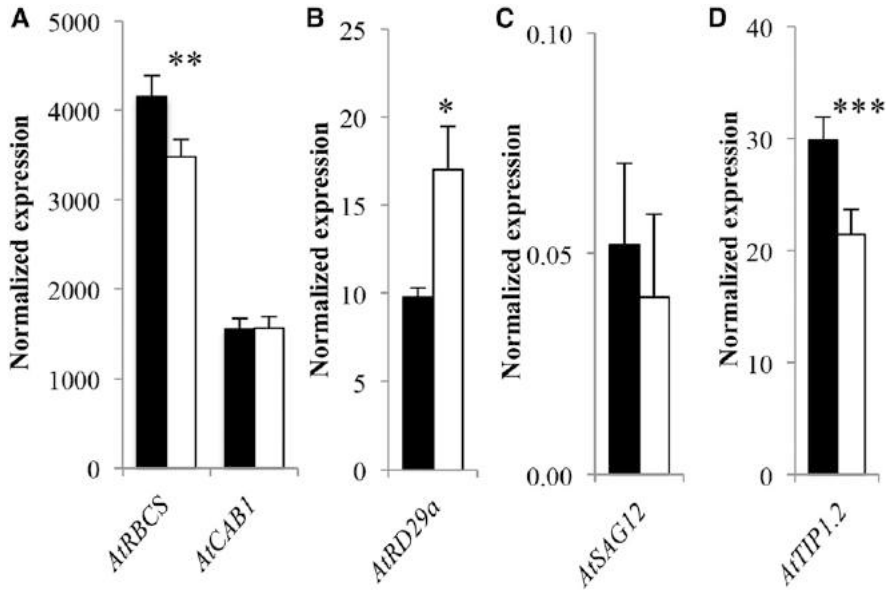


Figure 4. Impact of water deficit on a set of marker genes in leaves and roots. All measurements were performed in WW (black bars) and WD (white bars) plants at 30 DAS. Relative expression of *AtRBCS* and *AtCAB1* (A), *AtRD29a* (B), and *AtSAG12* (C) was measured by reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) in leaves; *AtTIP1.2* (D) expression was measured by RT-qPCR in roots. The expression of *AtRBCS* and *AtCAB1* (A), *AtRD29a* (B), *AtTIP1.2* (D), and *AtSAG12* (C) genes was measured to check photosynthesis (A), establishment of water deficit (B and D), and senescence (C). Data are normalized (no unit) to the expression level of the reference gene *At5g12240* (Czechowski et al., 2005) and are means ± SE obtained from the pool of plants ($n \geq 12$) of 11 independent experiments. Asterisks represent significant differences from WW plants as determined by a Two/K sample permutation test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; and ***, $P < 0.005$).

was confirmed by the much higher R/S ratio in WD plants (0.35) compared with WW plants (0.20; Table I). The higher R/S ratio was specific to water shortage, since this ratio was also greater when calculated from WD and WW plants of different ages but exhibiting the same leaf area (data not shown). According to this, the water deficiency applied to plants grown in rhizoboxes impacted leaf growth more than root growth. The impact of water deficit was also evaluated at the molecular level by checking the expression of genes related to the establishment of water deficit in root (*TONOPLAST INTRINSIC PROTEIN1;2* [*AtTIP1;2*]). The transcript level of *TIP1.2*, a gene negatively regulated by strong water stress (Alexandersson et al., 2005), decreased slightly in WD roots (0.7-fold, $P < 0.005$; Fig. 4D).

Plants Tend to Optimize the Surface of Soil Colonized by Roots under Water Deficit

Because rhizoboxes allowed the study of root development in two dimensions, the effect of water deficit on RSA, primary and total lateral root length, the soil area colonized by roots, and root system shape were analyzed at 30 DAS on WW and WD plants. Total lateral root length reached almost 2.5 m, whereas primary root length was only 16.5 cm, in WW plants (Fig. 5, A and B). The modeling of root shape allowed us to measure the area colonized by the root system. The root system of an individual plant, which consists essentially of lateral roots (93.5% of the total root length), colonized 13.4% of the available soil area (i.e. 48.3 cm^2 out of 360 cm^2 of total surface available [18 × 20 cm]; Fig. 5C).

Primary root length was reduced slightly in response to water deprivation (−9%), while total lateral root length was diminished dramatically in WD plants (−62%; Fig. 5, A and B). In contrast, soil area colonized by roots decreased only by about 35%, suggesting a better efficiency to colonize the wet soil of roots from the WD plants (Fig. 5C). Indeed, while 1 cm of WD roots explored on average 0.34 cm^2 of soil area, 1 cm of WW roots explored only 0.2 cm^2 of soil area. For each condition (WW and WD), 32 independent root systems were analyzed to model an average shape of the root system. This average shape showed that horizontal expansion of WD roots was reduced significantly down to 6 and 7 cm deep, on the right and left sides, respectively, compared with WW ones (Fig. 6A). This zone corresponds roughly to the shallow soil that alternately dries and wets because water was provided daily from the top of the rhizobox. Below 7 cm deep, no difference in horizontal expansion was observed between WW and WD roots. A statistical analysis of horizontal expansion as a function of depth was performed on shallow soil (to 8 cm deep), where significant differences were observed. Because the root system is approximately symmetric, analysis was averaged to one side by gathering data from the left and right sides of roots. From 0 to 5 cm deep, horizontal expansion

Downloaded from www.plantphysiol.org on March 29, 2016 - Published by www.plant.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

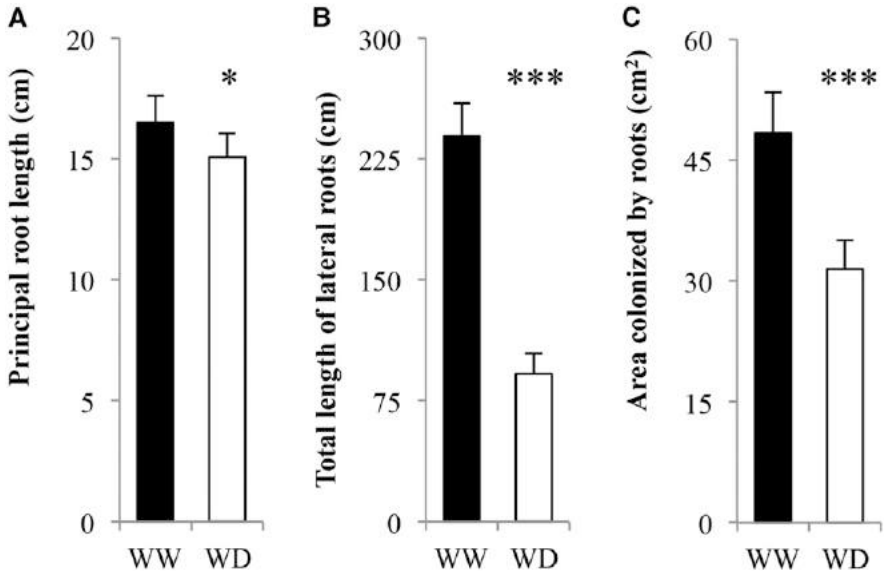


Figure 5. Impact of water deficit on RSA. All measurements were performed in WW (black bars) and WD (white bars) plants at 30 DAS. Length and area were measured on photographs of the radiolabeled root system scanned previously. A, Impact of water deficit on primary root length. B, Impact of water deficit on total length of lateral roots. C, Impact of water deficit on area colonized by roots. Data are means ± SE obtained from four to six plants of six independent experiments. Asterisks represent significant differences from WW plants as determined by a Two/K sample permutation test (*, $P < 0.05$ and ***, $P < 0.005$).

showed an increase, to reach 3.1 cm in WW plants. Then, horizontal expansion decreased progressively from 5 to 8 cm deep, to reach 2.5 cm (Fig. 6B). Horizontal expansion of WD plants was characterized by a smaller increase, to reach a maximum of 2.1 cm. Therefore, at 5 cm deep, horizontal expansion was reduced by 32% in WD root systems (Fig. 6B). Interestingly, below 10 cm, the lateral expansion of WD roots occasionally exceeded that of WW roots (Fig. 6A).

Taken together, these results show that differences in lateral root colonization were essentially caused by a lower expansion in WD roots compared with WW ones in the upper part of the soil. However, this resulted in a smaller reduction in colonized area compared with the reduction in root length, indicating a reshaping of root distribution.

Free Sugar Content Is Higher in Roots Than in Rosette and Increases in Source and Sink Organs after Water Deficit

The amounts of the three major soluble sugars (Suc, Glc, and Fru) and starch content were determined in leaves and roots of WW and WD plants. In the rosette, the sole source organ present at 30 DAS, Suc (12.3 μmol g^{-1} dry weight) was the most abundant sugar, followed by Glc (9.1 μmol g^{-1} dry weight) and Fru (1.9 μmol g^{-1} dry weight), in WW plants, and an important starch content (324.8 μmol g^{-1} dry weight) was detected (Fig. 7). All measurements were made on plants harvested at 1:30 PM, after 4.5 h of light, explaining the high starch content. In the root, an organ that fully depends on reduced C imported from the rosette, Suc (17.8 μmol g^{-1} dry weight) and Glc (18.5 μmol g^{-1} dry weight) are the two prominent sugars, followed by Fru (5 μmol g^{-1} dry weight), in WW plants (Fig. 7). Interestingly, the amounts of total soluble sugars were 1.8-fold higher in WW roots (41.4 μmol g^{-1} dry weight) than in WW leaves (23.3 μmol g^{-1} dry weight). In contrast, starch level was very low in the roots (5.7 μmol g^{-1} dry weight) compared with rosette (Fig. 7), a result expected, as the root is not a storage organ in Arabidopsis plants.

In WD plants, total soluble sugars increased dramatically in the rosette (62.4 μmol g^{-1} dry weight; i.e. an increase of 268% compared with WW). This increase was due mainly to Glc (+26.2 μmol g^{-1} dry weight; i.e. 67% of the increase) and to a lesser extent to Suc (+9 μmol g^{-1} dry weight; i.e. 23% of the increase; Fig. 7). It was interesting that sugar accumulation in leaves under water deficit had a marginal contribution to the osmotic potential (less than 2%). In parallel to the higher amount of free sugars in leaves, starch level decreased by about 25%. In the roots, free sugar contents increased also in response to water deprivation (87.7 μmol g^{-1} dry weight; +212%), but to a lesser extent than in the rosette (+268%; Fig. 7). In contrast to the leaves, the increase was mostly caused here by Suc (+23.3 μmol g^{-1} dry weight; i.e. 50% of the increase), although Glc still represented a significant part of the increase (+17.2 μmol g^{-1} dry weight; i.e. 37% of the increase). The starch level stayed very low and constant in the roots (Fig. 7).

Water Deficit Promotes the Export of Assimilated ^{14}C from the Rosette to the Roots

To get a more dynamic view on the impact of water deficit on C partitioning between rosette and root, $^{14}CO_2$ pulse-chase experiments were performed on WW and WD plants. After the chase period, rosette and roots were separated, quickly frozen at −80°C, and lyophilized before autoradiography (Fig. 8A) and radiolabel counting (Fig. 8, B–F). At the end of the pulse-chase experiment, the whole rosette was labeled whatever the condition. The youngest leaves, considered

Downloaded from www.plantphysiol.org on March 29, 2016 - Published by www.plant.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

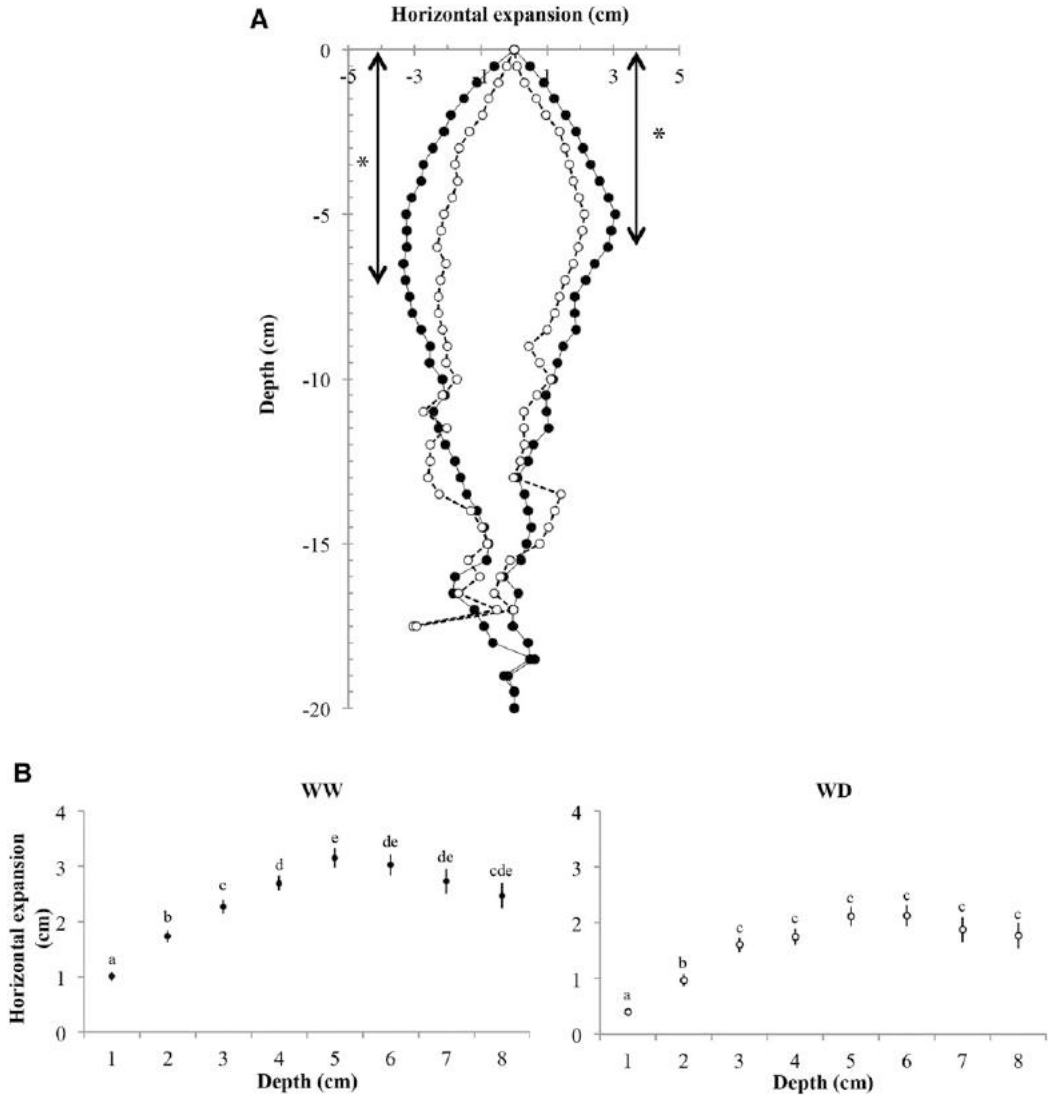


Figure 6. Impact of water deficit on the average shape of the root system. All measurements were performed in WW (black dots) and WD (white dots) plants at 30 DAS. A, Comparison of the average shape of the root system in WW and WD plants. The average shape of the root system is defined with a depth resolution (*y* coordinate) of 0.5 cm. The origin of the chart (0;0) corresponds to the point separating rosette from root. Data are means obtained from four to six plants of six independent experiments, and arrows accompanied by asterisks delimit the zone where lateral expansion of the WD root system is significantly different from lateral expansion of the WW root system, as determined by a Wilcoxon test (*, $P < 0.05$). B, Evolution of horizontal expansion of the average shape of the root system in WW and WD plants in shallow soil. Analysis was averaged to one side by gathering data from the left and right sides with a 1-cm depth resolution. The data set used comprises 32 root systems per condition. Different letters represent groups that were significantly different as determined by a Wilcoxon test followed by a multiple comparison test (false discovery rate adjustment; $P < 0.05$).

as sinks, were more intensively labeled because they imported ^{14}C during the chase period (red arrows in Fig 8A). Source leaves did not import ^{14}C during the chase period: if covered with aluminum foil during the pulse and chase to prevent photosynthesis, no labeling was detected. The root system was also entirely labeled, displaying the RSA (Fig. 8A). The fact that all roots were labeled was a good indication that they were all alive. In addition, a strong accumulation of radiolabel was noted in most root tips of WW plants, but this phenomenon was poorly observed in WD plants. Moreover, although most roots displayed root hairs, those were not detectable on autoradiographs, but this may be due to the resolution of the scanner used. It has to be pointed out that no radiolabel was found in root systems when a pulse-chase experiment was performed on plants whose rosette was cut off, indicating that all radiolabel recovered in roots came from $^{14}CO_2$ assimilation in leaves.

Assimilation, which corresponds of the total amount of ^{14}C recovered in a plant (rosette + roots) per leaf area unit, was reduced significantly by about 40% in response to water shortage (Fig. 8B). While 98% of total

Downloaded from www.plantphysiol.org on March 29, 2016 - Published by www.plant.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

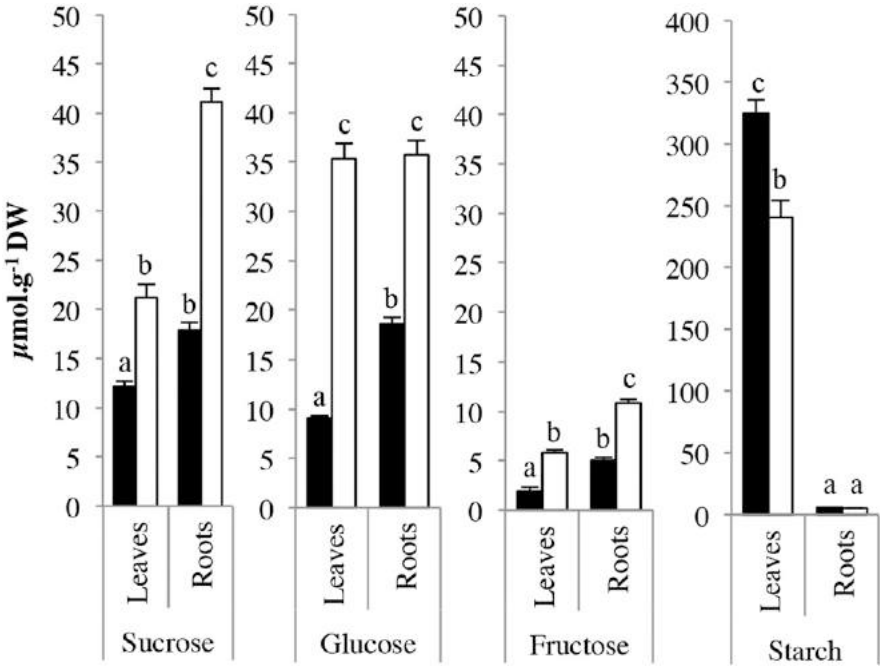


Figure 7. Impact of water deficit on sugar and starch contents in leaves and roots. All measurements were performed in WW (black bars) and WD (white bars) plants at 30 DAS. Sugar contents are expressed in μmol g^{-1} dry weight (DW). Starch content is expressed in μmol Glc equivalent g^{-1} dry weight. Data are means ± SE obtained from the pool of plants ($n \geq 12$) of three independent experiments. Different letters represent groups that were significantly different as determined by a Wilcoxon test followed by a multiple comparison test (false discovery rate adjustment; $P < 0.05$).

^{14}C incorporated during the pulse remained in the rosette of WW plants, 94% of label was retained in the rosette of WD plants (Fig. 8C). As a consequence, in percentage, 3 times more ^{14}C was exported to the root in WD plants compared with WW plants (Fig. 8D). Exported ^{14}C per unit of rosette dry weight was multiplied by about 1.8 with water deprivation (Fig. 8E). Therefore, the amount of ^{14}C imported per root dry weight unit increased by about 40% (Fig. 8F).

Relationships between rosette dry weight and C partitioning were established to provide some insights into the fine-tuning of C allocation. The study was performed using Pearson correlations (Fig. 9). ^{14}C assimilation (Fig. 9A), percentage of ^{14}C exported to roots (Fig. 9B), and amount of ^{14}C exported to roots (Fig. 9C) were not correlated with rosette dry weight in WW plants. Thus, whatever the rosette size, ^{14}C assimilation and ^{14}C allocation to the root were not altered in WW plants. In contrast, while ^{14}C assimilation was positively correlated to rosette dry weight under water deficit (Fig. 9A), percentage of ^{14}C exported to the roots (Fig. 9B) and amount of ^{14}C exported to the roots (Fig. 9C) were negatively correlated. Thus, the more reduced the size of the rosette, the more ^{14}C was allocated to roots.

Water Deficit Changes Transcript Levels of Suc Transporter Genes

The C source/sink allocation was altered by water deficit, and export of Suc, the long-distance form of C transport, was enhanced between leaf and root. To gain further insights on the effect of water deficit on the C source/sink allocation, the transcript level of Suc transporter genes was studied in roots and leaves of the same samples used for sugar analysis. Preliminary experiments were conducted to check for the absence/presence of expression of the nine *AtSUC* and seven *AtSWEET* (from clade III involved in Suc transport) genes in the leaves and roots of WW and WD plants by reverse transcription (RT)-PCR (primers are presented in Supplemental Table S1). Among the nine *AtSUC* genes, transcripts of *SUC6*, *SUC7*, *SUC8*, and *SUC9* were not detected in the roots and leaves in WD and WW conditions. No expression of *SWEET9* and *SWEET10* was detected in the leaves and roots, while *SWEET14* expression was measured in the roots but not in the leaves whatever the condition. In contrast, *SWEET11* expression was slightly or not detected in the root of WW plants. Following these results, the transcript levels of *SUC1*, *SUC2*, *SUC3*, *SUC4*, *SUC5*, *SWEET11*, *SWEET12*, *SWEET13*, and *SWEET15* were monitored by quantitative RT-PCR in both organs, while *SWEET14* expression was also assessed in roots.

In leaves, *AtSUC2*, a companion cell-specific Suc:H^+ symporter, was the most expressed *SUC* gene (Fig. 10A), as expected from its essential role for Suc translocation (Gottwald et al., 2000). Water deficit significantly promoted the expression of *SUC2* (1.4-fold, $P < 0.005$) compared with the control. In contrast, transcript levels of the four other *SUC* genes were clearly lower than *SUC2* in WD and WW leaves. Besides, *SUC3* and *SUC5* transcript levels were low in WW leaves and were repressed slightly in response to water deprivation (0.8-fold, $P < 0.01$ and 0.7-fold, $P < 0.05$, respectively). No significant change in *SUC1* and *SUC4* expression was observed in the leaves in response to water deficit (Fig. 10A).

Downloaded from www.plantphysiol.org on March 29, 2016 - Published by www.plant.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

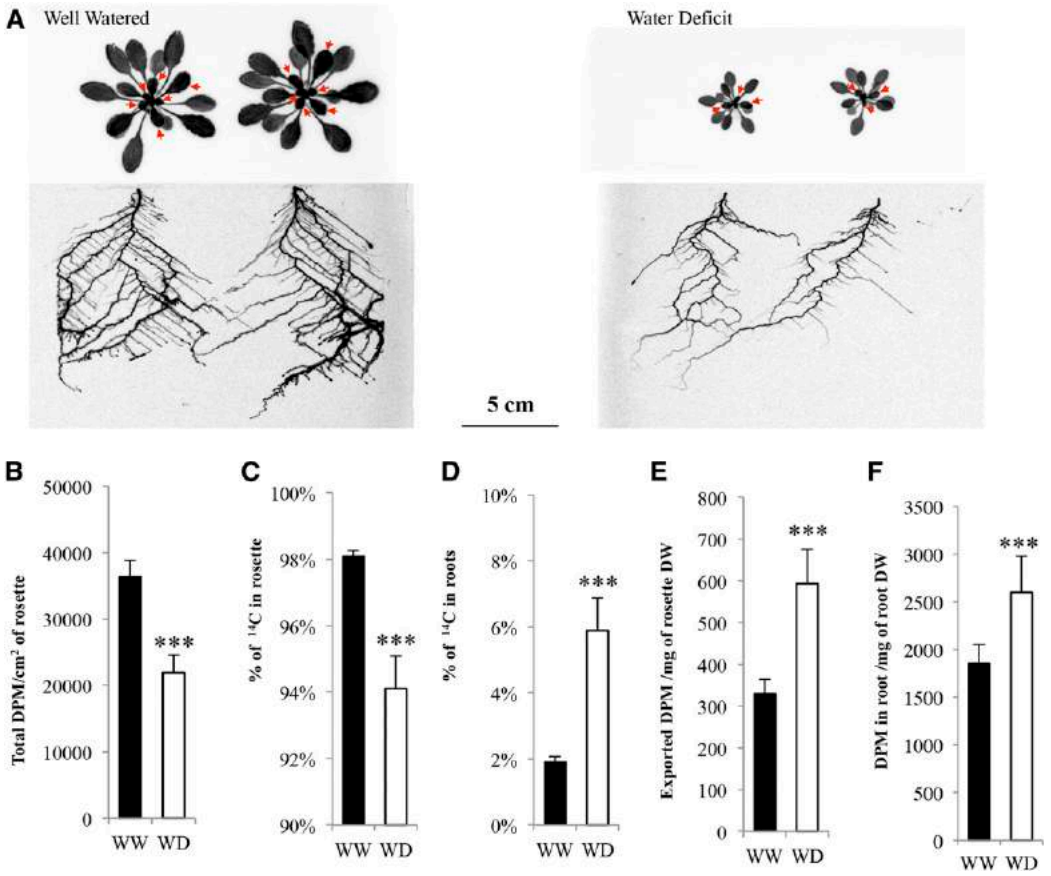


Figure 8. Impact of water deficit on $^{14}CO_2$ assimilation and ^{14}C export to the roots. All measurements were performed in WW (black bars) and WD (white bars) plants at 30 DAS. After a $^{14}CO_2$ pulse-chase experiment and lyophilization, plants were exposed on PhosphorImager screens (5 d) and scanned. A, Roots and rosettes of WW and WD plants were radiolabeled after a 45-min chase. Red arrows represent the most labeled leaves. B, Assimilated ^{14}C, defined as the total amount of ^{14}C measured in the plant per leaf area unit. C, Percentage of the total amount of ^{14}C found in rosette. D, Percentage of the total amount of ^{14}C found in root. E, Amount of ^{14}C exported per mg of rosette dry weight (DW). F, Amount of ^{14}C found in root per mg of root dry weight. Data are means ± SE obtained from six to seven plants of six independent experiments. Asterisks represent significant differences from WW plants as determined by a Two/K sample permutation test (***, $P < 0.005$).

In parallel, the transcript levels of the Suc effluxer genes *SWEET11* and *SWEET12*, which catalyze Suc efflux to the apoplast during phloem loading (Chen et al., 2012), were up-regulated in WD leaves (1.4-fold, $P < 0.01$ and 2-fold, $P < 0.01$, respectively). *SWEET13* transcripts were also more abundant after water deficit in leaves (1.7-fold, $P < 0.005$). *SWEET15*, also named *SAG29*, which was the lowest expressed *SWEET* gene in control conditions, was overexpressed and became the most expressed *SWEET* gene in leaves in response to water deficit (Fig. 10B).

In WW roots, *SUC1* transcripts were the most abundant of *SUC* genes, closely followed by *SUC2*. Since *SUC1* and *SUC2* expression decreased (0.2-fold, $P < 0.005$) and increased (2.3-fold, $P < 0.005$), respectively, in WD roots compared with WW roots, *SUC2* became the most expressed *SUC* gene in roots of WD plants. *SUC4* was slightly overexpressed in response to water deprivation (1.4-fold, $P < 0.005$). *SUC5* expression, which was marginal in control conditions, was inhibited in the stressed root compared with the control root (0.5-fold, $P < 0.05$). No significant change in *SUC3* expression was observed in the roots in response to water deficit (Fig. 11A).

Among the five *SWEET* genes studied in WW roots, *SWEET13* was the most expressed, followed by *SWEET12* and *SWEET14*, while the transcript levels of *SWEET11* and *SWEET15* were low. However, water shortage triggered a strong increase in transcript levels of *SWEET11* (27.3-fold, $P < 0.005$) and *SWEET15* (10.3-fold, $P < 0.005$), and to a lesser extent of *SWEET14* (5-fold, $P < 0.005$), *SWEET13* (4.2-fold, $P < 0.005$), and *SWEET12* (1.9-fold, $P < 0.01$), in the roots. Thus, *SWEET13* and *SWEET11* became the most expressed *SWEET* genes in the WD roots (Fig. 11B).

Generally, *SWEET* gene expression was lower than *SUC* gene expression in both organs and conditions. In addition, *SWEET* (*SWEET11*, *SWEET12*, *SWEET13*, *SWEET15*, and *SWEET14* if expressed) gene up-regulation was well coupled with *SUC2* gene overexpression in both organs under water deficit (Figs. 10 and 11).

Downloaded from www.plantphysiol.org on March 29, 2016 - Published by www.plant.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

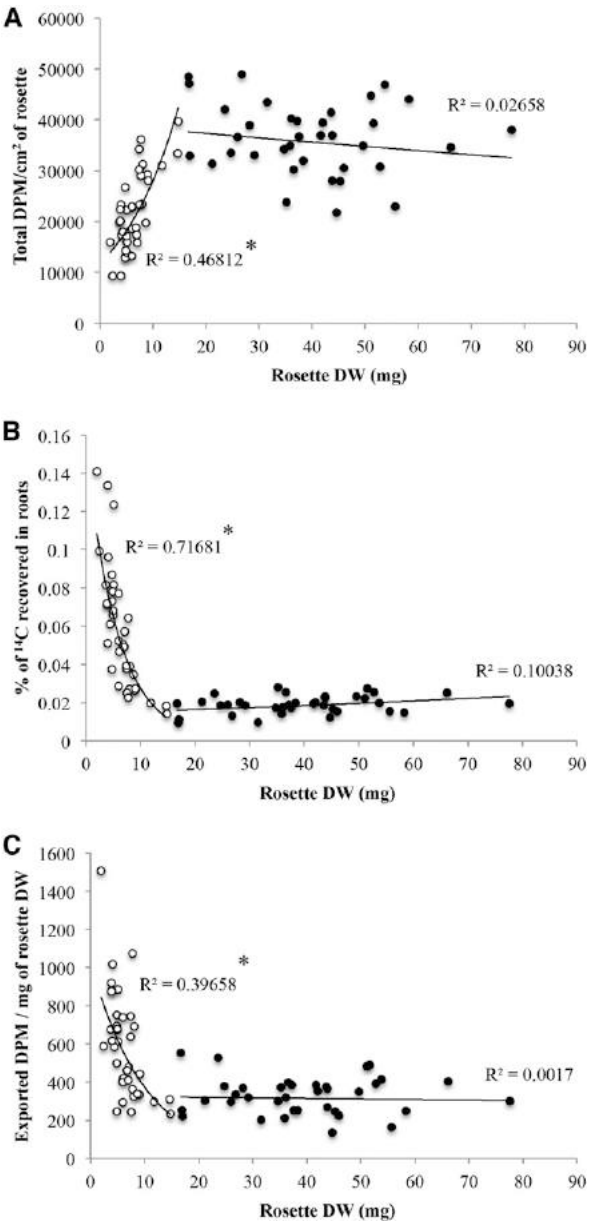


Figure 9. Relationship between rosette dry weight (DW) and ^{14}C partitioning parameters in WW and WD plants. A, ^{14}C assimilation as a function of rosette dry weight. B, Percentage of ^{14}C found in roots as a function of rosette dry weight. C, Amount of ^{14}C exported per rosette dry weight as a function of rosette dry weight. All measurements were performed in WW (black dots) and WD (white dots) plants at 30 DAS. Data used to perform correlations result from the $^{14}CO_2$ pulse-chase experiments displayed in Figure 7 ($n = 6$ or 7; six independent experiments). Asterisks represent significant correlations (*, $P < 0.005$) after a Pearson correlation test.

Water Deficit Delays Aging and Promotes Hexose Accumulation Independently from Senescence

Some elements, such as the up-regulation of the *SWEET15/SAG29* gene and the hexose accumulation noted in WD 30-d-old (30d) plants, are also reported in response to senescence-associated aging (Quirino et al., 2001; Seo et al., 2011). To distinguish the effects of water deficit from those due to aging, the experiment was extended to 49 DAS. A phenotype comparison between WW and WD plants was performed. The contents of the three major free sugars (Suc, Glc, and Fru) and starch

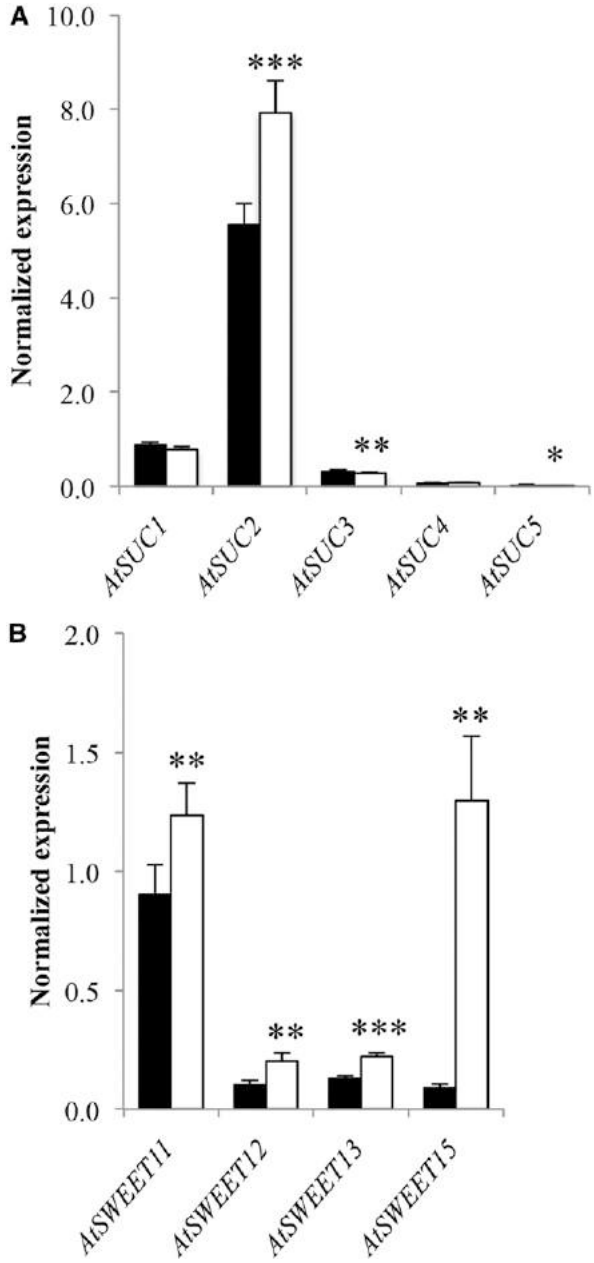


Figure 10. Impact of water deficit on specific AtSUC and AtSWEET genes expressed in leaves. All measurements were performed in WW (black bars) and WD (white bars) plants at 30 DAS. Relative expression of *AtSUC* (A) and *AtSWEET* (B) was measured by RT-qPCR. Data are normalized (no unit) to the expression level of the reference gene *At5g12240* (Czechowski et al., 2005) and are means ± SE obtained from the pool of plants ($n \geq 12$) of 11 independent experiments. Asterisks represent significant differences from WW plants as determined by a Two/K sample permutation test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; and ***, $P < 0.005$).

Downloaded from www.plantphysiol.org on March 29, 2016 - Published by www.plant.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

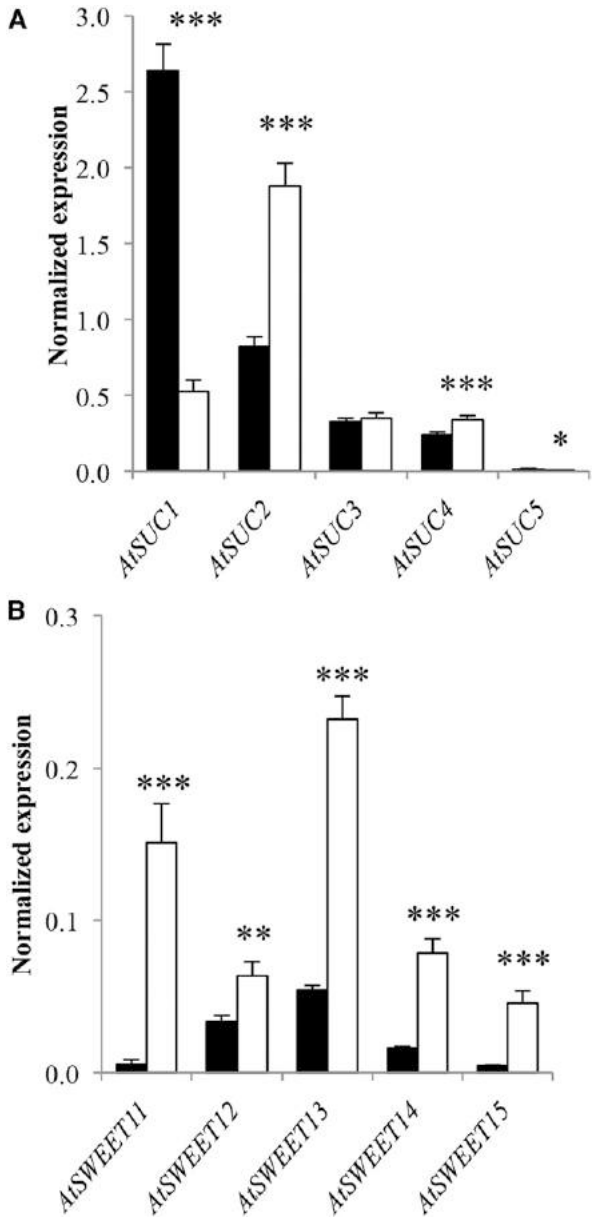


Figure 11. Impact of water deficit on specific AtSUC and AtSWEET genes expressed in roots. All measurements were performed in WW (black bars) and WD (white bars) plants at 30 DAS. Relative expression of *AtSUC* (A) and *AtSWEET* (B) was measured by RT-qPCR. Data are normalized (no unit) to the expression level of the reference gene *At5g12240* (Czechowski et al., 2005) and are means ± SE obtained from the pool of plants ($n \geq 12$) of 11 independent experiments. Asterisks represent significant differences from WW plants as determined by a Two/K sample permutation test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; and ***, $P < 0.005$).

content were determined and compared with corresponding 30d plants. In addition, the transcripts of genes related to photosynthesis (*RBCS* and *CAB1*) and senescence (*SAG12* and *SWEET15/SAG29*) as well as Suc transporter genes (*SUCs* and *SWEETs*) were monitored.

The phenotype observation on 49-d-old (49d) plants showed that WD plants were smaller than WW plants, as already noted at 30 DAS. A strong reddening was observed at the level of petioles in WW plants at 49 DAS, a phenomenon that was not detected in WD plants. Interestingly, bolting was initiated in some WW plants, indicating a switch from the vegetative to the reproductive stage. Conversely, the absence of emerging inflorescences in stressed plants suggests that they were still in the vegetative stage (Fig. 12A).

While Suc content was still higher in WD 49d leaves than in WW 49d ones, Suc content remained unchanged with aging in WW (WW 30d, 12.7 μmol g^{-1} dry weight; WW 49d, 13.1 μmol g^{-1} dry weight) and WD (WD 30d, 22.1 μmol g^{-1} dry weight; WD 49d, 20.5 μmol g^{-1} dry weight) leaves (Fig. 12B). The same trend for Suc content was also observed for the roots, suggesting that aging did not impact Suc content during this time span in both organs regardless of the water regime (Fig. 12B).

Glc content increased dramatically (9.6-fold) with aging in WW leaves (30d, 8.6 μmol g^{-1} dry weight; 49d, 82.7 μmol g^{-1} dry weight). An increase in Glc content was also observed in WD leaves (30d, 31.5 μmol g^{-1} dry weight; 49d, 66.1 μmol g^{-1} dry weight) with aging, but to a lesser extent (2.1-fold). As a result, Glc content was higher in WW leaves than in WD leaves at 49 DAS, but the difference was not statistically significant. In the roots, a slight increase in Glc content was observed in WW plants (30d, 21.6 μmol g^{-1} dry weight; 49d, 29 μmol g^{-1} dry weight) and WD plants (30d, 33.9 μmol g^{-1} dry weight; 49d, 41.24 μmol g^{-1} dry weight). However, Glc accumulation in response to water deficit was still noted at both stages of development (Fig. 12B). Similarly, Fru content changed with the same pattern in both organs with aging in WW and WD plants, but at lower levels (Fig. 12B).

Starch content increased marginally in WW leaves with development (30d, 340.8 μmol g^{-1} dry weight; 49d, 410.5 μmol g^{-1} dry weight; Fig. 12B). In the same time span, starch content in WD leaves (30d, 231.9 μmol g^{-1} dry weight; 49d, 174.9 μmol g^{-1} dry weight) decreased slightly (−25%) and remained always lower than in WW leaves. In root, starch content stayed weak and constant with development and water deficit (Fig. 12B).

The expression profile of Suc transporter genes in response to water deficit at 49 DAS was in agreement with the profile observed for 30d plants (Figs. 10 and 11). While *RBCS* transcript level decreased with aging in WW leaves, it remained stable in this time span in WD leaves. As a result, *RBCS* gene expression was lower in WW 49d leaves than in WD 49d leaves. In contrast, no change was seen in *CAB1* leaf expression, whether in response to water deprivation or aging (Fig. 12C). The *SAG12* gene, which was poorly expressed in WW 30d and WD 30d leaves, stayed at the same level in WD 49d leaves (Fig. 12C). However, its expression was clearly higher in WW 49d leaves. *SWEET15/SAG29* gene expression was weak and constant with development. In contrast, its expression remained always higher and constant in WD leaves than in WW ones, suggesting that its up-regulation in leaves was only due to water deficit and not aging.

Downloaded from www.plantphysiol.org on March 29, 2016 - Published by www.plant.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

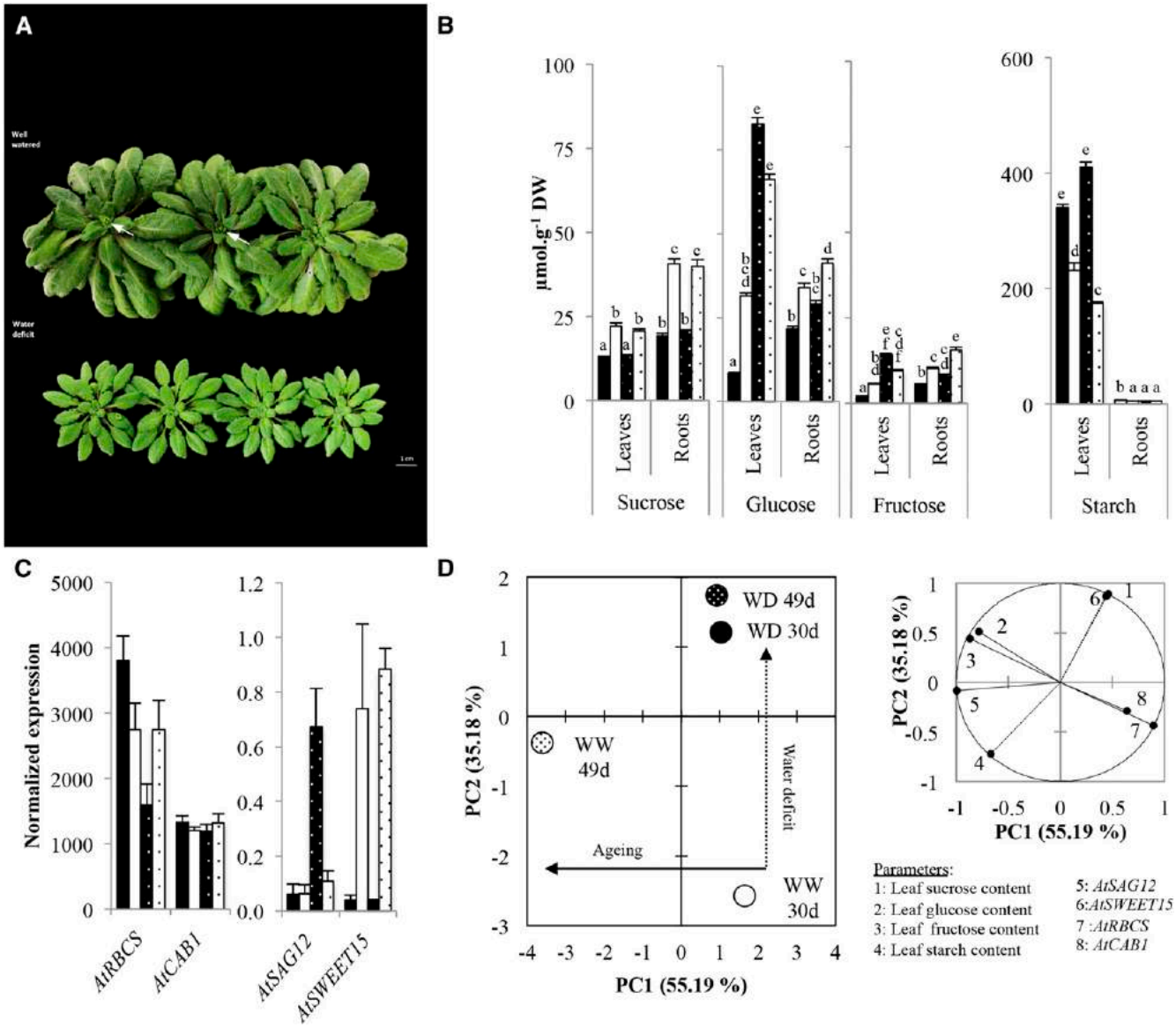


Figure 12. Comparison and impact of water deficit on shoot development, sugar and starch contents, and leaf gene expression at 30 and 49 DAS. A, Top view of WW and WD whole rosettes at 49 DAS. White arrows show inflorescence emergence. In B to D, black bars and circles, white bars and circles, black bars and circles with white dots, and white bars and circles with black dots represent 30d WW, 30d WD, 49d WW, and 49d WD plants, respectively. B, Comparison of sugar and starch contents at 30 and 49 DAS in leaves and roots. Different letters represent groups that were significantly different as determined by a Wilcoxon test followed by a multiple comparison test (false discovery rate adjustment; $P < 0.05$). C, Comparison of *AtSAG12*, *AtSWEET15*, *AtRBCS*, and *AtCAB1* gene expression at 30 and 49 DAS in leaves. D, Multivariate analysis of the impact of water deficit in leaves at 30 and 49 DAS on sugar and starch contents and gene expression related to senescence and photosynthesis in leaves. Principal component analysis shows the sample position in the plane defined by principal component 1 (PC1) and PC2, gathering 90% of the total variance (left). Dotted and solid arrows show the main trends relative to water deficit and aging, respectively. Variables used to perform principal component analysis are presented at right, with their projections in the plane defined by PC1 and PC2. Data at 30 DAS are from two experiments already presented in Figure 7 (sugar content) and Figures 4 and 10 (gene expression). Data are means ± SE obtained from the pool of plants ($n \geq 6$) of two independent experiments.

To further distinguish the effects of water deficit and aging on the rosette, a principal component analysis was performed using each condition as an individual and the parameters cited previously as variables (Fig. 12D). Principal components 1 and 2 explained 55.2% and 35.2% of the total variance. While principal component 1 was associated mainly with leaf content in Glc and Fru and the relative expression of *SAG12* and *RBCS*, principal component 2 was linked to leaf content in Suc and starch and *SWEET15* relative expression. The effects of aging and water deficit were clearly distinguished in accordance with principal components

Downloaded from www.plantphysiol.org on March 29, 2016 - Published by www.plant.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

1 and 2, respectively (Fig. 12D). Water deficit induced a shift in sample position in accordance with principal component 2 regardless of the development stage (30 or 49 DAS). In contrast, aging provoked a shift in sample position in accordance with principal component 1 for WW plants but not for WD plants.

DISCUSSION

Characterization of the Culture System

The aim of this work was the analysis of the shoot-root C partitioning in Arabidopsis in response to a mild and continuous water deficit, with an emphasis on events occurring in the roots. For this purpose, a culture system providing easy and quick access to the roots was required for molecular and biochemical analyses and for RSA monitoring. Moreover, plants had to be grown close to soil conditions, with the possibility of altering soil characteristics such as water content. Different culture systems, with only some of the desired characteristics, have been developed for Arabidopsis, based on plants grown on a thin layer of soil (Ara-rhizotron; Devienne-Barret et al., 2006) or on nylon membranes (rhizoponics; Mathieu et al., 2015). However, we decided to develop a system adapted from the rhizoboxes described by Xiong et al. (2006), where plants are separated from soil by a nylon membrane (Fig. 1). Plants were able to develop and produced seeds with no sign of mineral deficiency and with a healthy root system. Moreover, compared with plants grown in vitro, the roots were protected from light and were not fed with sugars in the medium.

Characterization of the Effects of Water Deficit Applied to Plants Grown in a Rhizobox

The plants were cultured with two different water regimes (WW and WD) corresponding to maximal and half-maximal water-holding capacity. The impact of water deficit on the physiological status of the roots and shoots was first characterized.

At the end of the experiment, the 30d WD plants displayed some of the typical responses of acclimation (Chaves et al., 2003), such as shoot growth inhibition (Fig. 3; Table I), increased R/S ratio (Table I), metabolic changes (Fig. 7), and variation in specific gene expression (Figs. 4, 10, and 11). The decrease in root water content (Table I) clearly reflected a reduction in soil water availability. Because roots are in direct contact with drying soil, they represent the first organ coping with soil moisture reduction. The water content was more reduced in the roots than in the rosette (Table I). Moreover, the scatter of rosette water content values around the mean was rather low but higher for root water content values in WD plants (Supplemental Fig. S1A). This may reflect an acclimation phenomenon to keep the rosette water content as stable as possible, while the root water content was adjusted to maintain the flux of water, which is linked to the difference between the soil and root water potential (Tardieu and Davies, 1993). Interestingly, leaf biomass decreased concomitantly with root water content under water deficit (Supplemental Fig. S1B). Thus, root dehydration in drying soil altered leaf growth (Supplemental Fig. S1B), likely because less water was delivered to the leaves (Westgate and Boyer, 1985; Davies et al., 1990). However, despite a reduced rosette water content (Table I), no sign of wilting was noticed during the experiments (Fig. 3), regardless of the plants. This could be due to an osmotic adjustment, as suggested by the decrease in leaf osmotic potential (Table I), thus avoiding a strong drop in turgor pressure (Hare et al., 1998). Altogether, these results highlight a fine-tuning in water utilization and loss, presumably by adjusting water uptake, growth, and transpiration to acclimate plants to a reduced supply of water (Chaves et al., 2003).

A strong reduction in leaf area and biomass was induced by water shortage (Fig. 3; Table I), another acclimation phenomenon, to restrict water losses by transpiration (Chaves et al., 2002). The water deficit strongly reduced the rosette area and, to a lesser extent, the leaf number (Table I). Therefore, the reduction in rosette area was due mainly to a decrease in individual leaf expansion, indicating that growth was more affected than development.

Root growth was strongly diminished (Table I; Fig. 5), but less than shoot growth, as indicated by the increased R/S ratio. Differences in the sensitivity of growth for both organs have been reported for several crop species (Sharp et al., 2004) and Arabidopsis plants under osmotic stress (van der Weele et al., 2000) or water deficit (Hummel et al., 2010). Sustained root growth at the expense of leaf is a major acclimation mechanism to maximize the water uptake and minimize water losses (Chaves et al., 2003; Verslues et al., 2006). While root biomass and total length of the lateral roots were strongly reduced by water deprivation (Table I), the length of the primary root was only a little shorter (Fig. 5). Thus, in response to a moderate water deficit, the primary root still grew at an appreciable rate while the elongation rate of the lateral roots was inhibited (Fig. 5). This is in accordance with van der Weele et al. (2000) and could be interpreted as a strategy to improve the depth exploration of the soil to reach wetter zones. Experiments on root patterning allowed further investigation of root growth. The average shapes of both WW and WD roots were rather similar, except in shallow soil (Fig. 5). This indicates that the density of the roots was lower in WD plants but that the soil area explored was more or less maintained between both WD and WW plants. In maize (*Zea mays*), the study of recombinant inbred lines with contrasting lateral root number and length demonstrated that plants with reduced lateral root density were more tolerant to drought (Zhan et al., 2015). This was related to a reduced metabolic investment in soil exploration, thus favoring the acquisition of limited resources such

Downloaded from www.plantphysiol.org on March 29, 2016 - Published by www.plant.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

as water. Remarkably, those results were confirmed in field-grown plants and also in plants grown on mesocosms, a culture system with many similarities to the rhizobox used in this study. The soil area explored by roots was thus less affected than the total length of lateral roots, suggesting a more efficient positioning of roots for WD plants (Fig. 5), presumably to improve the likelihood of finding a wetter soil area. Indeed, it has been demonstrated that roots exhibit hydrotropism (Takahashi et al., 2003) and hydropatterning (Bao et al., 2014) to control root orientation and the positions of lateral roots along the main root, respectively. The reduction in the area explored by WD roots was observed mainly in shallow soil (Fig. 5), since the area colonized was similar deeper in the rhizobox (Fig. 6). In rhizoboxes as in natural conditions, soil dried from the surface in contact with air; thus, shallow soil was subjected to daily variations in water content caused by evaporation-watering cycles. In contrast, bottom soil was characterized by constant soil water content during plant growth. Deak and Malamy (2005) speculated that Arabidopsis plants optimize their root system by repressing root proliferation into regions where less water is available. This is in accordance with our data showing that the extent of lateral proliferation was clearly lower in shallow soil in response to water deficit (Fig. 6). Altogether, these data demonstrate that plants coping with water deficit acclimated by sustaining growth into deeper soil (Fig. 5), while lateral root proliferation was mostly inhibited in shallow soil (Fig. 6), to maintain soil exploration and water uptake in a metabolically efficient way. This confirms that plants exhibit a high degree of phenotypic plasticity by adjusting root growth rate, root growth direction, and root branching to efficiently explore soil (Satbhai et al., 2015).

Although the water deficit applied to plants grown in rhizoboxes was moderate, it generated changes in the expression of water deficit-responsive genes. Indeed, overexpression of the *RD29a* gene (Chen et al., 2005; Xiong et al., 2006; Ramírez et al., 2009; Sharma and Verslues, 2010; Yamada et al., 2011) in WD leaves (Fig. 4B) and down-regulation of the *TIP1.2* gene (Alexandersson et al., 2005; Boursiac et al., 2005) in WD roots (Fig. 4D) confirmed the occurrence of molecular perception of water deficit in both organs (Harb et al., 2010).

Taken together, our results give evidence that a continuous and moderate water deficit applied to plants grown in rhizoboxes produced classical responses to water shortage at the molecular and physiological levels in both shoots and roots and that rhizoboxes are well suited for studying the effect of water deficit, particularly in roots.

In Leaves, Water Deficit Triggered Higher Sugar Content, Which Could Support Enhanced Phloem Loading

An accumulation of sugars was observed in leaves under water deficit (Fig. 7), as reported already in Arabidopsis (Taji et al., 2002; Hummel et al., 2010; Sperdouli and Moustakas, 2012), grapevine (*Vitis vinifera*; Cramer et al., 2007; Medici et al., 2014), and maize (Kim et al., 2000). In accordance with Hummel et al. (2010), this increase accounted for a marginal part of the decrease in leaf osmotic potential (less than 2%), suggesting another role for the accumulation of sugars in this organ. Starch content, although lower under WD, remained at an appreciable level at midday (Fig. 7). The changes in starch and free sugar contents (Fig. 7) suggest that moderate water deficit did not lead to sugar starvation, as reported in trees (McDowell, 2011), but rather to an increase in free sugars available, despite a reduced ^{14}C assimilation (Fig. 8B). The reduction in ^{14}C assimilated (Fig. 8B) on a leaf area basis is certainly caused by a restricted CO_2 diffusion (decreased stomatal conductance plus decreased mesophyll conductance; Flexas et al., 2006a) as a consequence of moderate water deficit. Nevertheless, a slight decrease in *RBCS* transcripts occurred (Fig. 4A), as in tobacco (*Nicotiana tabacum*; Kawaguchi et al., 2003) or tomato (*Solanum lycopersicum*; Bartholomew et al., 1991) subjected to water deficit. This suggests that metabolic impairment also may occur (Flexas et al., 2006a) through mechanisms involving gene repression when stomatal closure develops over several days (Flexas et al., 2006b). The reduction in *RBCS* transcripts (Fig. 4A) also could be related to higher soluble sugar contents (Fig. 7), since photosynthetic gene expression is inhibited by high carbohydrate contents (Sheen, 1990; Krapp et al., 1993; Van Oosten and Besford, 1994). In this context, higher sugar contents would represent a basic mechanism for the regulation of photosynthesis by sink organs (Krapp et al., 1993) when the production of photoassimilates significantly exceeds the sink capacity to use them. Indeed, leaf growth is reduced earlier and more intensively than photosynthesis (Muller et al., 2011), resulting in an increase in the content of soluble sugars (Fig. 7), despite photosynthesis decline under water deficit (Quick et al., 1992; Hummel et al., 2010). The products of photosynthesis are tightly tuned to the plant demand (Ainsworth and Bush, 2011), and despite a reduced C demand for growth, Suc increased (Fig. 7), although its level is reported to be rather constant (Stitt and Zeeman, 2012). Hummel et al. (2010) proposed that the excess C not used by the leaf for growth, respiration, and osmotic adjustment could be exported to the roots.

Based on this hypothesis, $^{14}CO_2$ pulse-chase experiments were carried out to establish if water deficit enhanced ^{14}C allocation to the roots. Pulse-chase experiments first demonstrated that $^{14}CO_2$ assimilation was reduced under water deficit (Fig. 8B), agreeing with decreased *RBCS* level transcripts (Fig. 4A) and leaf growth reduction (Fig. 3; Table I). As expected from the increased R/S ratio, a greater part of ^{14}C was allocated to roots in WD plants (Fig. 8D). In addition, even though $^{14}CO_2$ assimilation was reduced (Fig. 8B), greater amounts of ^{14}C per rosette dry weight unit were transferred to the roots under water deficit (Fig. 8E). In accordance with the hypothesis by Hummel et al.

Downloaded from www.plantphysiol.org on March 29, 2016 - Published by www.plant.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

(2010), we demonstrate that a moderate water deficit enhanced C export from the leaves to the roots (Fig. 8), at least during the light period. In contrast, the lower proportion of root tips radiolabeled in WD plants might suggest that the velocity of phloem sap was reduced. Wardlaw (1969) underlined the tight relationship existing between the slower growth induced by water deficit and the reduced velocity of photoassimilate movement in wheat (*Triticum aestivum*). In addition, several studies focusing on the allocation of assimilated C between source and sinks found that the translocation of recently assimilated C from source leaves to sinks was delayed under water deficit (Plaut and Reinhold, 1965; Wardlaw, 1969; Deng et al., 1990; Li et al., 2003; Ruehr et al., 2009). A modeling experiment (Hölttä et al., 2009) suggested that decreasing xylem water potential under water deficit also limits sugar transport in the phloem, due to limited xylem-phloem water exchange (Sevanto, 2014). Our results indicate that C export to the roots was enhanced under water deficit (Fig. 8), even though the velocity of phloem sap was probably reduced, at least during the chase period. Because ^{14}C allocation to root depends on the rate of phloem loading and the velocity of phloem sap, we propose that phloem loading was enhanced, leading to a higher Suc concentration in the phloem sap in WD plants. The enhanced phloem loading is consistent with the fact that a higher sugar concentration is needed in the phloem to attract water from the xylem when water availability is reduced (Hölttä et al., 2009).

There was also a tight relationship between leaf growth and C export to the roots (Fig. 9). The rosette biomass under water deficit was negatively correlated with the proportion of ^{14}C recovered in the roots (Fig. 9B) and ^{14}C exported to the roots per leaf dry weight unit (Fig. 9C). Thus, the more reduced leaf growth was by water deficit, the greater proportion and amount (per g of leaf dry weight) of assimilated C were exported to the roots. This result highlights that the decrease in leaf growth may have resulted in a higher pool of C available for export to the roots, as suggested previously by Hummel et al. (2010).

The enhanced Suc phloem loading could be supported by an increased activity of Suc transporters. In Arabidopsis, Suc is apoplastically loaded into the phloem companion cell in minor and major veins of source leaves and translocated to sinks in the phloem sap. AtSWEET11 and AtSWEE12 (plasma-membrane Suc effluxers; Chen et al., 2012) release Suc from mesophyll cells or phloem parenchyma cells into the apoplast prior to loading. Then, the companion cell Suc-specific Suc:H^+ symporter AtSUC2 loads Suc into the phloem (Truernit and Sauer, 1995; Stadler and Sauer, 1996; Gottwald et al., 2000). In potato (*Solanum tuberosum*), tobacco, and sugar beet (*Beta vulgaris*), transcript levels of *SUC2/SUT1* are tightly correlated to [^{14}C]Suc uptake in plasma membrane vesicles (Lemoine et al., 1996; Vaughn et al., 2002; Leggewie et al., 2003). In Arabidopsis, recent studies demonstrated that the up-regulation of *SUC2* results in enhanced [^{14}C]Suc uptake into the veins of leaf discs, which entails higher phloem loading and a greater part of ^{14}C being exported to the roots (Dasgupta et al., 2014). Therefore, it is reasonable to conclude that the increase in Suc transporter gene expression relates to an increased Suc transport activity. In accordance with a putative increased phloem loading, our data confirmed that *AtSWEET11*, *AtSWEET12*, and *AtSUC2* genes were up-regulated in leaves during water deficit (Fig. 10). *SWEET13*, a Suc effluxer that was up-regulated in the *sweet11/sweet12* double mutant and, therefore, could contribute to the first step of phloem loading (Chen et al., 2012), was also induced (Fig. 10), supporting this hypothesis. Several other results provide evidence that leaf Suc transporter gene expression is tuned by water deficit (Fig. 10), as in grapevine (Medici et al., 2014), rice (*Oryza sativa*; Ibraheem et al., 2011), and Arabidopsis (Gong et al., 2015). As source strength is defined as the ability to export sugar to sinks, our data demonstrate that the leaves of WD plants were a stronger source when the data were weighted by leaf mass. The enhanced C export to roots could be interpreted as a fine-tuned way to maintain phloem transport under reduced water availability.

Roots under Water Deficit: Highlight on the Hidden Half of the Plant

The growth and development of sink organs, such as roots, depend on C supply by sources. The growth and development of roots are related to local hexose concentration, released from unloaded and cleaved Suc, in Arabidopsis (Freixes et al., 2002). Indeed, the elongation rate of primary and secondary root is under the control of C availability when water supply is not limited (Freixes et al., 2002; Muller et al., 2011). However, this tight relationship between C availability and root growth seemed to disappear under water deficit. Reduced WD root growth did not seem to be caused by carbon starvation, as sugars and ^{14}C accumulated in the roots (Figs. 7 and 8F). Indeed, C export to the roots was even enhanced, resulting in a higher R/S ratio, suggesting that the WD plants invested more C in their roots. Increasing C allocation to roots has been described as a strategy to resist water deficit in a drought-tolerant genotype of wheat (Nicolas et al., 1985).

However, it has to be pointed out that sugar accumulation also could be linked to changes in metabolism. For example, Nicolas et al. (1985) reported that lower root respiration of the drought-tolerant genotype of wheat compared with the sensitive one contributed to more sugar accumulation in roots of the tolerant genotype under drought.

Nevertheless, sugars have to be unloaded in the root cells in order to sustain the hydrostatic pressure gradient between source and sink organs and maintain phloem sap flow. Phloem unloading occurs in a symplastic way on a relatively small proportion of the root (i.e. the growing root tip; Oparka et al., 1994). Indeed, phloem transport seems to be symplastically isolated

Downloaded from www.plantphysiol.org on March 29, 2016 - Published by www.plant.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

(Kempers et al., 1998), suggesting apoplastic unloading along the whole phloem path. Since Suc apoplastic unloading requires Suc transporters, we investigated which of those were expressed in roots and responsible for this function.

In 30d WW roots, the analysis of transcript levels of the nine *SUCs* revealed that five of them were expressed in roots, namely *SUC1*, *SUC2*, *SUC3*, *SUC4*, and *SUC5*, even though the latter was poorly expressed. SUC1-induced transport of Suc in the pollen tube was tightly linked to an increased turgor of the pollen tube for growth (Stadler et al., 1999). A similar function in the root cannot be excluded, since *SUC1* is expressed in growing areas of the roots (Sivitz et al., 2007). Therefore, decreased *SUC1* expression (Fig. 11A) might be associated with the reduced root growth observed (Fig. 6; Table I) and, more particularly, with a reduction in the proportion of growing areas of the root (fewer lateral roots). SUC4, as a Suc:H^+ symporter, translocates Suc from the vacuole to the cytosol in the natural environment of the Arabidopsis cell (Schulz et al., 2011). Under water deficit, its up-regulation (Fig. 11A) may contribute to regulating the transport and vacuolar storage of Suc into the root cells. However, SUC2 is important for the retrieval of leaked Suc into the phloem of Arabidopsis (Srivastava et al., 2008; Gould et al., 2012). A higher transcript level of *SUC2* (Fig. 11A) could be associated with a greater need for Suc retrieval along the phloem pathway, since C export to the root was enhanced (Fig. 8), under water deficit. Because ZmSUT1, an ortholog of AtSUC2 in maize, has been demonstrated to mediate Suc efflux into sinks (Carpaneto et al., 2005), SUC2 also may be involved in phloem unloading. Thus, its up-regulation in roots (Fig. 11A), under water deficit, also may favor Suc unloading in the "release phloem". As a result, this would allow phloem sap movement by maintaining the hydrostatic pressure gradient between leaves and roots. *SWEET11* to *SWEET15* were overexpressed in WD roots (Fig. 11B), perhaps to support the increased Suc efflux from the transported phloem to the surrounding tissue, as it has been proposed that SWEETs might be involved in Suc leakage during phloem transport (Ludewig and Flügge, 2013; Chen, 2014). AtSWEET11 and AtSWEET12 were recently demonstrated to transport hexoses and participate in the delivery of sugars to secondary xylem (Le Hir et al., 2015). The root systems of 30d plants contained large secondary structures in their conducting tissues; therefore, we cannot rule out a similar role for AtSWEET11 and AtSWEET12. Interestingly, as observed in the rosette, there was a co-up-regulation of *SUC2* and *SWEET* genes in the roots under water deficit, underlying a similar response pattern in source and sink organs, a quite unexpected result.

These data provide evidence for a transcriptional regulation of root Suc transporter expression in response to water deficit (Fig. 11). The origin of this regulation remains unknown but could be related either to the increase in sugar concentration in the roots or to a not yet demonstrated direct regulation by water status. However, according to the push hypothesis of shoot-root interaction (Farrar and Jones, 2000), the up-regulation of *SUC2* and *SWEET11* to *SWEET15* genes in WD root (Fig. 11) could contribute to draining the C from the shoot. Water deficit seemed to enhance source strength, but it cannot be excluded that root sink strength was also increased to support the increased C export.

Overexpression of the *SWEET15/SAG29* Gene in Leaves Was Water Deficit Dependent

SWEET15/SAG29 gene induction in leaves was described previously as a senescence-associated process (Quirino et al., 1999), and induction of leaf senescence by abiotic stress has been widely reported (Buchanan-Wollaston, 1997; Lim et al., 2007; Wingler and Roitsch, 2008). Therefore, *SWEET15/SAG29* induction in WD leaves, together with an increase in sugar, could be attributed to either water deficit or accelerated senescence. To clearly distinguish both effects, the water deficit experiment was extended to 49 d to check if senescence-associated events would be induced further. Sugar accumulation is tightly correlated to leaf senescence in Arabidopsis (Quirino et al., 2001) because senescence is responsive to sugars (Pourtau et al., 2006). In WW leaves, a stronger hexose accumulation with aging, coupled with a higher *AtSAG12* transcript level, a highly senescence-specific gene (Gan and Amasino, 1995), indicate leaf aging-related senescence at 49 DAS (Fig. 12, B and C). In addition, *RBCS* expression decreased in WW plants, and many plants displayed bolting. On the contrary, in WD plants, the *AtSAG12* transcript level stayed low and constant and *RBCS* expression remained stable (Ludewig and Sonnewald, 2000). Finally, WD plants also displayed a late flowering time (Fig. 12A), which is in agreement with a delay in senescence, since senescence induction is linked to floral initiation in Arabidopsis (Wingler and Roitsch, 2008). Delaying floral initiation allows more time to accumulate vegetative biomass to be remobilized later toward seeds (Metcalf and Mitchell-Olds, 2009). To conclude, there are numerous clues that *SWEET15/SAG29* up-regulation, in WD 49d leaves (Fig. 12C) displaying delayed senescence, was rather specific to moderate water deficit. Its potential role in the redistribution of Suc in plants may have to be reassessed in the light of these results.

CONCLUSION

The design and use of rhizoboxes allowed us to precisely study the response of the Arabidopsis root system to a mild drought and to relate this response to C allocation. Despite a much shorter total root length in WD plants, the surface explored by the roots was less affected than in WW plants. This is in agreement with previous results showing that plants can acclimate by reshaping their root systems. In parallel to this

Downloaded from www.plantphysiol.org on March 29, 2016 - Published by www.plant.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

reshaping, a significant amount of C was reallocated to the roots. $^{14}CO_2$ pulse-chase experiments demonstrated a relative increase in phloem transport to the roots in agreement with the higher R/S ratio. This increase in Suc transport confirms, on a quantitative basis, the previous hypothesis suggesting that the excess of C, resulting from the higher effect of water deficit on growth than photosynthesis, could be available for export to the roots (Hummel et al., 2010). The enhanced export measured in our experiments could be linked to the higher transcript levels for *SUC2*, *SWEET11*, and *SWEET12* in the leaf. Unexpectedly, the same set of Suc transporter genes (*SUC2*, *SWEET11*, and *SWEET12*) was induced in the roots, raising questions about their role (phloem retrieval and/or phloem unloading?). The rhizobox system developed in this study appears perfectly suited for further studies to pinpoint the cellular localization of these transporters and determine their role in Suc fluxes in the roots.

Altogether, these data demonstrate that, when challenged with a mild and continuous soil water deficit, Arabidopsis plants reduced their growth because of the reduced water availability for cell expansion, but more C was allocated to the roots to sustain their development, albeit at a slower rate.

MATERIALS AND METHODS

Rhizobox, Plant Materials, Growth Conditions, and Harvest

The rhizobox was made with two Plexiglas plates (1 cm thick) of 20 cm × 20 cm (width × length) and spaced on both sides with 1-cm × 20-cm (width × length) bars cut from the same Plexiglas plate. The lower part was sealed with tape (pierced to allow water to flow through), and the upper part was left open. The rhizobox, in the open position, was filled with 500 mL of sieved organic compost. A nylon membrane with a 0.7-μm mesh width (Sefar Nitex 03-7/2) was placed inside the rhizobox on the front plate, and the rhizobox was then closed with two pliers. Rhizoboxes were maintained at two water regimes depending on the growth conditions (WW, 0.8 g water g^{-1} compost; WD, 0.4 g water g^{-1} compost) from sowing to plant harvest (30 or 49 DAS, depending on the experiment). Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana* Columbia-0 ecotype) seeds were sown in a drop of nutrient agar medium (0.65% (w/v) agar, Murashige and Skoog medium; M0232; Duchefa Biochemie) placed between the front Plexiglas plate and the nylon membrane at the top of the rhizobox (two to four plants per rhizobox). The top of the rhizobox was sealed with cellophane during 5 to 7 DAS to maintain a high hygrometry and prevent seedling dehydration. Rhizoboxes were wrapped with opaque plastic to avoid exposing roots to light and placed in a phytotron at 23°C/18°C, 10-h/14-h day/night, with a 100 μmol m^{-2} s^{-1} light intensity at the level of plants and a 50%/70% day/night relative hygrometry. Rhizobox soil water content was kept constant by daily watering, with the amount of missing water determined by weighing rhizoboxes.

Harvests were performed at 30 and 49 DAS. Root and rosette were harvested separately and frozen in liquid nitrogen for RNA and sugar extractions. Additional plants (rosette and root) were also collected to measure physiological parameters (biomass and water status).

Leaf Area, Biomass, Water Content, Osmotic Potential, and R/S Ratio

The projected leaf area was determined with photographs of 30d plants with the threshold color plugin of ImageJ software (http://imagej.nih.gov/ij/). Leaf number was counted on the same photographs.

Water content was determined as follows in rosette and root. Fresh weight was scored immediately after separation of root and rosette. Dry weight was scored after 24 h at 80°C. Water content was then determined as (fresh weight − dry weight)/fresh weight. For rosette, fresh weight, dry weight, and water content were measured on individual plants. For root, fresh weight, dry weight, and water content were measured on pools of two to three plants grown in the same rhizobox. R/S ratio, defined as root dry weight/rosette dry weight, was determined on pools of two to three plants grown in the same rhizobox.

Rosette osmotic potential was measured on three to five excised leaves per plant pooled in 2-mL syringes. The syringes were frozen successively in liquid nitrogen and thawed at room temperature three times. Sap was then extracted and collected in 15-mL tubes by centrifugation (8,000*g*, 10 min). Ten microliters of the resulting sap was analyzed using a vapor pressure osmometer (Wescor Vapro 5520). Osmotic potential was calculated from osmolarity using the Van't Hoff equation at 23°C.

Soluble Sugars and Starch Measurements

Glc, Fru, and Suc were extracted from approximately 10 mg of lyophilized tissue sample by three washings (1.5 mL and twice with 0.5 mL) in methanol: chloroform:water (12:5:3, v/v/v). Supernatants containing soluble sugars were pooled, mixed with 0.6 volume of water, and centrifuged. The upper aqueous phase was collected and evaporated at 50°C with a concentrator (MiVac Quattro; Genevac). Soluble sugars were resuspended in 500 μL of water and quantified using the Suc/Fru/D-Glc Assay Kit (Megazyme).

Starch content was measured from the pellet obtained after methanol: chloroform:water (12:5:3, v/v/v) washings using the Total Starch HK Assay Kit (Megazyme).

RNA Extraction and Complementary DNA Synthesis

Total RNA was extracted from frozen ground tissue (TissueLyser II; Qiagen) as described by Kay et al. (1987). RNA quantity and quality were checked by optical density at 260 nm and agar gel electrophoresis, respectively. The complementary DNA was synthesized from 1 μg of total RNA after DNase treatment (Sigma-Aldrich) using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega).

Gene Expression Analysis

A set of 16 genes coding for Suc transporters from two distinct families, SUC (*AtSUC1*, *AtSUC2*, *AtSUC3*, *AtSUC4*, *AtSUC5*, *AtSUC6*, *AtSUC7*, *AtSUC8*, and *AtSUC9*) and SWEET from clade III (*AtSWEET9*, *AtSWEET10*, *AtSWEET11*, *AtSWEET12*, *AtSWEET13*, *AtSWEET14*, and *AtSWEET15*), were studied in rosette and root. An initial screen for these genes was performed by RT-PCR after 40 cycles using GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega; 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 30 s) and was analyzed by 2% agar gel electrophoresis.

For further analyses by RT-qPCR, only Suc transporter genes that showed amplification in RT-PCR were studied. Quantitative PCR was performed on 96-well plates with a MasterCycler Realplex^2 (Eppendorf) using GoTaq qPCR Master Mix (Promega). Relative expression was determined according to the $2^{-\Delta Ct}$ method. Target gene expression was normalized to the expression of the plant gene *At5g12240* (Czechowski et al., 2005). The primers used are listed in Supplemental Table S1.

$^{14}CO_2$ Pulse-Chase Labeling

Labeling experiments of whole plants were performed on 30d plants grown in rhizoboxes in a sealed Plexiglas chamber (upper part exposed to the labeled air; 5 L) illuminated with a light intensity of 100 μmol m^{-2} s^{-1}. The Plexiglas chamber always contained one rhizobox with two WW plants and one rhizobox with two WD plants. $^{14}CO_2$ with a specific activity of 54 mCi $mmol^{-1}$ (20 μCi or 74 kBq) was released in the sealed chamber by acidification of sodium bicarbonate (pulse), leading to an increase in the CO_2 level within the chamber lower than 2 μL mL^{-1}. The ambient CO_2 concentration of the air was usually 480 μL mL^{-1}.

After a 15-min pulse, the flux was directed to the trap (10% KOH) to clean the air of $^{14}CO_2$ during 5 min. Then, the chamber was opened and plants were removed from the assimilation chamber to be exposed under light (100 μmol m^{-2} s^{-1}) to perform the chase during 45 min. When the chase was over, roots were separated from the rosette. Both were then lyophilized for 4 d, exposed on PhosphorImager screens (Storage Phosphor Screen; Molecular Dynamics), and scanned with a resolution of 25 μm $pixel^{-1}$ (Scanner Typhoon;

Downloaded from www.plantphysiol.org on March 29, 2016 - Published by www.plant.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

GE Healthcare). Tissues were then incubated in a digestion buffer (perchloric acid:30% hydrogen peroxide:0.1% Triton X-100, 56:17:27, v/v/v) at 55°C during 24 h. Scintillation cocktail (Ecolite) was then added, and samples were counted for radioactivity by scintillation spectroscopy (Tri-Carb2910; Perkin Elmer).

RSA Analysis

The analysis of length, area, and shape of the root was carried out on photographs of the radiolabeled root system scanned previously with a resolution of 25 μm pixel^{-1}.

To determine primary and lateral root lengths, the root system was entirely and manually drawn in white on a black background using The Gimp software. From the generated image, primary root and lateral root lengths were estimated using the RootReader2D software (Clark et al., 2013; Supplemental Fig. S2).

The root system shape was first built with multiple points using ImageJ software. (x; y) coordinates of multiple points were used to model a raw root system shape, where point (0; 0) corresponds to the separation point between rosette and root. From the raw root system shape, (x; y) coordinates were extracted with a 0.5-cm specific interval on the y axis using the PlotDigitizer software to produce the net root shape modeled with a 0.5-cm resolution on the y axis. For each root side, x coordinates with the same y coordinates were averaged to generate the mean shape of the root system for WW and WD plants (Supplemental Fig. S3).

From the modeling of the net root shape, the area colonized was determined by calculating integrals with a 0.5-cm-deep resolution on both sides of each root system (Supplemental Fig. S4).

Statistical Analysis

Depending on the sampling size, nonparametric and parametric tests were performed in an R environment. Principal component analysis was performed using XLSTAT software.

Supplemental Data

The following supplemental materials are available.

Supplemental Figure S1. Impact of water deficit on water content in both organs and relationship with rosette dry weight.

Supplemental Figure S2. Method to determine the principal and total lengths of lateral roots.

Supplemental Figure S3. Method to determine the average shapes of the WW and WD root systems.

Supplemental Figure S4. Method to determine the area colonized by the root system.

Supplemental Table S1. Specific primers used in this study.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Denis Couratin for help producing numerous rhizoboxes, Benoit Deslais for drawing Figure 1, Antoine Plasseraud Desgranges for help in the correction of the article, and all our colleagues for inspiring discussions.

Received December 8, 2015; accepted January 21, 2016; published January 22, 2016.

LITERATURE CITED

Ainsworth EA, Bush DR (2011) Carbohydrate export from the leaf: a highly regulated process and target to enhance photosynthesis and productivity. Plant Physiol **155:** 64–69

Alexandersson E, Fraysse L, Sjövall-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, Johanson U, Kjellbom P (2005) Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. Plant Mol Biol **59:** 469–484

Bao Y, Aggarwal P, Robbins NE II, Sturrock CJ, Thompson MC, Tan HQ, Tham C, Duan L, Rodriguez PL, Vernoux T, et al (2014) Plant roots use a patterning mechanism to position lateral root branches toward available water. Proc Natl Acad Sci USA **111:** 9319–9324

Bartholomew DM, Bartley GE, Scolnik PA (1991) Abscisic acid control of rbcS and cab transcription in tomato leaves. Plant Physiol **96:** 291–296

Baud S, Wuillème S, Lemoine R, Kronenberger J, Caboche M, Lepiniec L, Rochat C (2005) The AtSUC5 sucrose transporter specifically expressed in the endosperm is involved in early seed development in Arabidopsis. Plant J **43:** 824–836

Boursiac Y, Chen S, Luu DT, Sorieul M, van den Dries N, Maurel C (2005) Early effects of salinity on water transport in Arabidopsis roots: molecular and cellular features of aquaporin expression. Plant Physiol **139:** 790–805

Buchanan-Wollaston V (1997) The molecular biology of leaf senescence. J Exp Bot **48:** 181–199

Carpaneto A, Geiger D, Bamberg E, Sauer N, Fromm J, Hedrich R (2005) Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier ZmSUT1 mediates sucrose efflux under the control of the sucrose gradient and the proton motive force. J Biol Chem **280:** 21437–21443

Casimiro I, Beeckman T, Graham N, Bhalerao R, Zhang H, Casero P, Sandberg G, Bennett MJ (2003) Dissecting Arabidopsis lateral root development. Trends Plant Sci **8:** 165–171

Chaudhuri B, Hörmann F, Lalonde S, Brady SM, Orlando DA, Benfey P, Frommer WB (2008) Protonophore- and pH-insensitive glucose and sucrose accumulation detected by FRET nanosensors in Arabidopsis root tips. Plant J **56:** 948–962

Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS (2003) Understanding plant responses to drought: from genes to the whole plant. Funct Plant Biol **30:** 239–264

Chaves MM, Pereira JS, Maroco J, Rodrigues ML, Ricardo CPP, Osório ML, Carvalho I, Faria T, Pinheiro C (2002) How plants cope with water stress in the field: photosynthesis and growth. Ann Bot (Lond) **89:** 907–916

Chen LQ (2014) SWEET sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition. New Phytol **201:** 1150–1155

Chen LQ, Qu XQ, Hou BH, Sosso D, Osorio S, Fernie AR, Frommer WB (2012) Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. Science **335:** 207–211

Chen Z, Hong X, Zhang H, Wang Y, Li X, Zhu JK, Gong Z (2005) Disruption of the cellulose synthase gene, AtCesA8/IRX1, enhances drought and osmotic stress tolerance in Arabidopsis. Plant J **43:** 273–283

Clark RT, Famoso AN, Zhao K, Shaff JE, Craft EJ, Bustamante CD, McCouch SR, Aneshansley DJ, Kochian LV (2013) High-throughput two-dimensional root system phenotyping platform facilitates genetic analysis of root growth and development. Plant Cell Environ **36:** 454–466

Comas LH, Becker SR, Cruz VMV, Byrne PF, Dierig DA (2013) Root traits contributing to plant productivity under drought. Front Plant Sci **4:** 442

Cornic G (2000) Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture—not by affecting ATP synthesis. Trends Plant Sci **5:** 187–188

Cramer GR, Ergül A, Grimplet J, Tillett RL, Tattersall EA, Bohlman MC, Vincent D, Sonderegger J, Evans J, Osborne C, et al (2007) Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. Funct Integr Genomics **7:** 111–134

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

Dasgupta K, Khadilkar AS, Sulpice R, Pant B, Scheible WR, Fisahn J, Stitt M, Ayre BG (2014) Expression of sucrose transporter cDNAs specifically in companion cells enhances phloem loading and long-distance transport of sucrose but leads to an inhibition of growth and the perception of a phosphate limitation. Plant Physiol **165:** 715–731

Davies WJ, Mansfield TA, Hetherington AM (1990) Sensing of soil water status and the regulation of plant growth and development. Plant Cell Environ **13:** 709–719

Deak KI, Malamy J (2005) Osmotic regulation of root system architecture. Plant J **43:** 17–28

Deng X, Joly RJ, Hahn DT (1990) The influence of plant water deficit on photosynthesis and translocation of ^{14}C-labeled assimilates in cacao seedlings. Physiol Plant **78:** 623–627

Devienne-Barret F, Richard-Molard C, Chelle M, Maury O, Ney B (2006) Ara-rhizotron: an effective culture system to study simultaneously root and shoot development of Arabidopsis. Plant Soil **280:** 253–266

Farrar JF, Jones DL (2000) The control of carbon acquisition by roots. New Phytol **147:** 43–53

Downloaded from www.plantphysiol.org on March 29, 2016 - Published by www.plant.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

Flexas J, Bota J, Galmés J, Medrano H, Ribas-Carbó M (2006a) Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. Physiol Plant **127:** 343–352

Flexas J, Ribas-Carbó M, Bota J, Galmés J, Henkle M, Martínez-Cañellas S, Medrano H (2006b) Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO_2 concentration. New Phytol **172:** 73–82

Freixes S, Thibaud MC, Tardieu F, Muller B (2002) Root elongation and branching is related to local hexose concentration in Arabidopsis thaliana seedlings. Plant Cell Environ **25:** 1357–1366

Gan S, Amasino RM (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. Science **270:** 1986–1988

Gong X, Liu M, Zhang L, Ruan Y, Ding R, Ji Y, Zhang N, Zhang S, Farmer J, Wang C (2015) Arabidopsis AtSUC2 and AtSUC4, encoding sucrose transporters, are required for abiotic stress tolerance in an ABA-dependent pathway. Physiol Plant **153:** 119–136

Gottwald JR, Krysan PJ, Young JC, Evert RF, Sussman MR (2000) Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. Proc Natl Acad Sci USA **97:** 13979–13984

Gould N, Thorpe MR, Pritchard J, Christeller JT, Williams LE, Roeb G, Schurr U, Minchin PE (2012) AtSUC2 has a role for sucrose retrieval along the phloem pathway: evidence from carbon-11 tracer studies. Plant Sci **188-189:** 97–101

Hammer GL, Dong Z, Mclean G, Doherty A, Messina C, Schussler J, Zinselmeier C, Paszkiewicz S, Cooper M (2009) Can changes in canopy and/or root system architecture explain historical maize yield trends in the U.S. Corn Belt? Crop Sci **49:** 299–312

Harb A, Krishnan A, Ambavaram MMR, Pereira A (2010) Molecular and physiological analysis of drought stress in Arabidopsis reveals early responses leading to acclimation in plant growth. Plant Physiol **154:** 1254–1271

Hare PD, Cress WA, Van Staden J (1998) Dissecting the roles of osmolytes accumulation during stress. Plant Cell Environ **21:** 535–553

Hölttä T, Mencuccini M, Nikinmaa E (2009) Linking phloem function to structure: analysis with a coupled xylem-phloem transport model. J Theor Biol **259:** 325–337

Hummel I, Pantin F, Sulpice R, Piques M, Rolland G, Dauzat M, Christophe A, Pervent M, Bouteillé M, Stitt M, et al (2010) Arabidopsis plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. Plant Physiol **154:** 357–372

Ibraheem O, Dealtry G, Roux S, Bradley G (2011) The effect of drought and salinity on the expressional levels of sucrose transporters in rice (Oryza sativa Nipponbare) cultivar plants. Plant Omics Journal **4:** 68–74

Kawaguchi R, Williams AJ, Bray EA, Bailey-Serres J (2003) Water-deficit-induced translational control in Nicotiana tabacum. Plant Cell Environ **26:** 221–229

Kay R, Chan AMY, Daly M, McPherson J (1987) Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. Science **236:** 1299–1302

Kempers R, Ammerlaan A, Van Bel AJE (1998) Symplasmic constriction and ultrastructural features of the sieve element/companion cell complex in the transport phloem of apoplasmically and symplasmically phloem-loading species. Plant Physiol **116:** 271–278

Kim JY, Mahé A, Brangeon J, Prioul JL (2000) A maize vacuolar invertase, IVR2, is induced by water stress: organ/tissue specificity and diurnal modulation of expression. Plant Physiol **124:** 71–84

Krapp A, Hofmann B, Schäfer C, Stitt M (1993) Regulation of the expression of rbcS and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the 'sink regulation' of photosynthesis? Plant J **3:** 817–828

Kuchenbuch R, Jungk A (1982) A method for determining concentration profiles at the soil-root interface by thin slicing rhizospheric soil. Plant Soil **68:** 391–394

Leggewie G, Kolbe A, Lemoine R, Roessner U, Lytovchenko A, Zuther E, Kehr J, Frommer WB, Riesmeier JW, Willmitzer L, et al (2003) Overexpression of the sucrose transporter SoSUT1 in potato results in alterations in leaf carbon partitioning and in tuber metabolism but has little impact on tuber morphology. Planta **217:** 158–167

Le Hir R, Spinner L, Klemens PAW, Chakraborti D, de Marco F, Vilaine F, Wolff N, Lemoine R, Porcheron B, Géry C, et al (2015) Disruption of the sugar transporters AtSWEET11 and AtSWEET12 affects vascular development and freezing tolerance in Arabidopsis. Mol Plant **8:** 1687–1690

Lemoine R, Kühn C, Thiele N, Delrot S, Frommer WB (1996) Antisense inhibition of the sucrose transporter in potato: effects on amount and activity. Plant Cell Environ **19:** 1124–1131

Lemoine R, La Camera S, Atanassova R, Dédaldéchamp F, Allario T, Pourtau N, Bonnemain JL, Laloi M, Coutos-Thévenot P, Maurousset L, et al (2013) Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. Front Plant Sci **4:** 272

Li TH, Li SH, Wang J, Yu KS (2003) Effects of water stress at different deficit intensities on transport and distribution of ^{14}C-assimilates in micropropagated apple plants. Eur J Hortic Sci **68:** 227–233

Lim PO, Kim HJ, Nam HG (2007) Leaf senescence. Annu Rev Plant Biol **58:** 115–136

Ludewig F, Flügge UI (2013) Role of metabolite transporters in source-sink carbon allocation. Front Plant Sci **4:** 231

Ludewig F, Sonnewald U (2000) High CO_2-mediated down-regulation of photosynthetic gene transcripts is caused by accelerated leaf senescence rather than sugar accumulation. FEBS Lett **479:** 19–24

Luijten M, Heidstra R (2009) Arabidopsis root development. *In* T Beeckman, ed, Annual Plant Reviews, Vol 37. Wiley-Blackwell

Mathieu L, Lobet G, Tocquin P, Périlleux C (2015) "Rhizoponics": a novel hydroponic rhizotron for root system analyses on mature Arabidopsis thaliana plants. Plant Methods **11:** 3

McDowell NG (2011) Mechanisms linking drought, hydraulics, carbon metabolism, and vegetation mortality. Plant Physiol **155:** 1051–1059

Medici A, Laloi M, Atanassova R (2014) Profiling of sugar transporter genes in grapevine coping with water deficit. FEBS Lett **588:** 3989–3997

Metcalf CJ, Mitchell-Olds T (2009) Life history in a model system: opening the black box with Arabidopsis thaliana. Ecol Lett **12:** 593–600

Meyer S, Lauterbach C, Niedermeier M, Barth I, Sjolund RD, Sauer N (2004) Wounding enhances expression of AtSUC3, a sucrose transporter from Arabidopsis sieve elements and sink tissues. Plant Physiol **134:** 684–693

Muller B, Pantin F, Génard M, Turc O, Freixes S, Piques M, Gibon Y (2011) Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. J Exp Bot **62:** 1715–1729

Münch E (1930) Die Stoffbewegungen in der Pflanze. Fischer, Jena, Germany

Nicolas ME, Lambers H, Simpson RJ, Dalling MJ (1985) Effect of drought on metabolism and partitioning of carbon in two wheat varieties differing in drought-tolerance. Ann Bot (Lond) **55:** 727–742

Oparka KJ, Duckett CM, Prior DAM, Fisher DB (1994) Real-time imaging of phloem unloading in the root tip of *Arabidopsis*. Plant J **6:** 759–766

Paez-Garcia A, Motes C, Scheible WR, Chen R, Blancaflor E, Monteros M (2015) Root traits and phenotyping strategies for plant improvement. Plants **4:** 334–355

Patrick JW (1997) Phloem unloading: sieve element unloading and post-sieve element transport. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **48:** 191–222

Péret B, De Rybel B, Casimiro I, Benková E, Swarup R, Laplaze L, Beeckman T, Bennett MJ (2009) Arabidopsis lateral root development: an emerging story. Trends Plant Sci **14:** 399–408

Petricka JJ, Winter CM, Benfey PN (2012) Control of Arabidopsis root development. Annu Rev Plant Biol **63:** 563–590

Plaut Z, Reinhold L (1965) The effect of water stress on [^{14}C]sucrose transport in bean plants. Aust J Biol Sci **18:** 1143–1156

Pourtau N, Jennings R, Pelzer E, Pallas J, Wingler A (2006) Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in Arabidopsis. Planta **224:** 556–568

Quick WP, Chaves MM, Wendler R, David M, Rodrigues ML, Passaharinho JA, Pereira JS, Adcock MD, Leegood RC, Stitt M (1992) The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. Plant Cell Environ **15:** 25–35

Quirino BF, Normanly J, Amasino RM (1999) Diverse range of gene activity during Arabidopsis thaliana leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. Plant Mol Biol **40:** 267–278

Quirino BF, Reiter WD, Amasino RD (2001) One of two tandem Arabidopsis genes homologous to monosaccharide transporters is senescence-associated. Plant Mol Biol **46:** 447–457

Ramírez V, Coego A, López A, Agorio A, Flors V, Vera P (2009) Drought tolerance in Arabidopsis is controlled by the OCP3 disease resistance regulator. Plant J **58:** 578–591

Downloaded from www.plantphysiol.org on March 29, 2016 - Published by www.plant.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

Ruehr NK, Offermann CA, Gessler A, Winkler JB, Ferrio JP, Buchmann N, Barnard RL (2009) Drought effects on allocation of recent carbon: from beech leaves to soil CO_2 efflux. New Phytol **184:** 950–961

Satbhai SB, Ristova D, Busch W (2015) Underground tuning: quantitative regulation of root growth. J Exp Bot **66:** 1099–1112

Schneider S, Hulpke S, Schulz A, Yaron I, Höll J, Imlau A, Schmitt B, Batz S, Wolf S, Hedrich R, et al (2012) Vacuoles release sucrose via tonoplast-localised SUC4-type transporters. Plant Biol (Stuttg) **14:** 325–336

Schulz A, Beyhl D, Marten I, Wormit A, Neuhaus E, Poschet G, Büttner M, Schneider S, Sauer N, Hedrich R (2011) Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2. Plant J **68:** 129–136

Seo PJ, Park JM, Kang SK, Kim SG, Park CM (2011) An Arabidopsis senescence-associated protein SAG29 regulates cell viability under high salinity. Planta **233:** 189–200

Sevanto S (2014) Phloem transport and drought. J Exp Bot **65:** 1751–1759

Sharma S, Verslues PE (2010) Mechanisms independent of abscisic acid (ABA) or proline feedback have a predominant role in transcriptional regulation of proline metabolism during low water potential and stress recovery. Plant Cell Environ **33:** 1838–1851

Sharp RE, Poroyko V, Hejlek LG, Spollen WG, Springer GK, Bohnert HJ, Nguyen HT (2004) Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. J Exp Bot **55:** 2343–2351

Sheen J (1990) Metabolic repression of transcription in higher plants. Plant Cell **2:** 1027–1038

Sivitz AB, Reinders A, Johnson ME, Krentz AD, Grof CPL, Perroux JM, Ward JM (2007) Arabidopsis sucrose transporter AtSUC9: high-affinity transport activity, intragenic control of expression, and early flowering mutant phenotype. Plant Physiol **143:** 188–198

Sivitz AB, Reinders A, Ward JM (2008) Arabidopsis sucrose transporter AtSUC1 is important for pollen germination and sucrose-induced anthocyanin accumulation. Plant Physiol **147:** 92–100

Sperdouli I, Moustakas M (2012) Interaction of proline, sugars, and anthocyanins during photosynthetic acclimation of Arabidopsis thaliana to drought stress. J Plant Physiol **169:** 577–585

Srivastava AC, Ganesan S, Ismail IO, Ayre BG (2008) Functional characterization of the Arabidopsis AtSUC2 sucrose/H+ symporter by tissue-specific complementation reveals an essential role in phloem loading but not in long-distance transport. Plant Physiol **148:** 200–211

Stadler R, Sauer N (1996) The Arabidopsis thaliana AtSUC2 gene is specifically expressed in companion cells. Bot Acta **109:** 299–306

Stadler R, Truernit E, Gahrtz M, Sauer N (1999) The AtSUC1 sucrose carrier may represent the osmotic driving force for anther dehiscence and pollen tube growth in Arabidopsis. Plant J **19:** 269–278

Stitt M, Zeeman SC (2012) Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. Curr Opin Plant Biol **15:** 282–292

Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in Arabidopsis thaliana. Plant J **29:** 417–426

Takahashi N, Yamazaki Y, Kobayashi A, Higashitani A, Takahashi H (2003) Hydrotropism interacts with gravitropism by degrading amyloplasts in seedling roots of Arabidopsis and radish. Plant Physiol **132:** 805–810

Tardieu F, Davies WJ (1993) Integration of hydraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and water status of droughted plants. Plant Cell Environ **16:** 341–349

Tian X, Doerner P (2013) Root resource foraging: does it matter? Front Plant Sci **4:** 303

Truernit E, Sauer N (1995) The promoter of the Arabidopsis thaliana SUC2 sucrose-H^+ symporter gene directs expression of beta-glucuronidase to the phloem: evidence for phloem loading and unloading by SUC2. Planta **196:** 564–570

van der Weele CM, Spollen WG, Sharp RE, Baskin TI (2000) Growth of Arabidopsis thaliana seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. J Exp Bot **51:** 1555–1562

Van Oosten JJ, Besford RT (1994) Sugar feeding mimics effect of acclimation to high CO_2: rapid down regulation of RuBisCO small subunit transcripts but not of the large subunit transcripts. J Plant Physiol **143:** 306–312

Vaughn MW, Harrington GN, Bush DR (2002) Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. Proc Natl Acad Sci USA **99:** 10876–10880

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

Wardlaw IF (1969) The effect of water stress on translocation in relation to photosynthesis and growth. II. Effect during leaf development in *Lolium temulentum* L. Aust J Biol Sci **22:** 1–16

Wenzel W, Wieshammer G, Fitz W, Puschenreiter M (2001) Novel rhizobox design to assess rhizosphere characteristics at high spatial resolution. Plant Soil **237:** 37–45

Westgate ME, Boyer JS (1985) Osmotic adjustment and the inhibition of leaf, root, stem and silk growth at low water potentials in maize. Planta **164:** 540–549

Wingler A, Roitsch T (2008) Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses. Plant Biol (Stuttg) (Suppl 1) **10:** 50–62

Xiong L, Wang RG, Mao G, Koczan JM (2006) Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid. Plant Physiol **142:** 1065–1074

Yamada K, Kanai M, Osakabe Y, Ohiraki H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2011) Monosaccharide absorption activity of Arabidopsis roots depends on expression profiles of transporter genes under high salinity conditions. J Biol Chem **286:** 43577–43586

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994) A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. Plant Cell **6:** 251–264

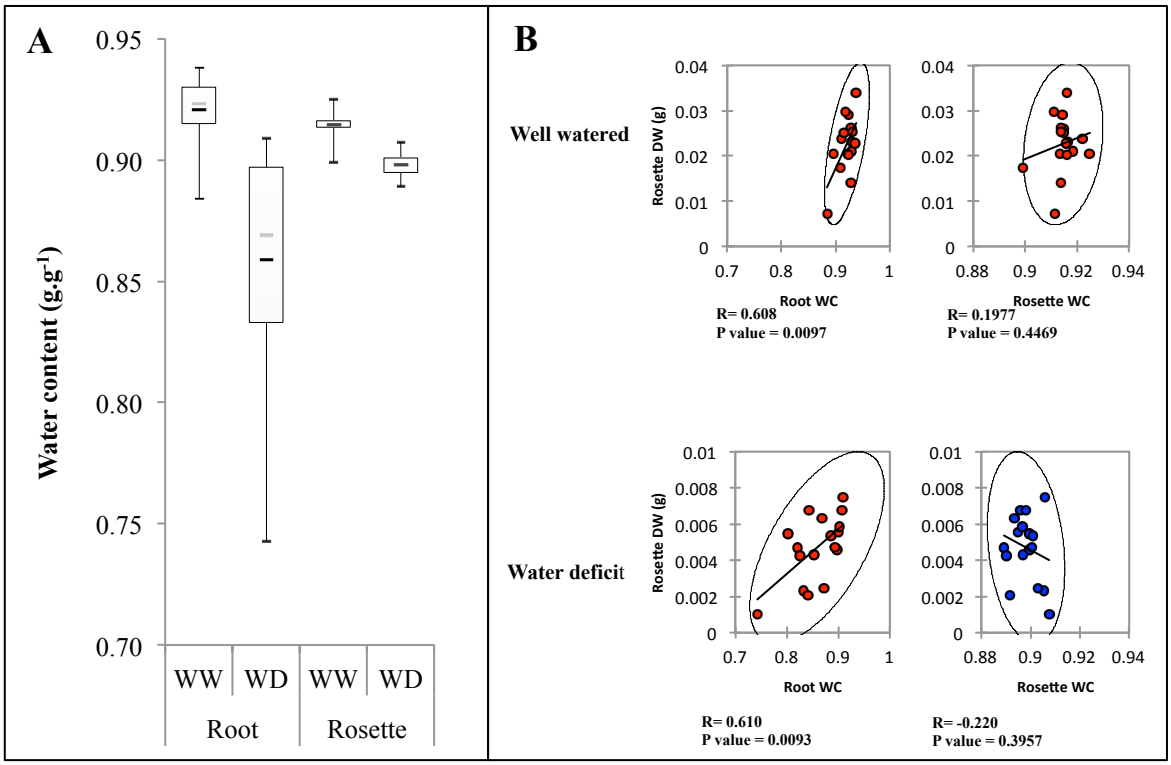
Youssef RA, Chino M (1988) Development of a new rhizobox system to study the nutrient status in the rhizosphere. Soil Sci Plant Nutr **34:** 461–465

Zhan A, Schneider H, Lynch JP (2015) Reduced lateral root branching density improves drought tolerance in maize. Plant Physiol **168:** 1603–1615

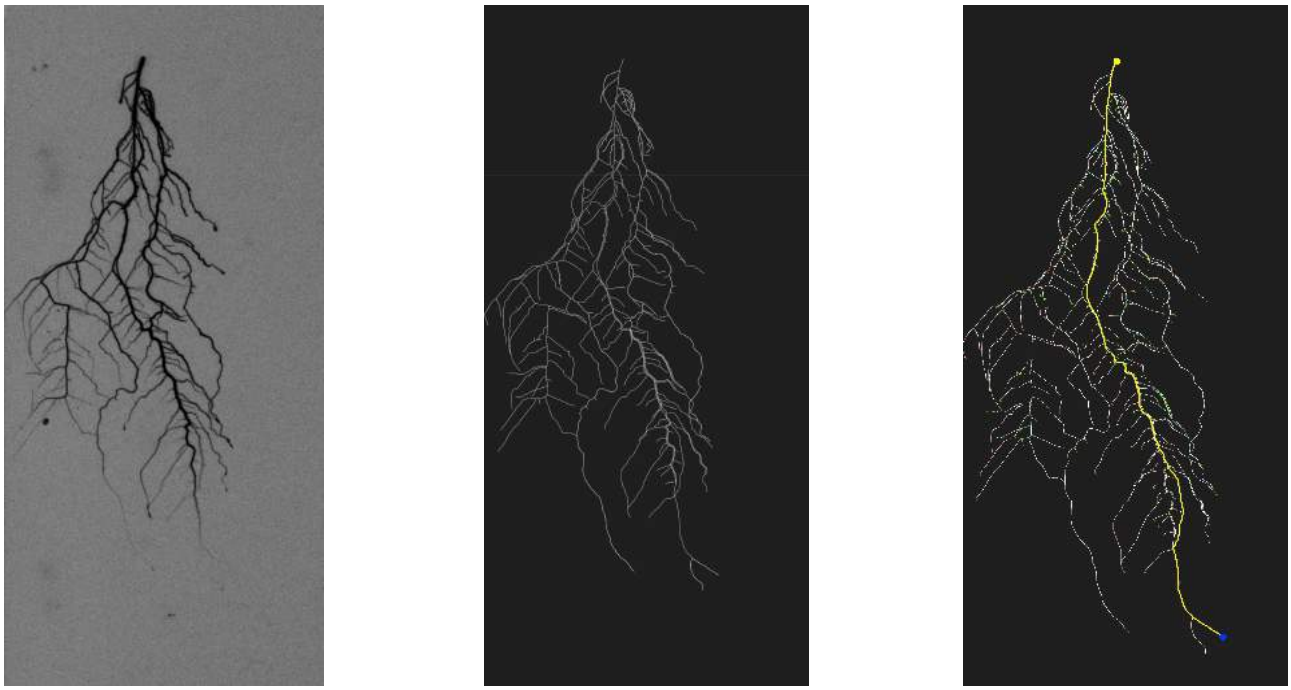
Downloaded from www.plantphysiol.org on March 29, 2016 - Published by www.plant.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

Supplemental Table S1. *Specific primers used in this study*.

Genes	Accessions	Forward primers	Reverse primers
AtSUC1	AT1G71880	GACCTTTCGACGCCTTGTTC	AATACTCCACTAATCGCCGCTG
AtSUC2	AT1G22710	GGTAAGTGGTGTATTGGCGTTG	GAGCCAAACAACCACTGCTAAA
AtSUC3	AT2G02860	CAAGAACCGCAGCCGTAATC	CTTGACCGCCACCGGAAT
AtSUC4	AT1G09960	AGTGTCAAGCGAGGAACGCATA	AGTCACACGAGAAGCCATTGC
AtSUC5	AT1G71890	GGGCTATGGGATTCCATTAG	TAAAAGACAGACGACCAAGG
AtSUC6	ATG543610	TCCTGTCTCCGGCCTGCTT	AGGCGCCCATAGCGATGA
AtSUC7	AT1G66570	GTCTTTAAGAGACAAGCCCAC	AGACTGTCTATCCACAGTCGT
AtSUC8	AT2G14670	CTAGCTTCCATAATCTCAAGT	TTGGTAAGTTTCCACCTCCAAAA
AtSUC9	AT5G06170	GTGGTTCCTGATGAGCCG	GAGAAGCTGAACGTATGGG
AtSWEET9	AT2G39060	ACGCCGTCATGTGGTTCTTT	TGCTAGTTGGTTCTCTGTTGGC
AtSWEET10	AT5G50790	AACTCCTTTGCCTTTGTCGTACA	GTCAACACGAAGATTGCGCC
AtSWEET11	AT3G48740	TCCTTCTCCTAACAACTTATATACCATG	TCCTATAGAACGTTGGCACAGGA
AtSWEET12	AT5G23660	AAAGCTGATATCTTTCTTACTACTTCGAA	CTTACAAATCCTATAGAACGTTGGCAC
AtSWEET13	AT5G50800	CTTCTACGTTGCCCTTCCAAATG	CTTTGTTTCTGGACATCCTTGTTGA
AtSWEET14	AT4G25010	AAACGCTGTGGGATGCTTCA	TTCAAGAGCCCAAGAACCTTCA
AtSWEET15	AT5G13170	CAATGACATATGCATAGCGATTCCAA	GGACTCATCACGACAATACTCTTAAG
AtSAG12	AT5G45890	TGGATACGGCGAATCTACTAACG	GCTTTCATGGCAAGACCACATAG
AtRD29a	AT5G52310	GAAAGGAGGAGGAGGAATGGTT	GGAGCCAAGTGATTGTGGAGA
AtRBCS	AT1G67090	ACGGTACTGGACAATGTGG	CGAATCCGATGATCCTAATG
AtCAB1	AT1G29930	CCAGAGGCATTCGCTGAGTTG	CCTTACCAGTGACGATGGCTTG
AtTIP1.2	AT3G26520	CAAGAACGGTAGTCTCGGAACA	GACCAGCCCAGTAAACCCAGT
Reference	AT5G12240	AATATCGCTTTGCAGCTTCTG	GATTTTGCAAGGCTTTCGAG



Supplemental Figure S1. Impact of water deficit on WC in both organs and relationship with rosette DW. All measurements were performed 30 DAS. WC of root and rosette, and rosette DW were measured from 5 to 6 rhizoboxes on a pool of 2 to 3 plants grown in the same rhizobox in 3 independent experiments. A, Impact of water deficit on WC in root and rosette. Data are expressed as boxplots. Black and grey dashes indicate mean and median, respectively. B, Relationship between rosette DW and WC of root and rosette in WW and WD plants. $P<0.05$ represents significant correlation after Pearson correlation test.

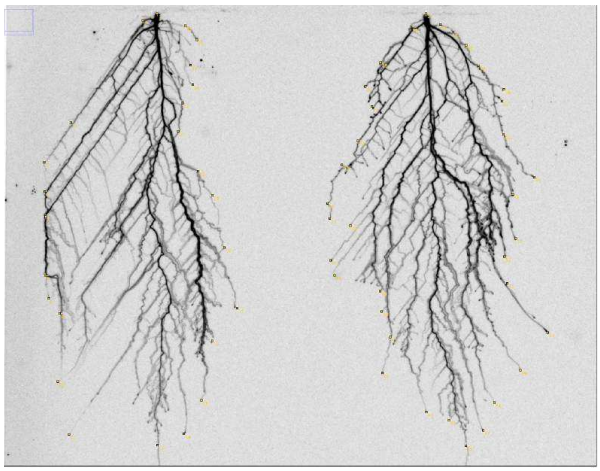


Autoradiography of root after ^{14}C assimilation are used to analyse RSA.

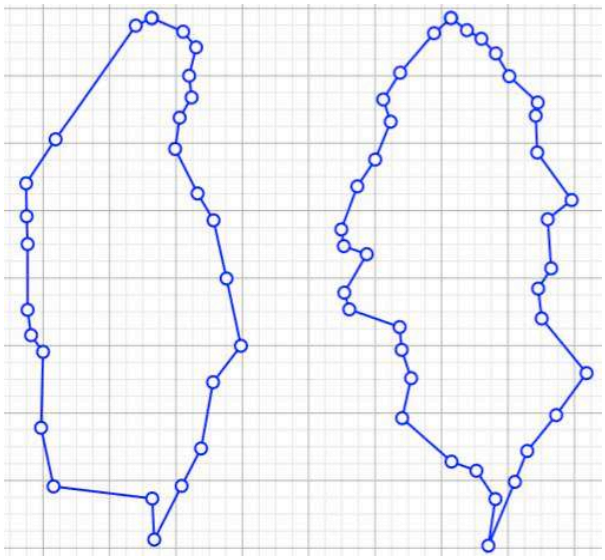
Root system are manually drawn using "The Gimp" software.

Principal root and lateral root length are finally determined with the RootReader2D software.

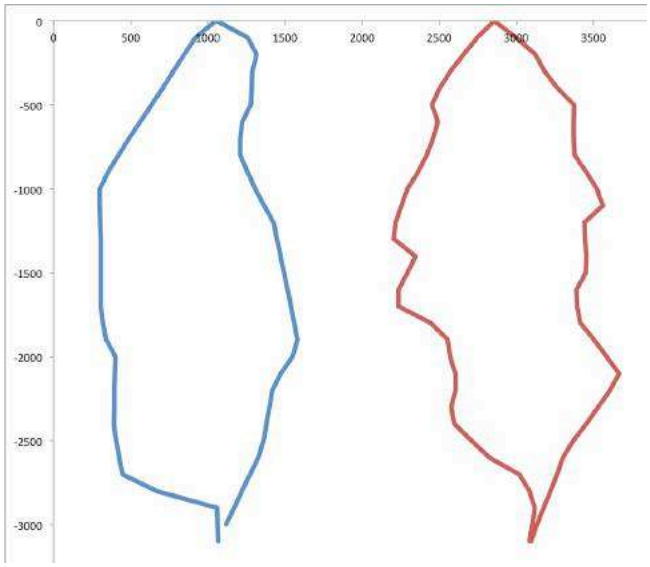
Supplemental Figure S2. Method to determine principal and total length of lateral roots.



Autoradiography of roots after ^{14}C assimilation are used to analyse RSA.
Root system shape is first built with multiple points using imageJ software. The number of selected points depends on the root size.
(x ; y) multiple points obtained are used to model a "raw shape of root system"

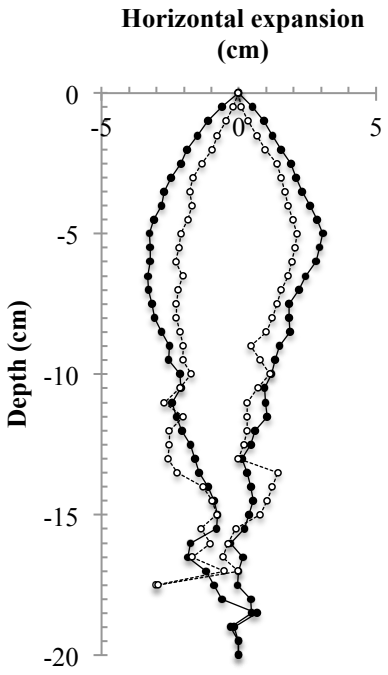


Raw shape of root system



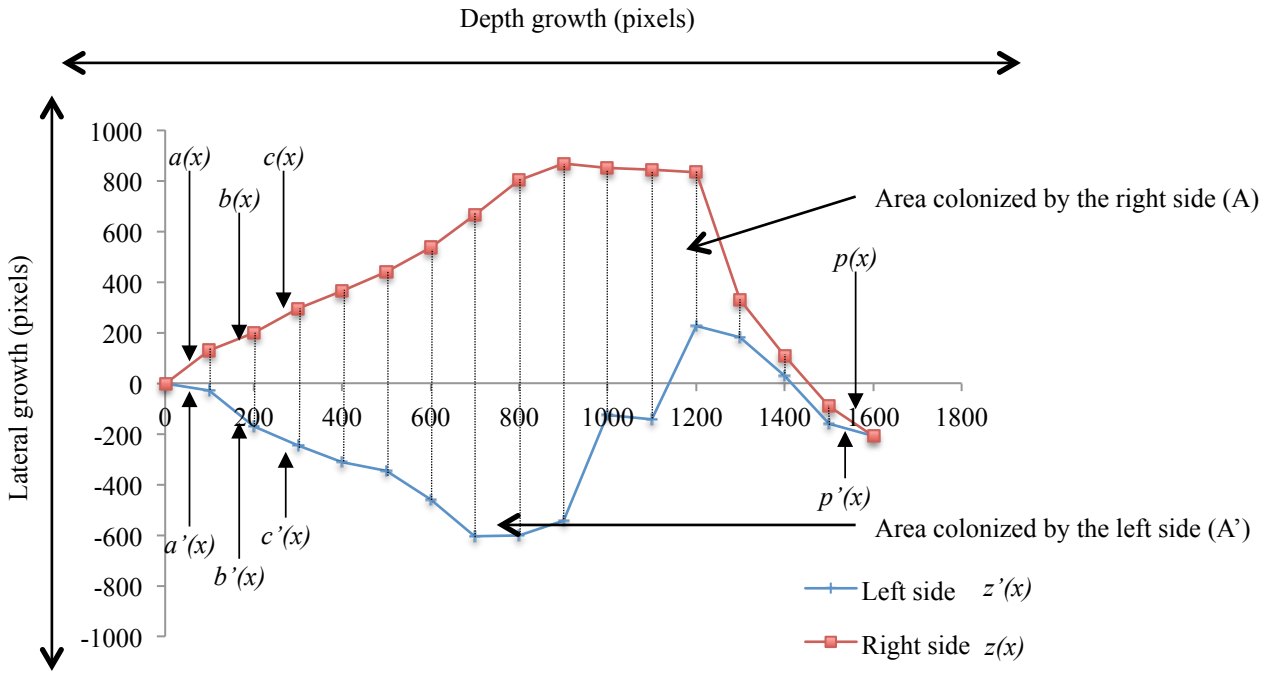
Net shape of root system

"Raw shape of root system" is then used to perform "net shape of root system" built with (x ; y) multiple point with a (y) resolution of 100 pixels (0.5 cm). (x ; y) coordinates are extracted from the chart of the "raw shape of root system" with a (y) resolution of 100 pixels using the PlotDigitizer software.



(x) values for points with the same (y) coordinates on either side of the root were averaged for 32 WW plants (black circle) and 32 WD plants (white circle), and the average shape of the root system was finally modeled.

Supplemental Figure S3. Method to determine the average shape of the WW and WD root systems.



$$Area.colonized.by.roots = A + A' = \int_0^{1600} z(x)dx - \int_0^{1600} z'(x)dx = \left(\int_0^{100} a(x)dx + \int_{100}^{200} b(x)dx + \int_{200}^{300} c(x) + \ldots + \int_{1500}^{1600} p(x)dx\right) - \left(\int_0^{100} a'(x)dx + \int_{100}^{200} b'(x)dx + \int_{200}^{300} c'(x) + \ldots + \int_{1500}^{1600} p'(x)dx\right)$$

$$= \left((A(100) - A(0)) + (B(200) - B(100)) + (C(300) - C(200)) + \ldots + (P(1600) - P(1500))\right) - \left((A'(100) - A'(0)) + (B'(200) - B'(100)) + (C'(300) - C'(200)) + \ldots + (P'(1600) - P'(1500))\right)$$

a(x), *b(x)*, *c(x)* to *p(x)* and *a'(x)*, *b'(x)*, *c'(x)* to *p'(x)* are equations of a*x*+b form . Their antiderivative is so ½ ax^2+b*x*.
To determine the total area, the equation of each line between two points separated by 100 pixels in abscissa has to be calculated.

Supplemental Figure S4. Method to determine area colonized by the root system.

V. Chapitre « Contrainte hydrique vs. Contrainte osmotique »

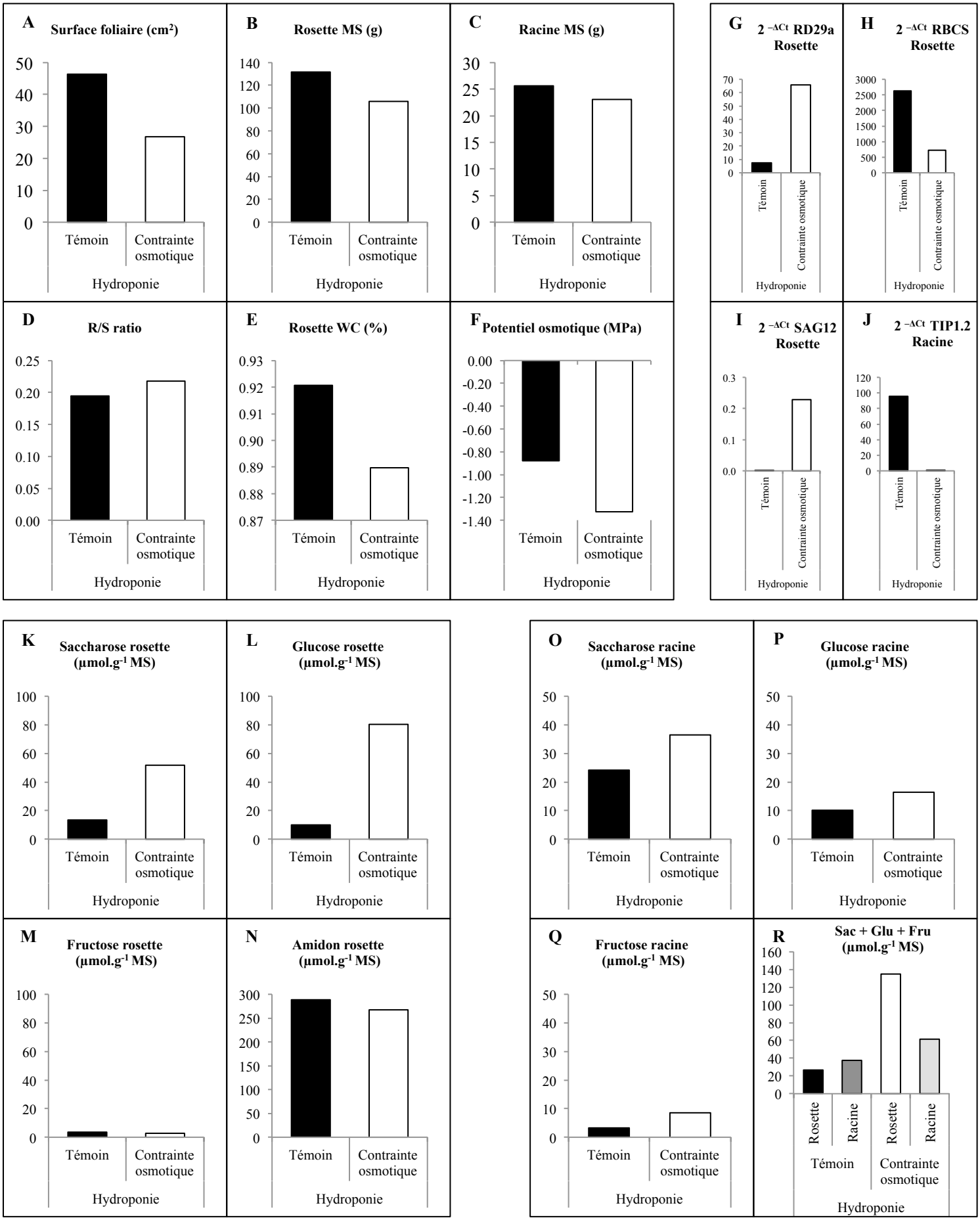


Figure 18 *Récapitulatif de l'effet de la contrainte osmotique sur plusieurs paramètres physiologiques, sur l'expression de gènes marqueurs, sur les teneurs en sucres et amidon de la rosette et sur les teneurs en sucres de la racine.*

A à E, Donnée physiologiques concernant la biomasse et l'état hydrique. **G à J**, Expression relative de gènes marqueurs. **K à N**, Teneurs en sucres solubles et amidon des feuilles. **O à Q**, Teneurs en sucres solubles de la racine. **R**, Sucres solubles totaux.

La figure résume les données concernant l'expérimentation « Contrainte osmotique » du chapitre III.

Résultats

1 Rappel des principaux effets de la contrainte osmotique appliquée

La contrainte osmotique appliquée en hydroponie (**Figure 10**) a réduit l'accumulation de la biomasse des plantes contraintes (« St osm ») tant au niveau de la rosette que des racines (**Figure 18B et C**). Cette réduction est accompagnée d'une diminution de l'expansion foliaire (**Figure 18A**) liée d'une part à la réduction du développement foliaire et d'autre part au flétrissement des feuilles. L'apparition du flétrissement des feuilles témoigne de l'altération de l'état hydrique de la plante par la contrainte osmotique. La réduction de la teneur en eau de la rosette (**Figure 18E**) et de son potentiel osmotique (**Figure 18F**) apporte des preuves supplémentaires quant à l'altération du statut hydrique de la rosette. Enfin la biomasse de la plante entière est réduite : cependant il semble que la croissance foliaire est légèrement plus affectée que la croissance racinaire, comme le souligne la faible augmentation du ratio R/S (**Figure 18D**).

La contrainte osmotique conduit donc à plusieurs changements morphologiques et physiologiques. De plus, la surexpression du gène *AtRD29a* dans les feuilles « St osm » (**Figure 18G**) (Yamada *et al.*, 2011) et la répression de l'expression de *AtTIP1.2* (**Figure 18J**) dans les racines « St osm » (Alexandersson *et al.*, 2005a) suggèrent aussi la perception au niveau moléculaire de la contrainte appliquée dans les deux organes (Harb *et al.*, 2010). La contrainte osmotique appliquée génère de plus une réduction de l'expression de *AtRBCS* (**Figure 18G**) et une augmentation de l'expression de *AtSAG12* (**Figure 18I**), suggérant (1) un impact négatif du stress sur la photosynthèse (Flexas *et al.*, 2006b; Kawaguchi *et al.*, 2003) et (2) la mise en place des mécanismes liés à la sénescence (Gan and Amasino, 1995).

En réponse au stress osmotique, le saccharose et le glucose se sont fortement accumulés dans la rosette alors que la teneur en amidon est restée constante (**Figure 18K, L et N**). Si les teneurs en sucres solubles augmentent dans les racines « St osm » (**Figure 18O, P et Q**), l'amplitude de l'augmentation est beaucoup moins importante que dans les feuilles. De ce fait, à l'issue du stress osmotique la rosette présente une teneur en sucres totaux supérieure à celle de la racine, ce qui n'est pas le cas en condition témoin (**Figure 18R**).

Au niveau de la rosette, la contrainte osmotique appliquée génère une diminution de l'expression d'*AtSUC1* et une augmentation de l'expression des gènes *AtSUC2*, *AtSWEET11*,

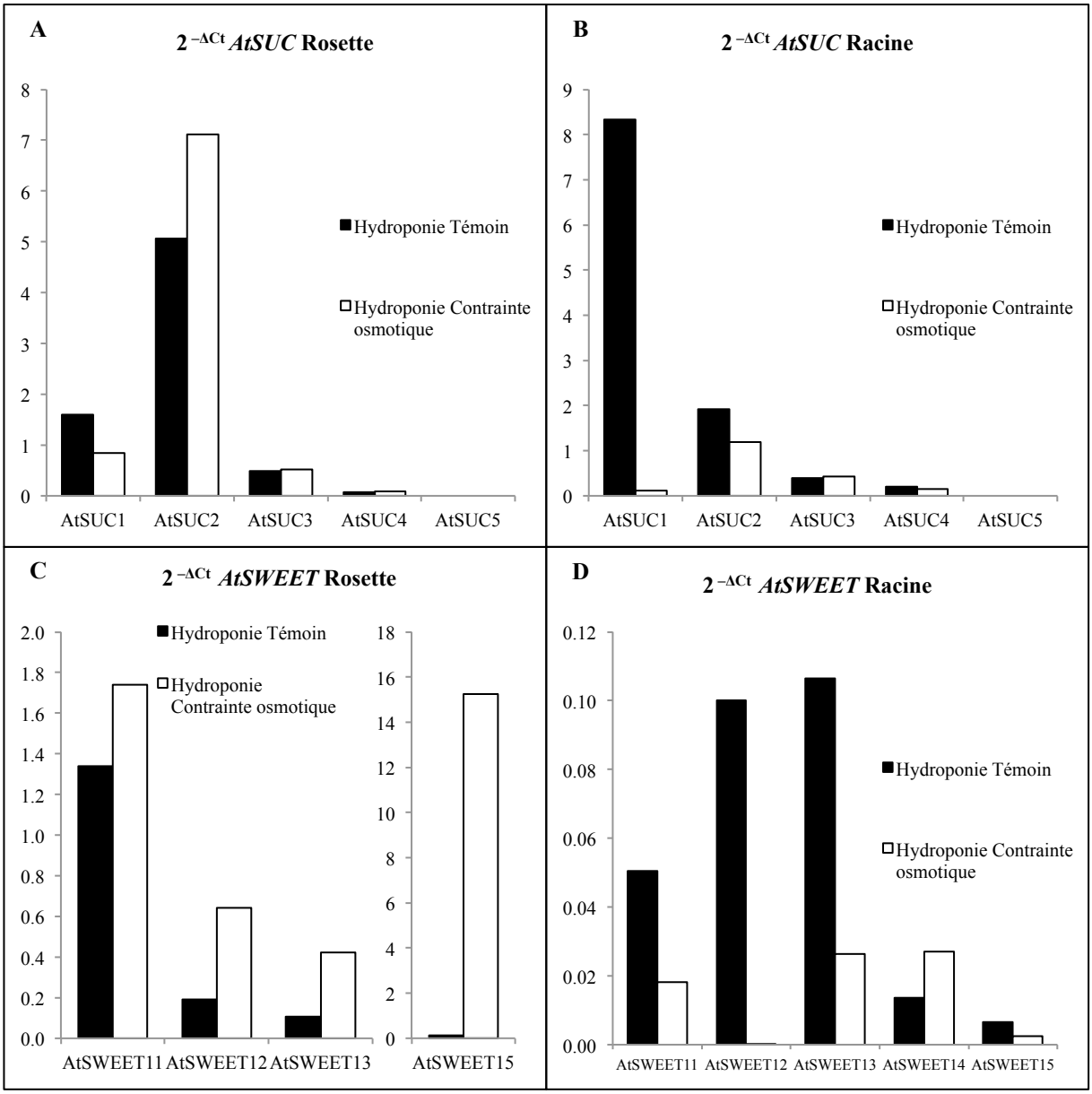


Figure 19 *Récapitulatif de l'effet de la contrainte osmotique sur l'expression relative des gènes AtSUC et AtSWEET dans les feuilles et les racines*.

A, Expression relative des gènes *AtSUC* dans la rosette. **B**, Expression relative des gènes *AtSUC* dans la racine. **C,** Expression relative des gènes *AtSWEET* dans la rosette. **D**, Expression relative des gènes *AtSWEET* dans la racine.

La figure résume les données concernant l'expérimentation « Contrainte osmotique » du chapitre III.

AtSWEET12, *AtSWEET13* et *AtSWEET15* (**Figure 19A et C**). Notons que le niveau d'*AtSWEET15* est particulièrement important dans la rosette « St osm » (**Figure 19C**). Dans les racines, la contrainte osmotique appliquée conduit au contraire à la réduction de l'expression des gènes *AtSUC1*, *AtSUC2*, *AtSWEET11*, *AtSWEET12*, *AtSWEET13* et *AtSWEET15* alors qu'*AtSWEET14* est plus exprimé (**Figure 19B et D**).

En conclusion, la contrainte osmotique appliquée génère les symptômes phénotypiques et physiologiques classiquement observés en réponse à ce type de stress (Verslues *et al.*, 2006) et aussi à la sécheresse (Chaves *et al.*, 2003) : réduction de la croissance, altération du statut hydrique, augmentation du R/S (quoique limitée). La surexpression de *AtRD29a* et la répression de *AtTIP1*.2 sont conformes avec la perception d'une baisse de la disponibilité en eau, confirmant que le PEG peut être utilisé pour mimer la carence hydrique. La faible augmentation du ratio R/S est accompagnée d'une importante augmentation des teneurs en sucres dans les feuilles et d'une moindre hausse dans les racines, suggérant une perturbation des relations source-puits pour le carbone. La modification du transport du saccharose radiomarqué pourrait être associée à la modification de l'expression des transporteurs de saccharose relevée dans les feuilles et les racines en réponse au stress osmotique. De plus, le fort niveau de transcrits du gène *AtSAG12* (Gan and Amasino, 1995), la réduction de l'expression du gène *AtRBCS* (Ludewig and Sonnewald, 2000) ainsi que l'accumulation d'hexoses dans les feuilles (Pourtau *et al.*, 2006) suggèrent la mise en place des mécanismes associés à la sénescence et au vieillissement en réponse à la contrainte osmotique.

2 Rappel des principaux effets de la contrainte hydrique appliquée

Bien que la contrainte hydrique appliquée en rhizobox ait particulièrement réduit la surface foliaire (**Figure 20A**) et l'accumulation de biomasse foliaire (**Figure 20B**), aucun flétrissement n'a été observé à l'issue de la période de carence hydrique, contrairement à la contrainte osmotique. La réduction du développement foliaire est accompagnée d'une diminution du développement racinaire (**Figure 20C**). Cependant la croissance foliaire est plus sensible au manque d'eau que la croissance racinaire, comme le souligne l'augmentation du ratio R/S (**Figure 20D**). La contrainte appliquée est suffisante pour réduire non seulement la teneur en eau de la rosette (**Figure 20E**), mais aussi son potentiel osmotique (**Figure 20F**).

La contrainte hydrique appliquée, en plus de ralentir le développement, est perçue au niveau moléculaire, comme le soulignent la surexpression du gène *AtRD29a* dans les feuilles « St » (**Figure 20G**) ainsi que la répression du gène *AtTIP1.2* dans la racine « St » (**Figure**

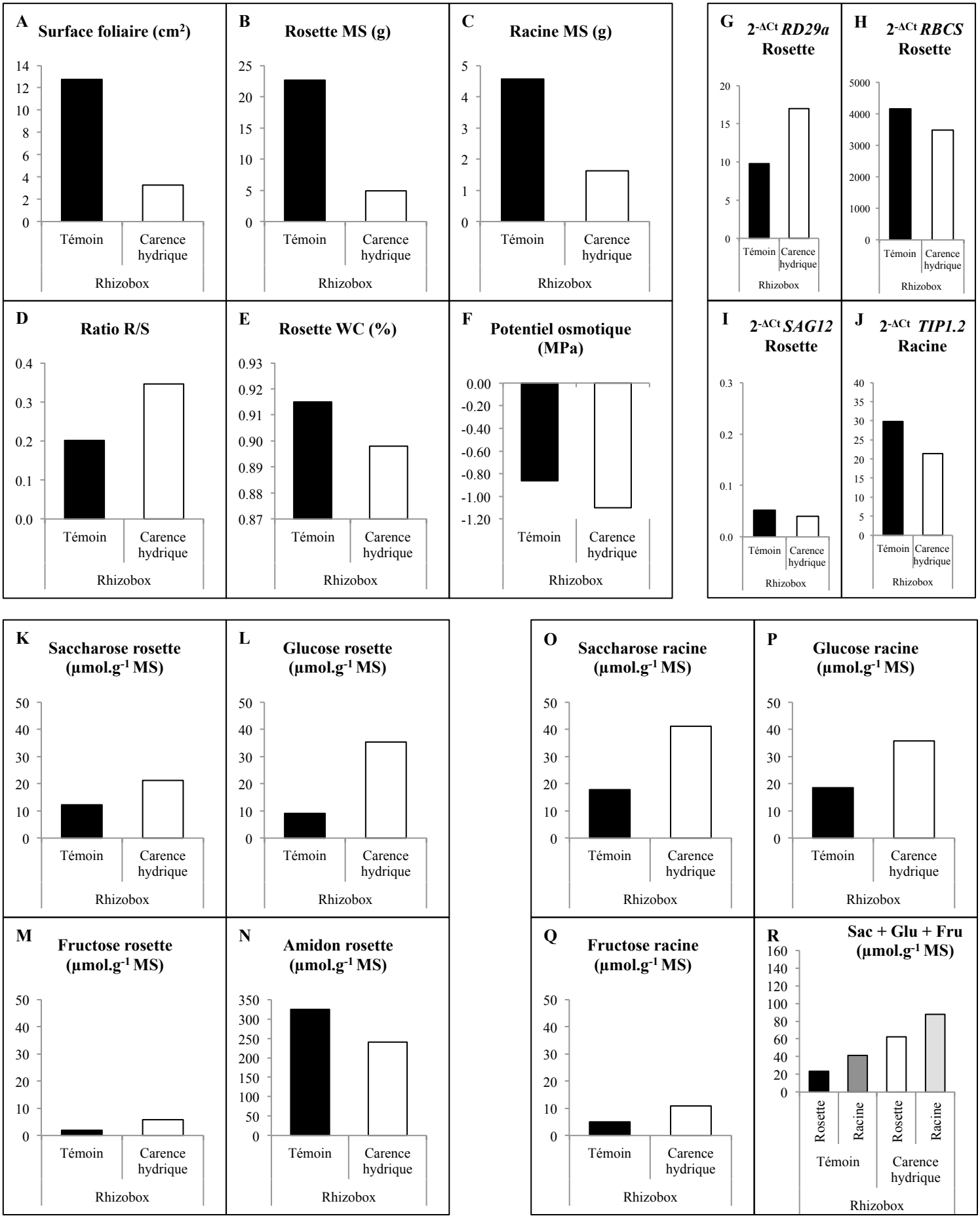


Figure 20 *Récapitulatif de l'effet de la contrainte hydrique sur plusieurs paramètres physiologiques, sur l'expression de gènes marqueurs, sur les teneurs en sucres et amidon de la rosette et sur les teneurs en sucres de la racine.*

A à E, Donnée physiologiques concernant la biomasse et l'état hydrique. **G à J**, Expression relative de gènes marqueurs. **K à N**, Teneurs en sucres solubles et amidon des feuilles. **O à Q**, Teneurs en sucres solubles de la racine. **R**, Sucres solubles totaux.

La figure résume les données concernant l'expérimentation « Carence hydrique » du chapitre IV.

20J). Notons que les niveaux d'induction et de répression respectifs des gènes *AtRD29a* et *AtTIP1.2* sont bien moins importants en réponse à la contrainte hydrique qu'en réponse à la contrainte osmotique. En réponse à la carence hydrique, l'expression du gène *AtRBCS* est légèrement réduite (**Figure 20H**). Quant à *AtSAG12*, son niveau d'expression reste faible (**Figure 20I**).

La contrainte hydrique appliquée conduit à une augmentation des teneurs en saccharose, glucose et fructose tant dans les feuilles (**Figure 20K, L et M)** que dans les racines (**Figure 20O, P et Q**). A l'issue de la contrainte hydrique, la racine conserve une teneur en sucres solubles totaux supérieure à celle de la rosette, tout comme en condition témoin (**Figure 20R**). Quant à la teneur en amidon dans les feuilles, elle est légèrement réduite à l'issue du déficit hydrique (**Figure 20N**).

Au niveau de la rosette, la contrainte hydrique appliquée provoque une augmentation des niveaux de transcrits des gènes *AtSUC2*, *AtSWEET11*, *AtSWEET12*, *AtSWEET13* et *AtSWEET15* (**Figure 21A et C**). Alors que l'expression du gène *AtSUC1* est particulièrement réduite dans les racines « St », l'expression des gènes *AtSUC2*, *AtSUC4*, *AtSWEET11*, *AtSWEET12*, *AtSWEET13*, *AtSWEET14* et *AtSWEET15* est augmentée en réponse à la contrainte hydrique appliquée (**Figure 21B et D**).

En conclusion, la contrainte hydrique appliquée en rhizobox induit les réponses phénotypiques et physiologiques classiques d'un tel stress (réduction du développement foliaire et racinaire, augmentation du R/S) sans pour autant provoquer le flétrissement des feuilles, suggérant l'acclimatation des plantes. La surexpression de *AtRD29a* et la répression de *AtTIP1*.2 sont conformes avec la perception d'une baisse de la disponibilité en eau, confirmant que le régime hydrique appliqué en condition « St » est suffisant pour être perçu au niveau moléculaire. Les teneurs en sucres solubles ont à la fois augmenté dans les feuilles et les racines, sans pour autant que l'augmentation soit beaucoup plus importante dans un compartiment que dans un autre. Enfin, la contrainte hydrique appliquée ne semble pas avoir d'incidence sur l'expression du gène *AtSAG12* au stade de récolte considéré.

3 Comparaison des contraintes hydrique et osmotique

Afin de discerner les similarités et les différences provoquées par la contrainte hydrique et la contrainte osmotique, plusieurs analyses en composantes principales (ACP) ont été effectuées en utilisant les différentes conditions (Témoin Rhizobox, Stressé Rhizobox, Témoin Hydroponie, Stressé Hydroponie) comme des individus. Il convient de noter que

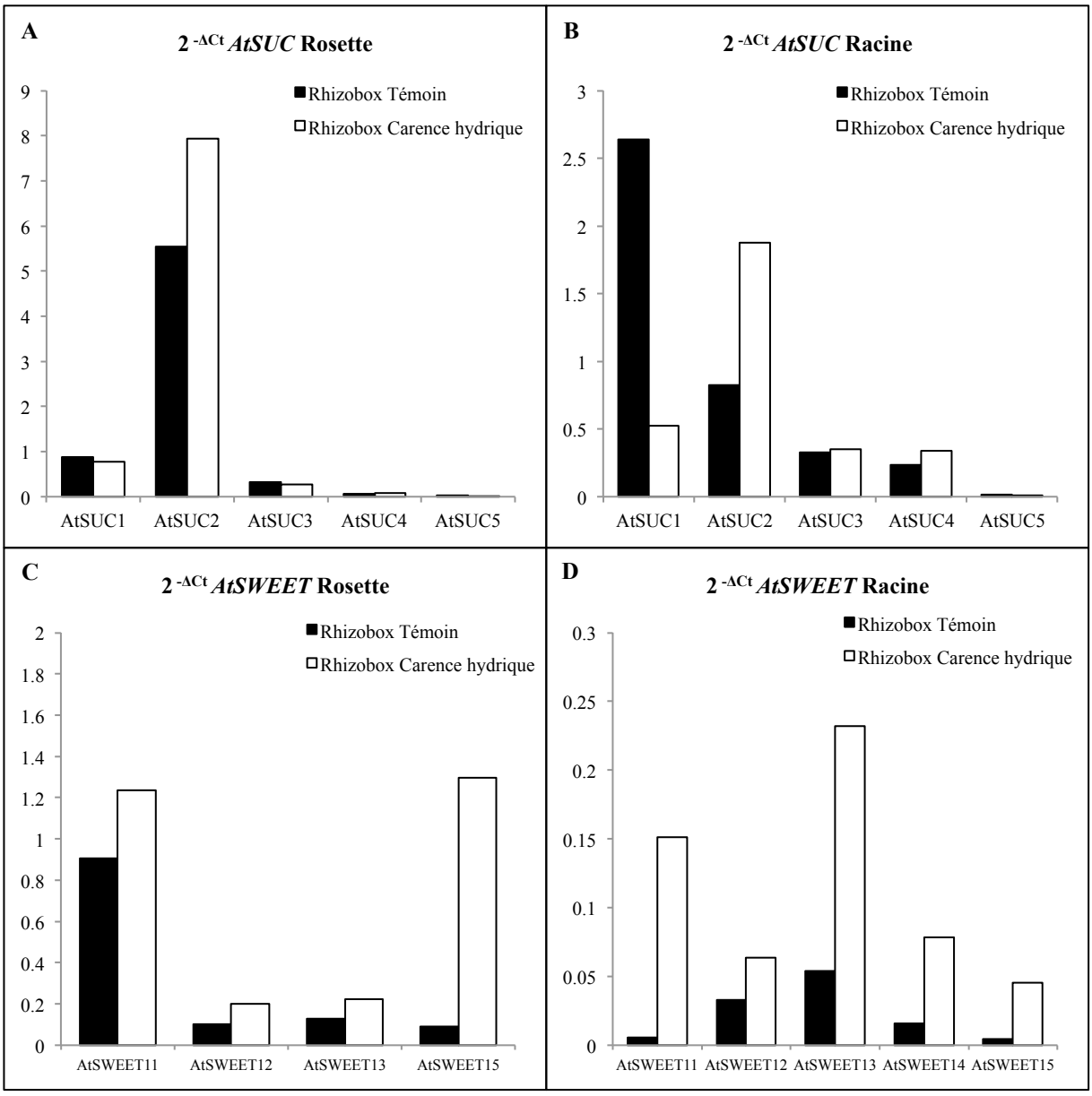


Figure 21 *Récapitulatif de l'effet de la contrainte hydrique sur l'expression relative des gènes AtSUC et AtSWEET dans les feuilles et les racines*.

A, Expression relative des gènes *AtSUC* dans la rosette. **B**, Expression relative des gènes *AtSUC* dans la racine. **C**, Expression relative des gènes *AtSWEET* dans la rosette. **D**, Expression relative des gènes *AtSWEET* dans la racine.

La figure résume les données concernant l'expérimentation « Carence hydrique » du chapitre IV.

même si un critère est principalement impliqué dans le déplacement d'un « individu », il peut aussi être impliqué secondairement dans le déplacement d'un « autre individu ».

3.1 Développement, statut hydrique et expression des gènes marqueurs

Nous avons, dans un premier temps, discerné les effets provoqués par chacune des deux contraintes sur le développement, le statut hydrique et l'expression des gènes marqueurs. Les axes F1 et F2 expliquent respectivement 50,6% et 42,5% de la variance totale (**Figure 22A**). L'axe F1 est positivement corrélé avec l'expression de *AtRD29a* et *AtSAG12,* et négativement avec l'expression de *AtTIP1*.2 et *AtRBCS* ainsi que le potentiel osmotique et la teneur en eau de la rosette (**Figure 22B**). L'axe F2 est, quant à lui, positivement associé avec la surface foliaire, et la masse sèche de la rosette et de la racine, et négativement avec le ratio R/S (**Figure 22B**). Ainsi le déplacement selon l'axe F2 est particulièrement associé avec les paramètres associés à la biomasse, alors que le déplacement selon l'axe F1 est fortement relié au statut hydrique et à l'expression des différents gènes marqueurs choisis.

Les plantes « Tm Hydroponie » et « Tm Rhizobox » ne se différencient que selon l'axe F2, les plantes « Tm Hydroponie » étant situées plus haut sur l'axe F2 que les plantes « Tm Rhizobox » dans le plan défini par F1 et F2 (**Figure 22A**). Ce positionnement est principalement dû à la plus faible biomasse des plantes cultivées en rhizobox.

La contrainte osmotique génère un déplacement vers le bas selon l'axe F2 (-2,21) et un déplacement important vers la droite selon l'axe F1 (+5,50). Si la contrainte hydrique génère aussi un déplacement vers la droite selon l'axe F1 et vers le bas selon l'axe F2, l'amplitude du déplacement est moins importante qu'en réponse à la contrainte osmotique (F1, +1,39 ; F2, -1,79) (**Figure 22A**). Les plantes « St hydroponie » et « St Rhizobox » se différencient donc ici particulièrement selon les deux axes (écart sur l'axe F1, 4,08 ; écart sur l'axe F2, 3,39).

Les deux contraintes génèrent donc le même type de déplacement dans le plan, et c'est l'ampleur du déplacement qui caractérise chacune des deux contraintes, le déplacement étant notamment plus important dans le cas de la contrainte osmotique suite à (1) la hausse de l'expression des gènes *AtRD29a* et *AtSAG1*2, (2) la plus importante réduction de l'expression des gènes *AtTIP1*.2 et *AtRBCS* et (3) la plus forte réduction du potentiel osmotique.

3.2 Teneurs en sucres solubles et amidon

Nous avons, dans un second temps, discerné les effets provoqués par chacune des deux contraintes sur les teneurs en sucres solubles de la feuille et des racines ainsi que sur les

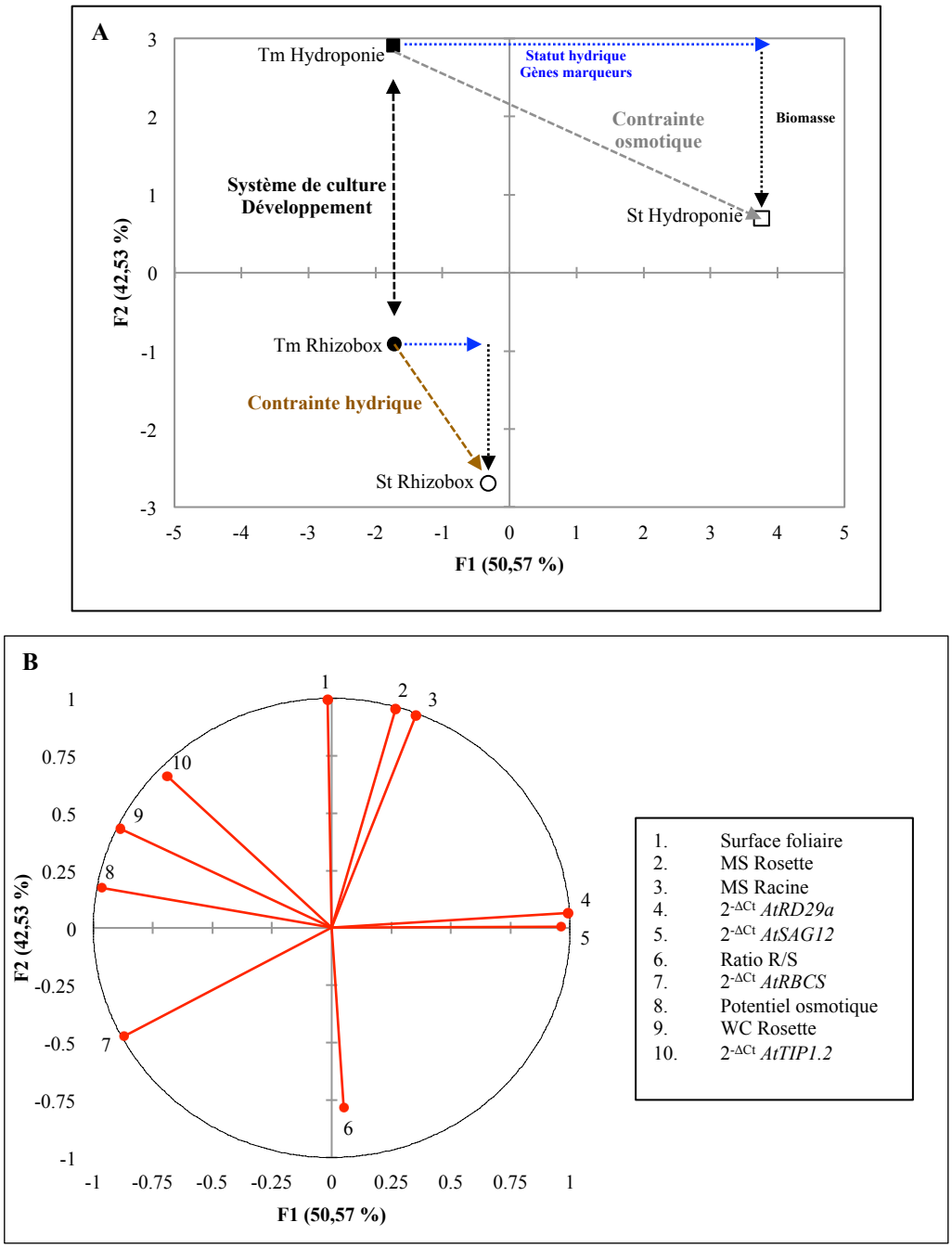


Figure 22 *Analyse multivariée de l'effet de la contrainte osmotique et de la contrainte hydrique sur des paramètres liés au développement et au statut hydrique et sur l'expression de gènes marqueurs.*

A, Analyse en composantes principales (ACP) montrant la position des 4 « individus » dans le plan défini par l'axe F1 et l'axe F2 expliquant 93,1% de la variance totale. **B**, Variables utilisées pour effectuer l'ACP avec leur projection dans le plan défini par F1 et F2. Les données utilisées sont celles présentée en **Figure IX.1 et 3**.

teneurs en amidon de la rosette. Les axes F1 et F2 expliquent respectivement 65,9% et 27,2% de la variance totale (**Figure 23A**). L'axe F1 est positivement corrélé avec les teneurs en saccharose et fructose de la racine et négativement avec la teneur en amidon de la rosette (**Figure 23B**). L'axe F2 est, quant à lui, positivement associé avec les teneurs en glucose et saccharose de la rosette, et négativement avec les teneurs en fructose de la rosette et glucose de la racine (**Figure 23B**). Toutefois ces quatre paramètres sont aussi positivement associés avec l'axe F1 (**Figure 23B**).

Les plantes « Tm Hydroponie » et « Tm Rhizobox » se distinguent légèrement selon l'axe F1 (écart sur l'axe F1, 0,69) dans le plan défini par les axes F1 et F2, en partie en raison de la faible différence au niveau de la teneur en amidon mesurée et sont finalement peu différentes selon les critères choisis ici.

La contrainte osmotique génère un déplacement vers la droite selon l'axe F1 (+3,13) et vers le haut selon l'axe F2 (+2,62). Si la contrainte hydrique génère aussi un déplacement vers la droite selon l'axe F1 (+5,18), elle provoque en revanche un déplacement vers le bas selon l'axe F2 (-1,35) (**Figure 23A**). Les plantes « St hydroponie » et « St Rhizobox » se différencient donc ici particulièrement selon l'axe F2 (écart sur l'axe F2, 3,80).

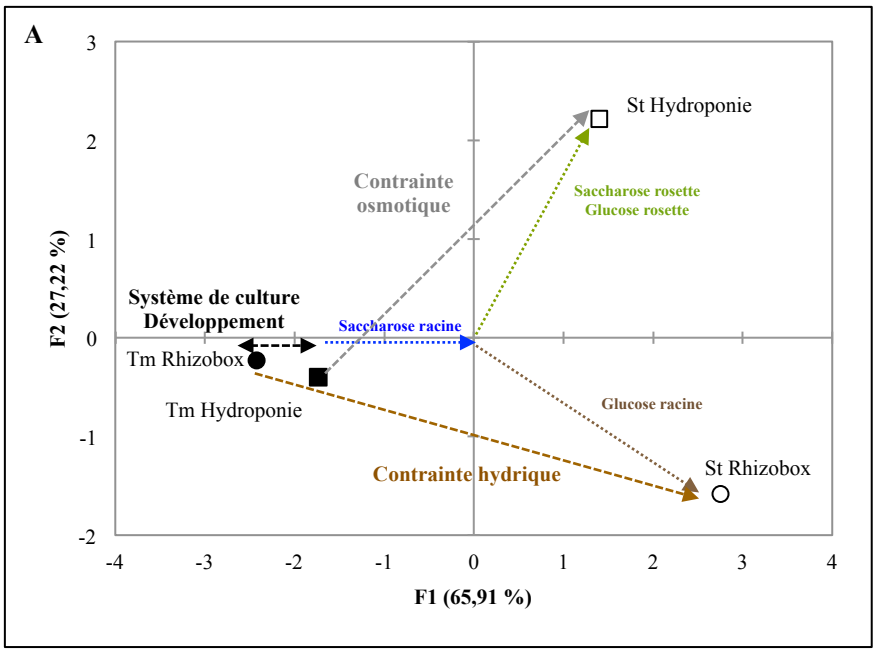
Les deux contraintes génèrent donc un déplacement vers la droite sur l'axe F1, un déplacement principalement du à l'augmentation de la teneur en saccharose dans la racine. Toutefois, le déplacement généré par les deux contraintes sur l'axe F2 est opposé : vers le bas pour la contrainte hydrique et vers le haut pour la contrainte osmotique. En conséquence la contrainte osmotique est principalement caractérisée par la forte hausse des teneurs en saccharose et glucose de la rosette. En revanche, la contrainte hydrique se différencie particulièrement par la forte augmentation de la teneur en glucose de la racine. On retrouve donc des différences majeures au niveau des teneurs en sucres entre les deux contraintes.

3.3 Expression des transporteurs de saccharose

En dernier lieu, nous avons discerné les effets provoqués par chacune ces deux contraintes sur l'expression des transporteurs de sucres dans les feuilles et les racines.

3.3.1 Dans la rosette

Les axes F1 et F2 expliquent respectivement 60,5% et 32,3% de la variabilité totale (**Figure 24A**). L'expression d'*AtSWEET11*, d'*AtSWEET12*, d'*AtSWEET13* d'*AtSWEET15* est principalement corrélée positivement avec l'axe F1. L'expression d'*AtSUC3* est positivement



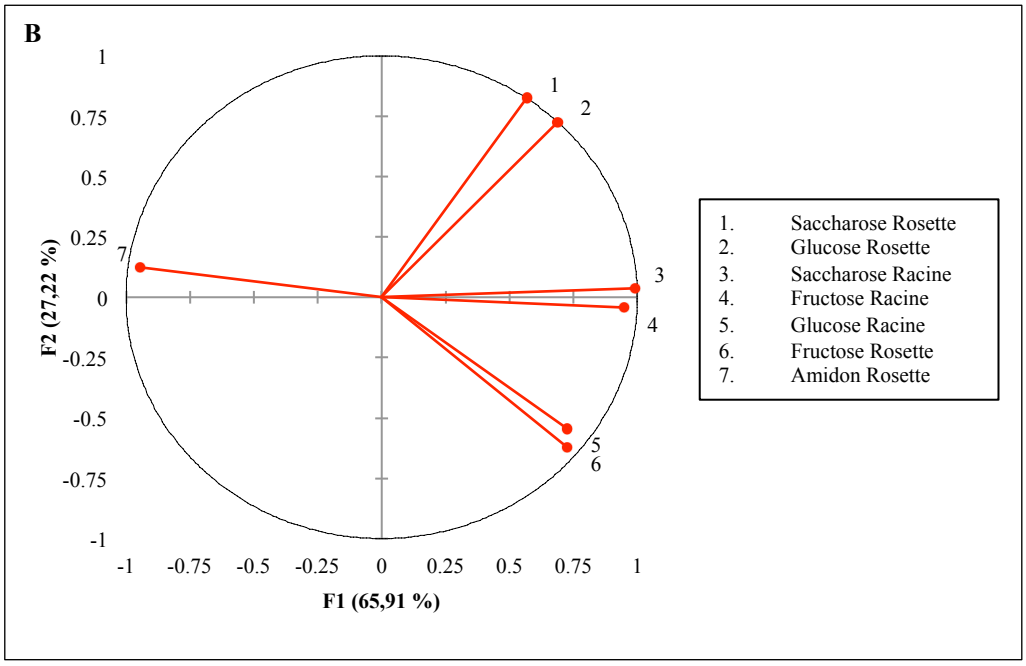


Figure 23 *Analyse multivariée de l'effet de la contrainte osmotique et de la contrainte hydrique sur les teneurs en sucres solubles de la rosette et de la racine ainsi que sur la teneur en amidon de la rosette.*

A, Analyse en composantes principales (ACP) montrant la position des 4 « individus » dans le plan défini par l'axe F1 et l'axe F2 expliquant 93,1% de la variance totale. **B**, Variables utilisées pour effectuer l'ACP avec leur projection dans le plan défini par F1 et F2.
Les données utilisées sont celles présentée en **Figure IX.1 et 3**.

associée avec les axes F1 et F2 alors que celle d'*AtSUC5* l'est négativement avec ces deux mêmes axes. L'expression d'*AtSUC2* et d'*AtSUC4* est corrélée positivement avec l'axe F1 et négativement avec l'axe F2. Enfin, l'expression d'*AtSUC1* est principalement corrélée positivement avec l'axe F2 (**Figure 24B**).

Les plantes « Tm Hydroponie » et « Tm Rhizobox » sont séparées dans le plan défini par F1 et F2, les plantes « Tm Hydroponie » étant situées plus en haut (+3,20) et plus à droite (+1,48) que les plantes « Tm Rhizobox » en partie parce qu'*AtSUC5* n'est pas exprimé dans les plantes cultivées en hydroponie (**Figure 24A**).

La contrainte osmotique provoque un déplacement vers la droite selon l'axe F1 (+4,82) et vers le bas selon l'axe F2 (+2,36). Quant à la contrainte hydrique, elle génère le même type de déplacement mis dans une moindre ampleur sur chacun des axes (F1, +2,39 ; F2, +1,51). Les plantes « St hydroponie » et « St Rhizobox » se différencient donc ici particulièrement selon les deux axes (écart sur l'axe F1, 3,91 ; écart sur l'axe F2, 2,35).

Les deux contraintes génèrent donc le même type de déplacement dans le plan, et c'est l'ampleur du déplacement qui caractérise chacune des deux contraintes, le déplacement étant plus important dans le cas de la contrainte osmotique suite à l'augmentation importante de l'expression des gènes *AtSWEET* étudiés et plus particulièrement d'*AtSWEET15*.

3.3.2 Dans la racine

Les axes F1 et F2 expliquent respectivement 54,8% et 28,3% de la variabilité totale (**Figure 25A**). L'expression d'At*SUC4*, d'*AtSWEET11*, d'*AtSWEET13*, d'*AtSWEET14* d'*AtSWEET15* est principalement corrélée positivement avec l'axe F1. L'expression d'*AtSUC2* et d'*AtSWEET12* est corrélée positivement avec l'axe F1 et négativement avec l'axe F2. L'expression d'*AtSUC3* et d'*AtSUC1* est négativement associée principalement avec l'axe F2. Enfin l'expression d'*AtSUC5* est positivement corrélée principalement avec l'axe F2 (**Figure 25A**).

Les plantes « Tm Hydroponie » et « Tm Rhizobox » sont séparées dans le plan défini par F1 et F2, les plantes « Tm Hydroponie » étant situées plus en bas (-4,70) et plus à droite (+0,64) que les plantes « Tm Rhizobox » en partie parce qu'*AtSUC5* n'est pas exprimé dans les plantes cultivées en hydroponie (**Figure 25A**).

La contrainte osmotique provoque un déplacement vers la gauche selon l'axe F1 (-1,66) et vers le haut selon l'axe F2 (+2,73). A l'opposé, la contrainte hydrique provoque un déplacement vers la droite selon l'axe F1 (+5,11) et vers le bas selon l'axe F2 (-1,76). Les

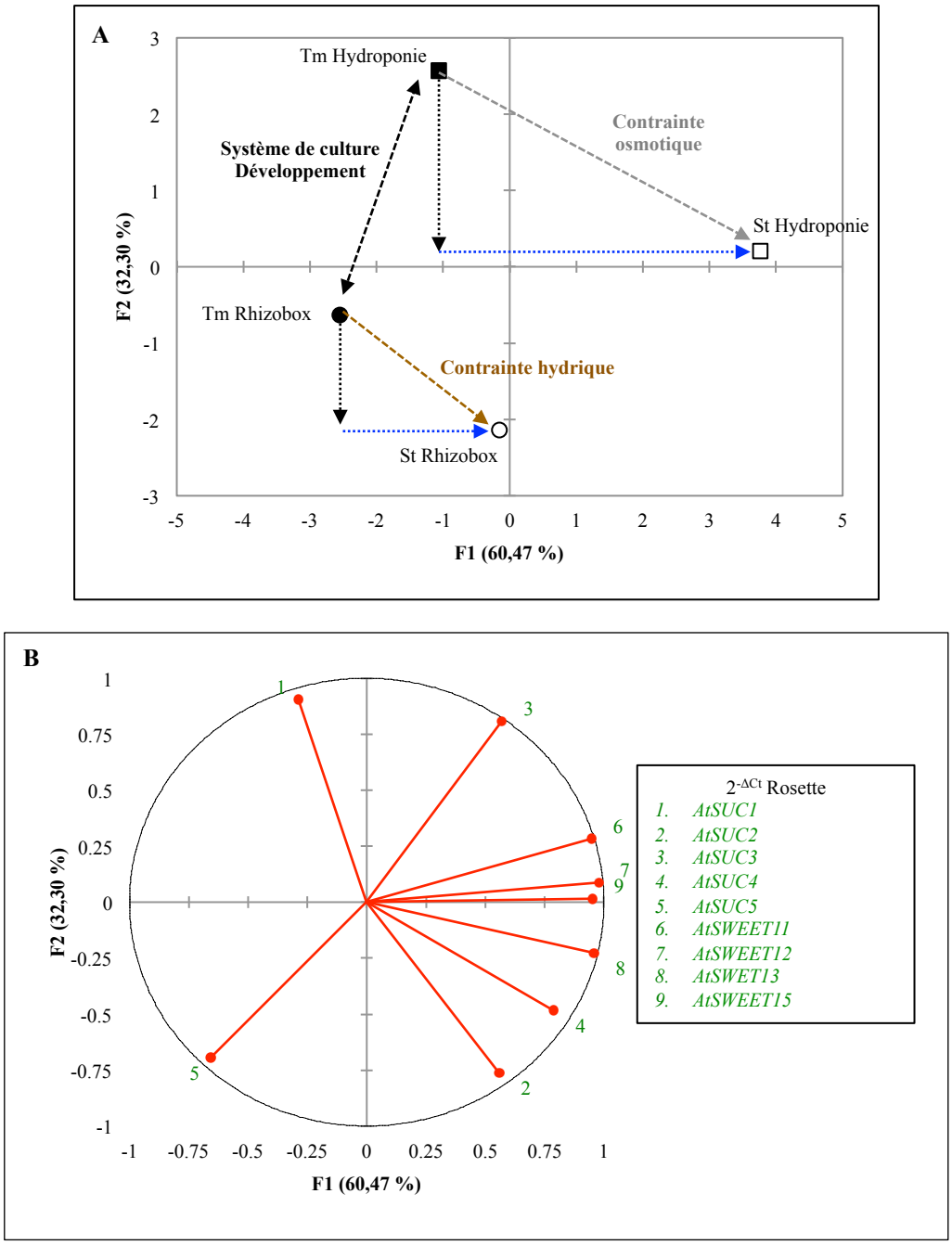


Figure 24 *Analyse multivariée de l'effet de la contrainte osmotique et de la contrainte hydrique sur l'expression des transporteurs de saccharose dans la rosette.*
A, Analyse en composantes principales (ACP) montrant la position des 4 « individus » dans le plan défini par l'axe F1 et l'axe F2 expliquant 77% de la variance totale. **B**, Variables utilisées pour effectuer l'ACP avec leur projection dans le plan défini par F1 et F2.
Les données utilisées sont celles présentée en **Figure IX.2 et 4**.

plantes « St hydroponie » et « St Rhizobox » se différencient donc ici particulièrement selon l'axe F1 (écart sur l'axe F1, 6,12).

Les deux contraintes génèrent donc des déplacements totalement opposés dans le plan défini par F1 et F2. Si une réponse commune est observée en réponse aux deux contraintes (réduction de l'expression d'*AtSUC1*), les deux contraintes se caractérisent principalement par des réponses antagonistes, à savoir une réduction de l'expression des principaux *AtSWEET* (excepté *AtSWEET14*) étudiés, d'*AtSUC2* et d'*AtSUC4* dans la racine en réponse à la contrainte osmotique alors qu'ils sont plus exprimés en réponse à la contrainte hydrique.

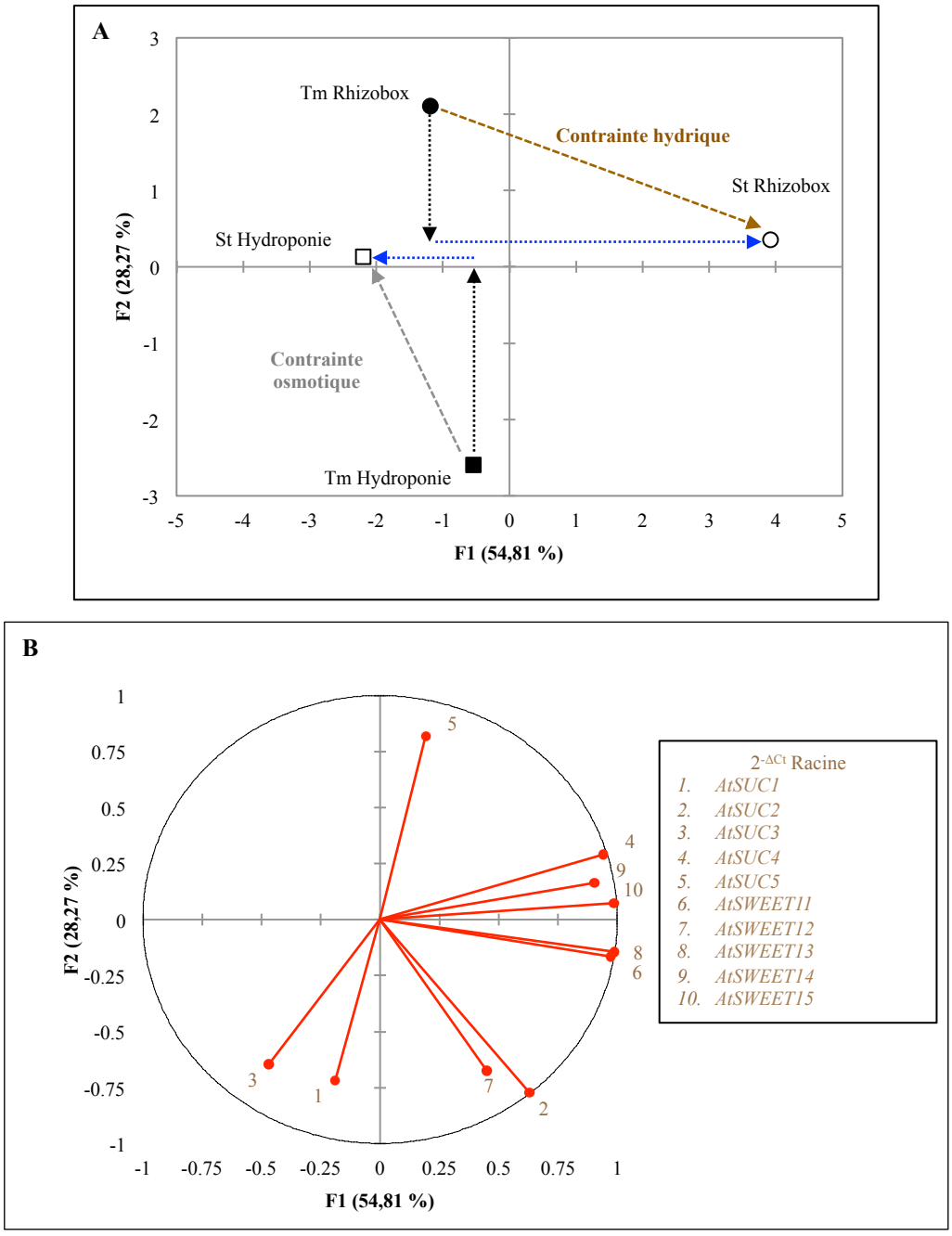


Figure 25 *Analyse multivariée de l'effet de la contrainte osmotique et de la contrainte hydrique sur l'expression des transporteurs de saccharose dans la racine.*
A, Analyse en composantes principales (ACP) montrant la position des 4 « individus » dans le plan défini par l'axe F1 et l'axe F2 expliquant 77% de la variance totale. **B**, Variables utilisées pour effectuer l'ACP avec leur projection dans le plan défini par F1 et F2.
Les données utilisées sont celles présentée en **Figure IX.2 et 4**.

Discussion

1 Système d'hydroponie et contrainte osmotique

1.1 Le système d'hydroponie : avantages et inconvénients

Les premières expérimentations effectuées au cours de cette thèse ont été réalisées sur des plantes cultivées en système d'hydroponie spécifiquement conçu pour *A. thaliana* (Araponics). Un système d'hydroponie, constitué de l'assemblage de 4 blocs, permet d'accueillir au maximum 72 plantes, ce qui est un réel avantage quant à l'obtention de grandes quantités de matériel végétal. La capacité maximale du système n'est utilisable que pour des jeunes plantes (15 à 20 jours) or nous avons travaillé sur des plantes plus âgées. Au delà de 15 à 20 jours, les feuilles de différentes rosettes commencent à se toucher, générant alors une contrainte physique susceptible d'altérer la croissance de la rosette. Au niveau racinaire, le même phénomène est observé avec un enchevêtrement des racines entre elles. C'est pourquoi les expérimentations « Stress osmotique » et « Développement » ont été effectuées avec au maximum 28 plantes par système (= 7 plantes par bloc) au début de chacune des expérimentations. Si la réduction du nombre de plante empêche l'enchevêtrement des racines, il est toutefois impossible de définir l'architecture racinaire des plantes cultivées en hydroponie. C'est donc la mesure de la biomasse de la racine qui permet l'évaluation du développement racinaire dans un tel système.

En revanche, le système d'hydroponie est compatible avec le développement complet d'*A. thaliana* et par conséquent l'obtention de graines (**Chapitre III**). Il convient d'ailleurs de noter que le cycle de développement des plantes *A. thaliana* cultivées en hydroponie est particulièrement long, probablement car ce système favorise l'accumulation de biomasse (Arteca and Arteca, 2000; Gibeaut *et al.*, 1997). Les quantités de matériel récolté pour chacun des stades de développement sont assez conséquentes pour réaliser les analyses de biochimie et de biologie moléculaire souhaitées, et plus particulièrement pour les racines. Nous avons donc pu établir les profils d'expression des transporteurs de saccharose et les profils glucidiques des principaux sucres pour chacun des organes à chacun des stades choisis au cours des phases végétatives et reproductives, apportant ainsi une vision globale de l'expression des transporteurs de saccharose en lien avec les teneurs en sucres au cours du développement de la plante.

1.2 Le PEG comme agent osmotique

Afin d'étudier l'expression des transporteurs de saccharose en lien avec la variation des relations source-puits pour le carbone, nous avons réduit la disponibilité en eau de la racine d'*A. thaliana*, contrainte altérant les relations sources puits (Lemoine *et al.*, 2013; Muller *et al.*, 2011) Pour ce faire, nous avons mimé la contrainte hydrique sur les plantes cultivées en hydroponie *via* une contrainte osmotique. En accord avec les résultats de Verslues *et al.* (2006), il avait été décidé d'utiliser un poly-éthylène-glycol de haut poids moléculaire (PEG 6000) afin de mimer ce stress (Mainson, 2013). Le PEG est l'agent osmotique dont les effets seraient les plus proches de ceux exercées par la contrainte hydrique sur la plante (Verslues *et al.*, 2006). Le PEG 6000 ne pénétrerait pas à l'intérieur de la plante (Carpita *et al.*, 1979) contrairement à des agents osmotiques comme le mannitol ou le PEG400, ce qui génère des effets physiologiques différents (Kaufmann and Eckard, 1971). Quand le mannitol pénètre dans les cellules de la plante, il entraine une plasmolyse des cellules sans pour autant affecter le volume délimité par la paroi cellulaire de chacune des cellules (Verslues *et al.*, 2006). Cette réponse est différente de celle générée par la contrainte hydrique. Quand la teneur en eau du sol diminue, l'eau est retirée non seulement de la cellule mais aussi de sa paroi cellulaire, ce qui aboutit à la cytorrhyse, un processus où la paroi cellulaire et la cellule rétrécissent (Oertli, 1985). Or, il s'avère que le PEG 6000 génère au niveau cellulaire des effets se rapprochant de la carence hydrique, car il retient l'eau du milieu extérieur mais ne pénètre pas dans la cellule, générant alors la cytorrhyse des cellules plutôt que la plasmolyse (Verslues *et al.*, 2006). Le PEG est donc un bon choix comme agent osmotique. Toutefois ses effets sont importants (flétrissement des feuilles) même à un concentration peu élevée (2,5%).

2 Rhizobox et contrainte hydrique

2.1 La rhizobox : un système présentant de nombreux avantages

Après avoir effectué les premières expérimentations en système d'hydroponie, nous avons choisi de cultiver nos plantes dans des conditions plus proches de l'environnement naturel. C'est pourquoi nous avons développé la rhizobox. Inspiré des travaux de Xiong *et al.* (2006b) et Wenzel *et al.* (2001), la rhizobox permet la culture de 1 à 4 plantes *A. thaliana* dont les systèmes racinaires se développent en deux dimensions entre une plaque de plexiglas transparente et une membrane de nylon au contact du terreau, permettant le passage de l'eau et des minéraux. Un tel système permet non seulement la récolte de racines non souillées par la terre mais également, chose plus importante, l'analyse de l'architecture du système

racinaire (RSA) en 2D. La culture des plantes *A. thaliana* en rhizobox peut s'étendre jusqu'à l'obtention des graines. A ce stade de développement, il est en revanche préférable de n'avoir qu'une seule plante par rhizobox.

Au cours des différentes expérimentations menées au cours de cette thèse, nous avons montré à quel point la rhizobox était un outil innovant et pratique. En plus de permettre l'analyse du RSA en 2D, la rhizobox est performante quant à la détermination de la localisation de l'expression de gènes (GUS, GFP), *in situ*, dans la racine de plantes adultes (**Chapitres VI, VII et VIII**). Aussi, ce système est compatible avec la culture et l'analyse de plantes *A. thaliana* greffées. Enfin, le principal objectif, en mettant au point ces rhizobox, était d'appliquer une contrainte hydrique à des plantes *A. thaliana* depuis la germination jusqu'au stade défini (30 jours ou 49 jours selon les expérimentations), ce qui a été effectué avec succès.

2.2 Détermination de la contrainte hydrique appliquée

Il existe deux grands types de protocole pour réduire la disponibilité en eau dans un sol, l'arrêt d'arrosage et la réduction de l'apport en eau. Quand l'intensité de la sécheresse générée par l'arrêt d'arrosage s'accroît au fur et à mesure du temps (ex : Alexandersson *et al.* (2005a)), celle de la contrainte par réduction de l'apport en eau reste constante au cours du temps (ex : Hummel *et al.* (2010)). De ce fait, les conséquences générées par les deux contraintes sont bien souvent différentes. Chez *A. thaliana*, la contrainte appliquée par arrêt d'arrosage sur des plantes dont les rosettes sont pleinement développées aboutit rapidement à un flétrissement des organes foliaires (Abadie, 2012), phénomène aussi observé dans notre étude en réponse à la contrainte osmotique. La rapidité d'apparition des symptômes rend alors impossible ou inefficace l'apparition des mécanismes d'acclimatation et conduit par conséquent à la mort des plantes si la contrainte se prolonge dans le temps. En revanche, réduire la disponibilité en eau de façon constante et modérée précocement au cours du développement permet la mise en place des mécanismes nécessaires à l'acclimatation des plantes et à leur survie (Chaves *et al.*, 2003; Hummel *et al.*, 2010). C'est pourquoi nous avons choisi de réduire la disponibilité en eau du sol en appliquant une contrainte hydrique modérée et constante. Les premières expérimentations de carence hydrique effectuées par Dany Maison (2013) ont été menées selon deux régimes hydriques, témoin (= capacité au champ) (« Tm » ; 0,8 g d'eau par g de terreau frais) et stressé (« St » ; 0,6g d'eau par g de terreau frais). Malgré la réduction du développement de la rosette et du système racinaire des plantes « St », les gènes marqueurs de stress n'étaient pas différemment régulés chez les plantes

« St » par rapport à la condition « Tm » (Mainson, 2013). De même, la mesure du potentiel osmotique et de la teneur en eau des rosettes « St » n'a montré aucune différence notable avec les plantes « Tm ». C'est pourquoi nous avons changé le mode opératoire en réduisant le régime hydrique des plantes « St » (0,4 g d'eau par g de terreau frais) tout en conservant celui des plantes « Tm » (0,8 g d'eau par g de terreau frais). Ce régime hydrique nous a permis d'obtenir les réponses phénotypiques et physiologiques typiques d'une contrainte hydrique.

3 Rhizobox vs. Hydroponie

3.1 Les plantes « Tm Hydroponie » et « Tm Rhizobox » se distinguent par plusieurs aspects

Alors que les plantes récoltées en rhizobox sont âgées de 30 jours, celles récoltées en hydroponie sont âgées de 35 jours. Ceci conduit inévitablement à une distinction claire des plantes « Tm rhizobox » et « Tm Hydroponie » en terme de croissance (**Figure 22**), ces dernières ayant une biomasse plus importante. Ce n'est très probablement pas la seule raison expliquant cette différence. En effet, 5 jours de culture supplémentaire ne peuvent expliquer une telle différence au niveau de la biomasse. La culture hydroponique des plantes *A. thaliana* est connue pour favoriser l'accumulation de biomasse par rapport à des plantes cultivées en sol (Arteca and Arteca, 2000; Norén *et al.*, 2004). Ceci est lié d'une part à la facilité pour la plante d'extraire l'eau et les minéraux de son milieu et d'autre part à la plus grande oxygénation de l'environnement racinaire (Gibeaut *et al.*, 1997). Bien que la culture hydroponique d'*A. thaliana* favorise sa croissance par rapport à la culture en rhizobox (**Figure 18B, C et 20B, C**), le ratio R/S des plantes « Tm » pour chacun des systèmes de culture n'est pas différent (**Figure 18D et 20D**), ce qui suggère que la proportion de carbone investi dans la croissance racinaire reste équivalente quelque soit le système de culture utilisé. Toutefois, l'investissement journalier en carbone (quantité) doit être vraisemblablement plus important pour soutenir le métabolisme et la plus forte accumulation de biomasse de la racine des plantes cultivées en hydroponie.

La teneur en amidon de la rosette des plantes « Tm Rhizobox » est légèrement plus importante que celle des plantes « Tm Hydroponie » (**Figure 18N et 20N**) peut être en raison de la légère différence d'âge, étant donné que la teneur en amidon foliaire décroit progressivement au cours du développement d'*A. thaliana* (**Chapitre III**). En revanche, les teneurs en sucres solubles de la rosette ne semblent pas être affectées par le système de culture où la légère différence d'âge (**Figure 18K, L, M et 20K, L, M**). Concernant la racine,

les teneurs en glucose sont plus importantes dans les plantes « Tm Rhizobox » alors que les teneurs en saccharose sont sensiblement plus faibles dans ces mêmes plantes par rapport aux plantes « Tm Hydroponie » (**Figure 18O, P et 20O, P**). Ces différences relevées dans les racines sont probablement propres aux systèmes de culture, l'environnement racinaire étant particulièrement différent dans chacun des systèmes, le sol et plaques de plexiglass, exerçant une contrainte physique bien plus importante que le milieu liquide sur la racine. On peut également supposer que les structures anatomiques des deux systèmes sont assez différentes même si nous n'avons étudié que les racines en rhizobox.

Concernant l'expression des transporteurs de saccharose, la première différence notable est l'absence d'expression d'*AtSUC5* dans la racine et la rosette des plantes en culture hydroponique même si l'expression d'*AtSUC5* reste faible dans les plantes cultivées en hydroponie (**Figure 19 et 21**). Excepté cette différence, l'expression des transporteurs de saccharose dans la rosette ne semble pas fondamentalement affectée par le mode de culture.

En revanche, l'expression d'*AtSUC1*, d'*AtSUC2*, d'*AtSWEET11*, d'*AtSWEET12* et d'*AtSWEET13* est plus forte dans les racines des plantes cultivées en hydroponie par rapport à celles cultivées en rhizobox, soulignant encore un effet « système de culture » exercé sur la racine. Si, comme suggéré dans le chapitre IV, une partie de ces transporteurs sont impliqués dans l'allocation du saccharose dans la racine, ce résultat ne serait pas surprenant étant donné qu'il est très probable que l'investissement en carbone soit plus important dans la racine des plantes cultivées en hydroponie pour soutenir l'accumulation de biomasse et le métabolisme.

3.2 Contrainte hydrique vs. Contrainte osmotique

3.2.1 Des effets communs d'ampleur différente…

3.2.1.1 …sur la croissance

La contrainte hydrique et la contrainte osmotique génèrent des effets similaires quant aux paramètres de biomasse, à savoir une réduction de l'accumulation de biomasse et une augmentation du R/S comme le montre nos résultats (**Figure 18 et 20**). Cette observation est confirmée à l'aide de l'ACP présentée en **figure 22**, où il est constaté que les deux stress génèrent un déplacement vers le bas selon l'axe F2, lui même principalement corrélé avec les paramètres de biomasse.

Toutefois, l'accumulation de biomasse est plus réduite au cours de la contrainte hydrique (**Figure 20B et C**) qu'au cours de la contrainte osmotique (**Figure 18B et C**), en

grande partie à cause du mode d'application de chacun des stress. En effet quand la contrainte hydrique est appliquée dès la germination pendant 30 jours, la contrainte osmotique est progressivement instaurée sur des plantes âgées de 24 jours pendant 11 jours. En conséquence, les plantes ayant subi la contrainte hydrique sont plus susceptibles d'avoir mis en place des mécanismes d'acclimatation (Chaves *et al.*, 2003), comme le suggère l'absence de flétrissement des rosettes. La contrainte osmotique, quant à elle, a été appliquée sur des plantes dont la rosette est particulièrement bien développée, rendant impossible tout mécanisme d'acclimatation visant à réduire la surface d'évapotranspiration, aboutissant à un faible contrôle des pertes en eau et *in fine* au flétrissement des feuilles.

3.2.1.2 …sur le statut hydrique et la perception du stress au niveau moléculaire

Les plantes « St Hydroponie » se distinguent particulièrement des plantes « St Rhizobox » selon l'axe F1 dans le plan de l'ACP (**Figure 22)**, lequel est principalement corrélé avec des paramètres relatifs au statut hydrique et à l'expression de gènes marqueurs liés à la baisse de la disponibilité en eau. Il s'avère en effet, que la contrainte osmotique appliquée réduit plus le potentiel osmotique de la rosette que la contrainte hydrique (**Figure 18F et 20F**). Quant aux deux gènes marqueurs relatifs à la perception de la baisse de la disponibilité en eau, *AtRD29a* dans la rosette (Yamada *et al.*, 2011) et *AtTIP1*.2 dans la racine (Alexandersson *et al.*, 2005a), leurs régulations respectives soulignent la perception du manque d'eau dans les deux organes pour chacune des contraintes. Toutefois, il apparaît que l'amplitude de l'induction d'*AtDR29a* dans la rosette et que le niveau de répression d'*AtTIP1*.2 dans la racine sont bien plus importants en réponse à la contrainte osmotique qu'en réponse à la contrainte hydrique (**Figure 18G, J et 20G, J**), laissant penser que le stress généré par la contrainte osmotique est plus sévère que celui généré par la contrainte hydrique au niveau moléculaire tout comme au niveau phénotypique avec le flétrissement des plantes soumises à la contrainte osmotique.

3.2.1.3 …sur la photosynthèse

De plus, quand l'expression d'*AtRBCS* n'est que très légèrement diminué en réponse à la contrainte hydrique (**Figure 20H**), le niveau de transcrit de ce gène est fortement réduit en réponse à la contrainte osmotique (**Figure 18H**), ce qui tend à montrer que le stress généré par la contrainte osmotique affecte bien plus le métabolisme de la photosynthèse que celui généré par la contrainte hydrique. Ceci est d'autant plus vraisemblable que la conductance stomatique des plantes « St Hydroponie » est proche de 0 à l'issue de la contrainte osmotique

(Mainson, 2013) alors même que l'assimilation du $^{14}CO_2$ des plantes « St Rhizobox » n'est réduite que de 40% en réponse à la contrainte hydrique (**Chapitre IV**). Un tel rapprochement, entre la conductance stomatique mesurée à l'issue de la contrainte osmotique appliquée et l'assimilation évaluée après la période de carence hydrique, est raisonnable étant donné que la réduction de l'assimilation en réponse à une contrainte hydrique modérée est principalement due aux limitations diffusives du CO_2 (conductance stomatique et mésophyllienne) (Flexas *et al.*, 2006a).

3.2.1.4 …sur les teneurs en sucres solubles

Les plantes « St Hydroponie » et « St Rhizobox » sont particulièrement séparées selon l'axe F2 dans le plan de l'ACP (**Figure 23**). Néanmoins, les tendances observées en réponse aux deux contraintes sont les mêmes, à savoir une augmentation des teneurs en sucres solubles dans la rosette et la racine (**Figures 18K, L, M, O, P, Q et 20K, L, M, O, P, Q**). Si les tendances sont les mêmes, l'ampleur de l'augmentation de chacun des sucres dans les deux compartiments n'est pas similaire, expliquant la distinction claire des plantes soumises à la contrainte osmotique et à la contrainte hydrique (**Figure 23**). En effet, la contrainte osmotique conduit principalement à la hausse des teneurs en saccharose et glucose de la rosette alors que la contrainte hydrique se distingue par l'accumulation de glucose dans la racine (**Figure 23**).

3.2.1.5 …conduisant à l'échappement dans le cas du stress osmotique

La contrainte osmotique se caractérise effectivement par une accumulation beaucoup plus importante de saccharose et de glucose dans la rosette par rapport à la contrainte hydrique (**Figure 18K, L et 20K, L**). Ceci est en accord avec l'éventuelle mise en place des mécanismes liés à la sénescence, étant donné que la sénescence est induite par la hausse des teneurs en sucres (Pourtau *et al.*, 2006). Ce scénario est hautement vraisemblable au regard de la forte réduction de l'expression d'*AtRBCS* et de l'induction de l'expression d'*AtSAG12* mesurées dans les feuilles des plantes soumises à la contrainte osmotique. L'expression d'*AtRBCS* décroit progressivement avec l'âge chez *A. thaliana* (**Chapitre III**) alors que l'induction d'*AtSAG12* est hautement spécifique de la sénescence (Gan and Amasino, 1995). Le gène *AtSAG12* code une cystéine protéase impliquée dans l'hydrolyse des protéines du stroma lors du démantèlement des chlorophylles (Diaz-Mendoza *et al.*, 2014). Par conséquent, l'induction d'*AtSAG12* est compatible avec une remobilisation des ressources carbonées que laisse suggérer l'importante accumulation de sucres solubles dans les feuilles

en réponse à la contrainte osmotique appliquée (**Figure 18K et L**). La remobilisation du carbone foliaire est l'étape préliminaire à la transition florale et l'apparition des organes reproducteurs, phénomène parfois observé chez certaines plantes (exclues de l'échantillonnage) à l'issue de la contrainte osmotique (données non présentées) mais pas lors de la contrainte hydrique en rhizobox.

Si la contrainte osmotique se caractérise par des changements au niveau foliaire et racinaire, ceux-ci sont de bien moindre ampleur dans la racine. La contrainte osmotique induit certes une accumulation de sucres solubles dans la racine, cependant l'amplitude de l'augmentation des teneurs en sucres solubles est dans la rosette telle que le différentiel de la teneur en sucres totaux, d'abord positif pour la racine, devient largement négatif (**Figure 18R**), mettant en lumière une rupture de « l'équilibre » existant en condition témoin. On peut y voir un lien avec le fait que dans le même temps le ratio R/S n'est que peu augmenté (**Figure 18D**), soulignant un faible investissement supplémentaire dans le développement racinaire. Il semblerait donc que l'investissement dans la croissance racinaire soit (1) non privilégié ou (2) impossible. Il convient en effet de rappeler que la rosette des plantes soumises à la contrainte osmotique est flétrie, mettant en lumière une altération du statut hydrique vraisemblablement due à une perturbation du flux d'eau depuis le milieu extérieur vers la rosette. Cette altération du statut hydrique pourrait avoir un effet sur la translocation des sucres vers les puits car la pression hydrostatique nécessaire au transport *via* le flux de masse provient majoritairement du xylème (Münch, 1930; Sevanto, 2014). Le fait que la contrainte osmotique réduit considérablement la capacité exportatrice d'une feuille source, en plus de diminuer la proportion de saccharose radiomarqué exportée vers la racine est en accord avec cette conclusion (**Chapitre III**). Ainsi, en réponse à la contrainte osmotique, les sucres s'accumuleraient dans la rosette en raison de la perturbation hydraulique diminuant le transport des sucres depuis les feuilles sources vers la racine. Il est alors logique d'imaginer que cette accumulation de sucres lors de la contrainte osmotique a conduit à la mise en place du processus de sénescence des feuilles.

La contrainte osmotique en provoquant l'induction des mécanismes liés à la sénescence entrainerait l'accélération du vieillissement de la plante. Un tel scénario est très plausible dans le cas de la mise en place d'une stratégie d'échappement où le carbone stocké est rapidement remobilisé pour assurer la reproduction de la plante. Les plantes « St Hydroponie » auraient de ce fait tendance à échapper à la contrainte en mettant en place les mécanismes associés au

raccourcissement du cycle de développement et par conséquent à une reproduction avancée dans le temps avant que la contrainte appliquée ne devienne létale (Chaves *et al.*, 2003).

3.2.1.6 …conduisant à l'évitement et à la tolérance dans le cas de la contrainte hydrique

La contrainte hydrique en rhizobox se distingue par la plus forte accumulation de glucose dans la racine par rapport à la contrainte osmotique (**Figure 18P et 20P**). De plus, la contrainte hydrique génère une augmentation des sucres solubles dans la rosette, cependant cette augmentation est moindre par rapport à la contrainte osmotique. Ainsi, le différentiel de la teneur en sucres totaux, positif pour la racine en condition témoin, le reste lors de la contrainte hydrique (**Figure 20R**). Ceci souligne le maintien de « l'équilibre » des teneurs en sucres entre rosette et racine. Les deux contraintes auraient des effets différents quant aux teneurs en sucres, la contrainte osmotique impactant préférentiellement la rosette, alors que la contrainte hydrique affecte les teneurs en sucres de la rosette et la racine de la même manière.

A l'opposé de la contrainte osmotique, la contrainte hydrique stimule la capacité exportatrice de la rosette, pouvant expliquer en partie à l'importante hausse du ratio R/S et la forte accumulation de sucres dans la racine. Cette augmentation de l'allocation du carbone vers la racine est probablement possible grâce à la hausse des teneurs en sucres de la rosette ainsi que la hausse de l'expression des transporteurs de saccharose impliqués dans le chargement du phloème (*AtSUC2*, *AtSWEET11*, *AtSWEET12*).

Toutefois, ces deux derniers phénomènes sont observés dans la rosette quelque soit la contrainte, même si l'augmentation des teneurs en sucres de la rosette est supérieure dans le cas de la contrainte osmotique. La contrainte hydrique se distingue particulièrement de la contrainte osmotique par l'expression du gène de réponse spécifique à la sénescence, *AtSAG12* (Gan and Amasino, 1995). En effet, à l'issue des 30 jours de contrainte hydrique l'expression d'*AtSAG12* reste faible dans les rosettes soumises au manque d'eau et ne diffère pas des plantes témoins, écartant de ce fait une éventuelle accélération du processus de vieillissement par la contrainte hydrique appliquée contrairement à ce qui avait été observé avec la contrainte osmotique. De surcroît, après 49 jours de contrainte hydrique, l'expression d'*AtSAG12* est toujours faible dans la rosette des plantes soumises au déficit hydrique alors même qu'elle devient importante dans la rosette des plantes témoins, suggérant un ralentissement du vieillissement des plantes manquant d'eau comme en témoigne le retard de floraison observée en réponse à la contrainte hydrique (**Chapitre IV**).

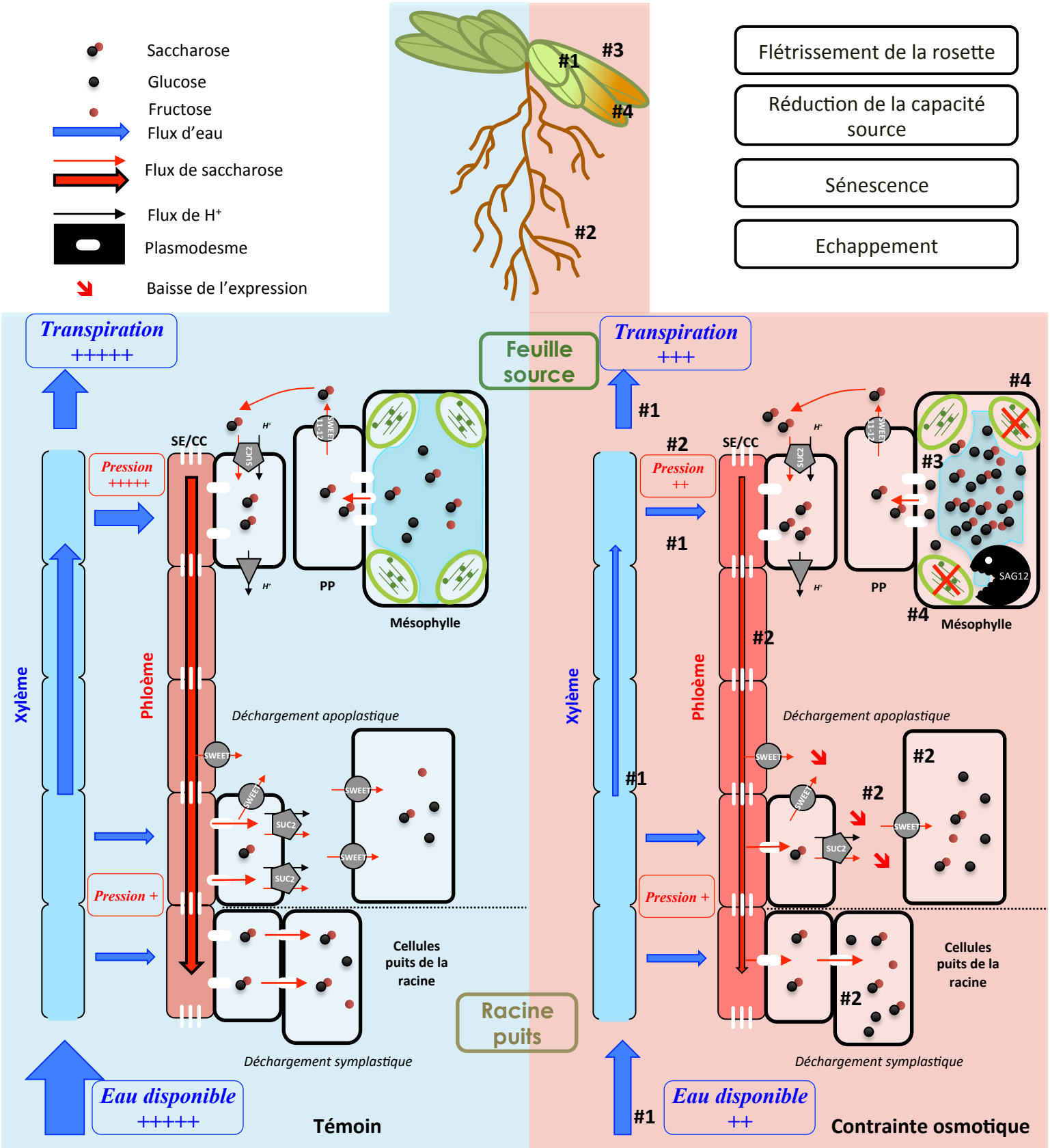


Figure 26 *Modèle hypothétique relatif à l'allocation du carbone en réponse à la contrainte osmotique appliquée*. **#1**, La contrainte osmotique génère une réduction de la disponibilité en eau sur les plantes dont la rosette est déjà bien développée, empêchant un contrôle efficace des pertes en eau, ce qui aboutit aux flétrissement des parties aériennes. **#2**, La capacité exportatrice des feuilles source est réduite, probablement en partie *via* la baisse de la pression de turgescence relative au flétrissement des parties aériennes. La réduction de l'export de saccharose vers la racine serait alors reliée à la réduction de l'expression des gènes *AtSWEETs* étudiés (excepté *AtSWEET14*) ainsi que d'*AtSUC2*, transporteurs que nous supposons potentiellement impliqués dans le l'allocation des sucres dans la racine. Les sucres s'accumulent dans la racine probablement car l'apport est supérieur à la demande. **#3**, En raison de la réduction de l'export de saccharose vers la racine, les sucres sont accumulés dans les feuilles. **#4**, L'accumulation des sucres a alors pu favoriser la mise en place des mécanismes de sénescence comme le suppose la forte expression du gène *AtSAG12*, codant une cystéine protéase impliquée dans l'hydrolyse des protéines du stroma lors du démantèlement des chlorophylles.

Toutefois, s'il apparaît que la contrainte hydrique ralentit le développement des plantes, il convient de noter que la forte augmentation du R/S observée à l'issue de la contrainte hydrique, n'est pas la conséquence d'un effet allométrique. En effet, à surface foliaire quasiment équivalente, les plantes soumises au manque d'eau âgées de 49 jours présentent toujours un système racinaire plus développé que les plantes bien arrosées alors âgées de 20 jours (**Annexe VI**).

Finalement, la contrainte hydrique appliquée aurait tendance, contrairement à la contrainte osmotique, à provoquer le ralentissement du vieillissement de la plante, révélant deux stratégies totalement distinctes. Les plantes assujetties à la carence hydrique auraient une stratégie consistant à s'acclimater à la contrainte en allongeant la durée de leur cycle de développement, ce qui leur permettrait d'accumuler de la biomasse pouvant être investie dans les graines ultérieurement (Metcalf and Mitchell-Olds, 2009).

3.2.2 Deux stratégies différentes pour deux réponses racinaires différentes

La contrainte hydrique génère une allocation des sucres vers la racine, toutefois ce phénomène n'est pas noté en réponse à la contrainte osmotique. Ceci est susceptible de générer une réponse racinaire différente, et plus particulièrement au niveau de l'expression des transporteurs de saccharose. En effet, l'ACP relative à l'expression des transporteurs de saccharose dans la racine permet de discriminer l'effet des deux contraintes, chacune générant des déplacements opposés dans le plan de l'ACP (**Figue 25).** On notera toutefois un effet commun à ces deux contraintes, à savoir la forte répression d'*AtSUC1* (**Figure 19 et 21)**. Une telle inhibition est conforme avec la réduction du développement racinaire observée dans les deux cas et par conséquent de la réduction du nombre de zones de la racine en croissance. *AtSUC1* est en effet exclusivement exprimé dans les zones de la racine en croissance, et nous avons par conséquent supposé un hypothétique rôle pour ce transporteur dans la croissance racinaire (voir **Chapitre VI**).

En revanche, la régulation de l'expression des autres transporteurs de sucres semble être diamétralement opposée en réponse à chacune des contraintes à l'exception près d'*AtSUC3* et d'*AtSWEET14*. En effet, la majorité des gènes de transporteurs de saccharose dont l'expression est nettement induite dans la racine en réponse à la contrainte hydrique, c'est-à-dire *AtSUC2, AtSUC4 AtSWEET11*, *AtSWEET12*, *AtSWEET13* et *AtSWEET15*, voit leur expression réduite dans la racine soumise à la contrainte osmotique (**Figure 19 et 21)**. Ceci est probablement la conséquence de deux réponses différentes et probablement opposées au

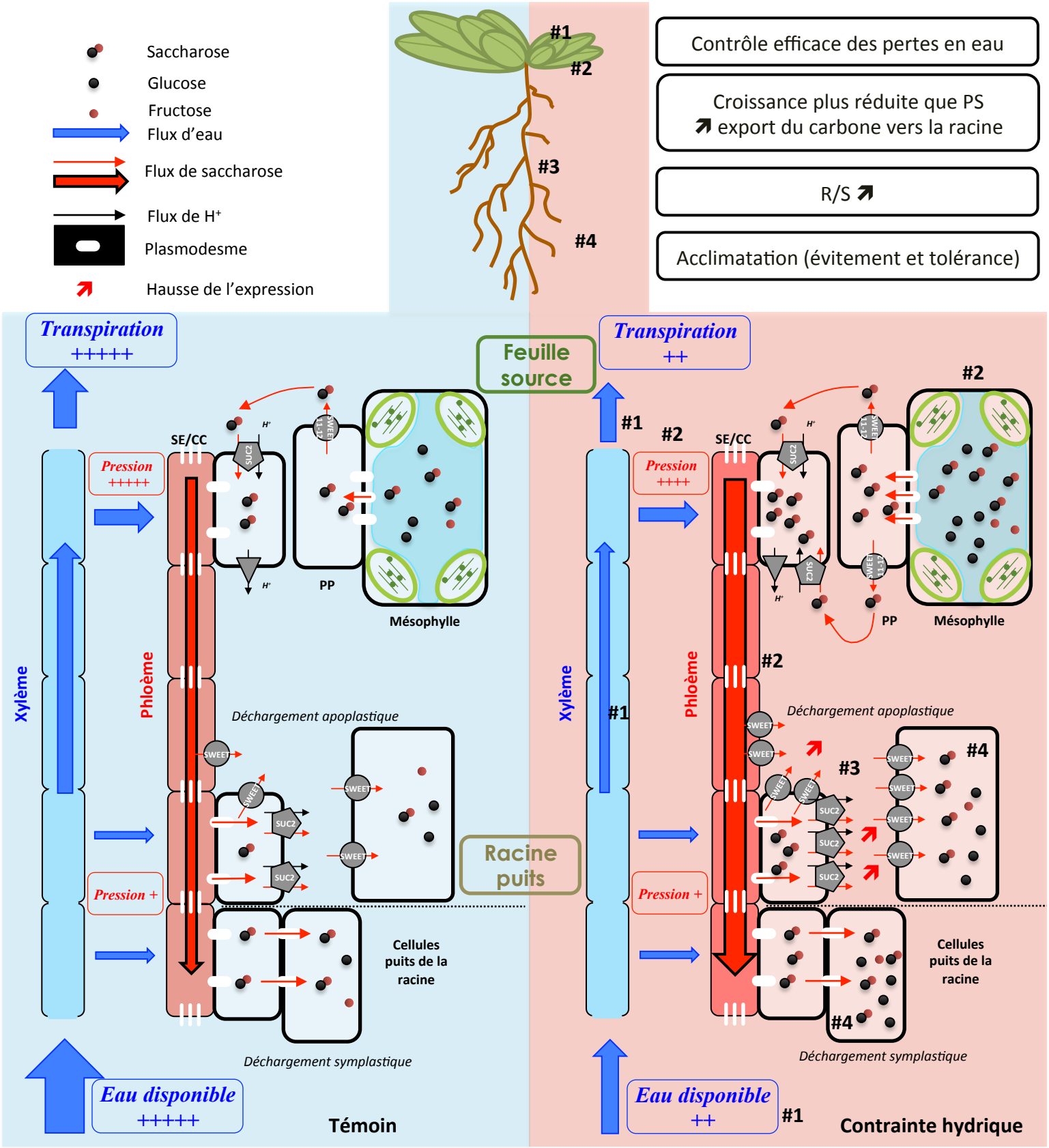


Figure 27 *Modèle hypothétique relatif à l'allocation du carbone en réponse à la contrainte hydrique appliquée*. **#1**, La contrainte hydrique appliquée dès la germination génère une réduction de la disponibilité en eau conduisant à une forte réduction de la croissance des parties aériennes ce qui aboutit à un contrôle efficace des pertes en eau (pas de flétrissement). **#2**, La croissance foliaire est plus fortement réduite que la photosynthèse, entraînant une accumulation de sucres dans les parties aériennes. La hausse d'expression des gènes *AtSUC2*, *AtSWEET11* et *AtSWEET12* laisse suggérer que le chargement des sucres, alors plus disponibles à l'export, dans le phloème est favorisée, expliquant ainsi la hausse de l'export de carbone vers la racine. De plus, la concentration des sucres dans le phloème facilite probablement l'efflux d'eau dans le xylème et par conséquent le transit de la sève phloémienne. **#3**, La hausse de l'expression dans la racine des transporteurs *AtSWEETs* étudiés ainsi que d'*AtSUC2* est probablement reliée à l'augmentation de l'export de carbone vers la racine, la présence de ces transporteurs aidant potentiellement à drainer le flux de carbone dans la racine, ce qui permettrait de maintenir le transport de la sève phloémienne. **#4**, Probablement parce que l'investissement en carbone dans la racine est supérieur à la demande, le carbone dont les sucres s'y accumulent.

niveau racinaire. Nous avons en effet montré que la contrainte hydrique favorisait l'export de carbone vers la racine alors que c'est la réponse inverse qui est observée en réponse à la contrainte osmotique.

Nous avons supposé que la hausse de l'expression dans la racine des transporteurs cités précédemment pouvait potentiellement aider au drainage du flux de carbone, alors augmenté, depuis la rosette vers la racine lors de la contrainte hydrique (**Chapitre IV**). La contrainte hydrique stimule l'export de carbone vers la racine ce qui se traduit vraisemblablement par une augmentation de la quantité de sucres allouée quotidiennement par unité de masse de racine. De ce fait, nous pensons que la dynamique du flux de sucres régule l'expression des transporteurs de saccharose, et non directement les teneurs en sucres qui augmentent dans la racine quelque soit la contrainte. Cette hypothèse apparaît vraisemblable puisque le phénomène inverse est observé dans la racine où l'apport de carbone est réduit. Il y a ainsi de fortes présomptions quant à l'implication de certains transporteurs de saccharose dans l'établissement des relations source-puits pour le carbone étant donné que leur régulation (+ ou -) est cohérente avec les variations (+ ou -) du flux de carbone dans la racine.

En résumé, alors que la contrainte hydrique aboutit à la hausse de la capacité exportatrice de la rosette, la contrainte osmotique appliquée aurait tendance à réduire la capacité exportatrice de cette dernière. Dans un tel contexte, on comprend pourquoi chacune des deux contraintes génère des réponses opposées quant à l'expression des transporteurs de saccharose potentiellement impliqués dans l'allocation des sucres dans la racine. Afin d'avoir une vision d'ensemble de chacune des contraintes étudiés, nous avons intégré les effets de la contrainte osmotique (**Figure 26**) et de la contrainte hydrique (**Figure 27**) dans des modèles intégratifs hypothétiques.

Bilan

Chacune des contraintes appliquées au cours des différentes expérimentations aboutit à une réduction de la disponibilité en eau. Toutefois, en raison du mode d'application de chacune des contraintes, le stress alors généré n'est pas de la même ampleur.

C'est vraisemblablement l'ampleur du stress généré au niveau de la rosette qui discrimine les deux contraintes conduisant à deux stratégies bien différentes. Le stress produit par la contrainte osmotique, probablement *via* son effet sur la turgescence des parties aériennes, empêche la réallocation du carbone vers la racine générant alors une importante accumulation de sucres dans la rosette. Cette importante accumulation de sucres est très probablement responsable de la mise en place des mécanismes de sénescence et du vieillissement accéléré associé. Par conséquent, les plantes soumises à la contrainte osmotique présentent une stratégie d'échappement.

Le stress généré par la contrainte hydrique réduit l'accumulation de biomasse. Toutefois, initialement en raison du découplage entre croissance et photosynthèse, la capacité exportatrice de la rosette est stimulée, aboutissant principalement à l'augmentation du ratio R/S. Comme cela a pu être noté lors de la contrainte osmotique, la carence hydrique génère aussi une augmentation des sucres solubles dans les feuilles et racines. Toutefois, cette accumulation semble maîtrisée ; elle est non seulement ici moins importante dans la rosette mais surtout d'ampleur équivalente dans la rosette et la racine. En conséquence, les teneurs sont certes plus importantes, mais le différentiel entre les teneurs est conservé suggérant le maintien d'un certain « équilibre » entre les deux compartiments à l'issue de la contrainte hydrique. Enfin et à l'opposé de la contrainte osmotique, la contrainte hydrique appliquée aboutit à un retard de sénescence vraisemblablement pour allonger son cycle de développement et assurer l'accumulation de biomasse nécessaire à la production des graines.

L'investissement en carbone dans la racine n'est pas privilégié en réponse la contrainte osmotique appliquée alors que la réponse inverse est observée en réponse à la contrainte hydrique. De ce fait, la dichotomie des réponses observées quant à l'investissement en carbone dans la racine à chacune des deux contraintes conduit à une régulation différentielle et opposée de l'expression des principaux transporteurs de saccharose potentiellement impliqués dans le drainage du flux de carbone dans la racine (*AtSUC2*, *AtSWEET11-15*).

VI. Chapitre « *AtSUC1* »

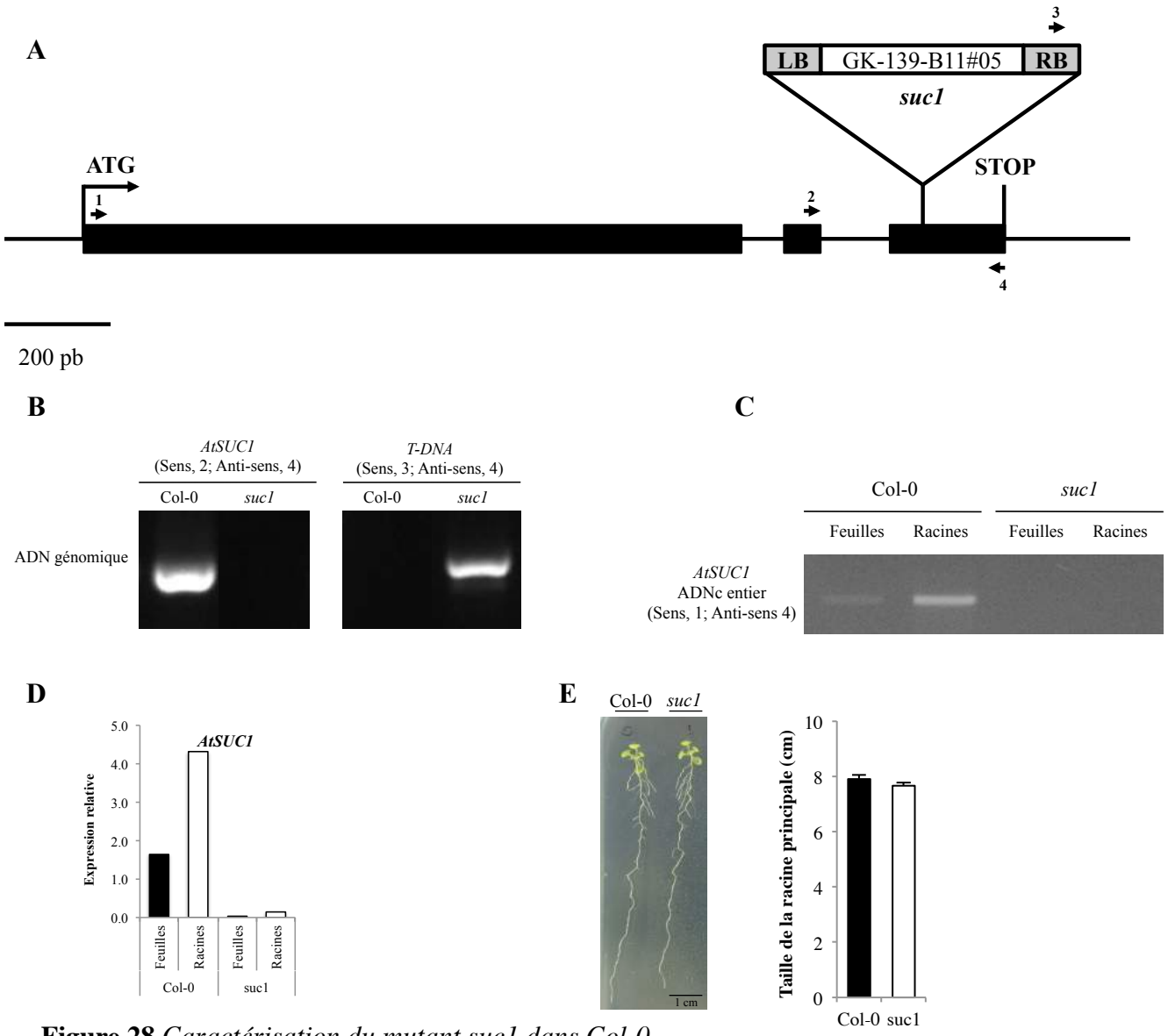


Figure 28 *Caractérisation du mutant suc1 dans Col-0.*
A, Représentation schématique de la structure du gène *AtSUC1* et du site d'insertion du T-DNA. Les flèches numérotées indiquent les zones de fixation des amorces utilisées et la direction indique le sens. **B**, Amplification par PCR de fragments spécifiques à *AtSUC1* et au *T-DNA* à partir d'ADN génomique de Col-0 et *suc1*. Les amplicons ont été visualisés en électrophorèse sur gel d'agarose 2%. **C**, Amplification par RT-PCR du gène *AtSUC1* pleine longueur à partir des ARN extraits des feuilles et racines de Col-0 et *suc1*. Les ADNc ont été synthétisés à partir de 1 μg d'ARN extraits de plantes âgées de 30 jours cultivées en rhizobox. Les amplicons ont été visualisés en électrophorèse sur gel d'agarose 1%. **D**, Niveaux d'expression du gène *AtSUC1* dans les feuilles et racines de Col-0 et *suc1* cultivés en rhizobox. L'expression relative du gène *AtSUC1* a été évaluée par qPCR. Les expressions relatives ont été normalisées par rapport au gène de référence *At5g12240* (Czechowski *et al*., 2005). Les données présentées correspondent à une expérimentation. **E**, Caractérisation phénotypique du mutant *suc1*, développement et mesure de la taille de la racine principale. La photographie et les mesures ont été réalisées sur des plantules âgées de 12 jours cultivées sur MS½ supplémenté de 0,5% de saccharose. La taille de la racine principale a été mesurée sur 14 (Col-0) et 16 plantes (*suc1*).

Résultats

1 Etude du mutant suc1 (GK-139B11-#05)

Les expérimentations « Stress osmotique » (**Chapitre III**) et « Carence hydrique en rhizobox » (**Chapitre IV**) ont toutes les deux permis de noter une répression de l'expression du gène *AtSUC1* dans la racine d'*A. thaliana* à l'issue de la contrainte. Cette répression semble, dans le cas de la contrainte osmotique, être spécifique de la réponse à la contrainte appliquée étant donné que la répression de l'expression d'*AtSUC1* disparaît pendant la phase de réhydratation.

Par conséquent, des études ont été menées sur le mutant *suc1* (GK-139-B11#05) (Kleinboelting *et al.*, 2011) qu'il a tout d'abord fallu cribler pour obtenir une lignée homozygote pour le T-DNA (**Figure 28**). Le mutant *suc1* présente une insertion du T-DNA dans le 3ème et dernier exon (**Figure 28A**). Après avoir isolé une lignée homozygote (**Figure 28B**), le niveau d'expression du gène *AtSUC1* a été contrôlé par RT-PCR (**Figure 28C**) et RT-qPCR (**Figure 28D**) dans les feuilles et racines de plantes Col-0 et *suc1* âgées de 30 jours cultivées en rhizobox. Après migration sur gel d'électrophorèse 1%, un amplicon correspondant à la taille de l'ADNc pleine longueur d'*AtSUC1* est visualisé pour les pistes correspondant aux feuilles et racines de Col-0 (**Figure 28C**). De plus, le niveau de transcrits est bien plus important pour les racines que pour les feuilles. Concernant *suc1*, conformément à ce qui pouvait être attendu quant à lignée homozygote pour le T-DNA, aucun amplicon correspondant à *AtSUC1* pleine longueur n'est visualisé sur le gel au niveau des pistes correspondant aux feuilles et aux racines, confirmant la l'absence de transcription d'*AtSUC1*. Ce résultat est aussi confirmé par RT-qPCR (**Figure 28D**). En effet l'expression est divisée par 121 dans les feuilles (Col-0, $2^{-\Delta Ct}$ = 1,659 ; *suc1*, $2^{-\Delta Ct}$ = 0,014) et 29 dans les racines (Col-0, $2^{-\Delta Ct}$ = 4,317; *suc1*, $2^{-\Delta Ct}$ = 0,144) de *suc1* par rapport à Col-0. De plus, une recherche de l'ADNc pleine longueur correspondant à *AtSUC1* a été effectuée à partir des ADNc des feuilles et des racines du mutant *suc1* avec un temps d'élongation de 10 minutes afin de détecter la présence ou non d'un ADNc comprenant le T-DNA. Aucun amplicon n'a été détecté, confirmant l'absence d'ADNc muté d'*AtSUC1*.

Etant donné qu'*AtSUC1* est particulièrement exprimé dans la racine, l'étude phénotypique du mutant *suc1* a été menée en premier lieu afin d'étudier le développement de la racine. Cette étude phénotypique concernant le mutant *suc1* n'a révélé aucune différence en

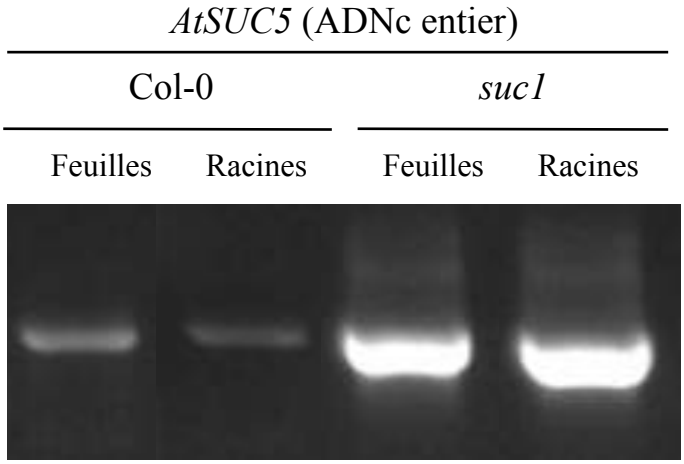


Figure 29 *Profil d'expression du gène AtSUC5 (ADNc entier) dans les racines et les feuilles de plantules de Col-0 et du mutant suc1 cultivées sur milieu MS ½ supplémenté de 3% de saccharose*.

Les ADNc ont été synthétisés à partir de 1 μg d'ARN extraits de plantules âgées de 16 jours cultivées en jour long (16h) sur milieu MS½ supplémenté de 3% de saccharose. L'expression de *AtSUC5* a été évaluée par PCR en amplifiant l'ADNc de taille entière. Les amplicons ont été visualisés en électrophorèse sur gel d'agarose 1%.

terme de croissance racinaire avec le type sauvage Col-0 (Col-0, 7,9 cm ; *suc1*, 7,7 cm) lorsqu'ils ont été cultivés sur milieu MS ½ supplémenté de 0,5% de saccharose (**Figure 28E**). La même tendance a été observée sur des plantes adultes cultivées en hydroponie. Cette observation nous a semblé surprenante étant donné que *AtSUC1* est le gène de type SUC le plus exprimé dans la racine de Col-0 et ce, quel que soit le stade développement (**Chapitre III, expérimentation « Développement »**) ou encore le système de culture (rhizobox, système d'hydroponie) (**Chapitres III et IV**). Pour en savoir plus concernant cette absence de phénotype, nous avons étudié l'expression des autres transporteurs de type SUC dans les racines du mutant *suc1*.

Ces premières investigations ont tout d'abord été menées sur des plantules d'*A. thaliana* âgées de 16 jours cultivées en boîte de Pétri sur milieu MS ½ supplémenté de saccharose 3%. L'apport de 3% de saccharose permet d'obtenir de grandes quantités de matériel en peu de temps, et plus particulièrement de racines. L'étude de l'expression menée par RT-PCR sur l'ensemble des gènes *SUC* (amorces qPCR) a révélé que seul *AtSUC5* semblait être différentiellement exprimé dans les feuilles et racines du mutant *suc1* comparé à Col-0. Nous avons vérifié cette observation en étudiant l'expression de l'ADNc pleine longueur du gène *AtSUC5* dans les feuilles et racines de plantules du mutant *suc1* et de Col-0 âgées de 16 jours cultivées sur milieu MS ½ supplémenté de 3 % de saccharose (**Figure 29**). Après migration sur gel d'électrophorèse 1%, un amplicon correspondant à la taille de l'ADNc pleine longueur d'*AtSUC5* est visualisé sur toutes les pistes correspondant aux feuilles et racines de Col-0 et *suc1*. Cependant l'intensité de la bande visualisée est beaucoup plus importante au niveau des pistes correspondant à *suc1* par rapport à celles correspondant à Col-0 et ce indépendamment de l'organe considéré, suggérant une plus forte expression d'*AtSUC5* chez le mutant *suc1* (**Figure 29**).

L'induction de l'expression d'*AtSUC5* dans le mutant *suc1* a premièrement été observée sur des plantes cultivées avec une concentration importante en saccharose (3%). Par conséquent, le mutant *suc1* a ensuite aussi été cultivé sur milieu sans saccharose et sur milieu supplémenté de saccharose 0,5% afin de définir si l'induction d'*AtSUC5* dans le mutant *suc1* est dépendante du saccharose. Le niveau d'expression d'*AtSUC5* a par la suite été mesuré par RT-qPCR (**Figure 30**) dans les racines de plantules Col-0 et *suc1* âgées de 16 jours. Dans les racines de Col-0, l'expression d'*AtSUC5* est maximale sur milieu supplémenté de saccharose 0,5% ($2^{-\Delta Ct}$ = 0,046) alors qu'elle est plus faible sur milieu sans saccharose ($2^{-\Delta Ct}$ = 0,003) et milieu supplémenté de 3% de saccharose ($2^{-\Delta Ct}$ = 0,001) (**Figure 30**). De même, l'expression

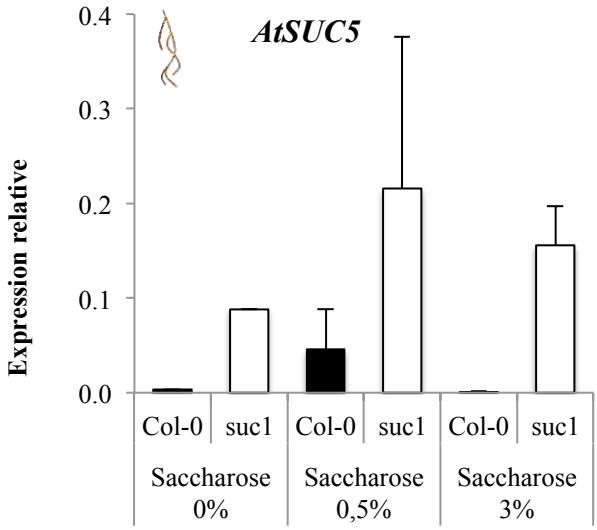


Figure 30 *Niveaux d'expression du gène AtSUC5 dans les racines de plantules de Col-0 et du mutant suc1 cultivées sur milieu MS ½ supplémenté de diverses concentrations en saccharose*.
Les ADNc ont été synthétisés à partir de 1 μg d'ARN extraits de plantules âgées de 16 jours cultivées en jour long (16h) sur milieu MS½ supplémenté de 0%, 0,5% ou 3% de saccharose. L'expression relative d'*AtSUC5* a été évaluée par qPCR. Les expressions relatives ont été normalisées par rapport au gène de référence *At5g12240* (Czechowski *et al*., 2005) et correspondent à la moyenne (± ES) de 1 expérimentation (Saccharose 0%), 2 expérimentations (Saccharose 0,5%) et 4 expérimentations (Saccharose 3%) indépendantes.

d'*AtSUC5* dans les racines du mutant *suc1* est aussi maximale sur milieu supplémenté de 0,5% de saccharose ($2^{-\Delta Ct}$ = 0,216). Cependant, les niveaux d'expression d'*AtSUC5* dans les racines du mutant *suc1* reste dans le même ordre de grandeur sur milieu sans saccharose ($2^{-\Delta Ct}$ = 0,088) et milieu supplémenté de 0,5% de saccharose ($2^{-\Delta Ct}$ = 0,156). Par conséquent, indépendamment de la concentration en saccharose du milieu, le niveau d'expression d'*AtSUC5* dans les racines de *suc1* est toujours supérieur à celui des racines de Col-0 (**Figure 30**). Néanmoins, il faut noter que l'expression d'*AtSUC5* dans le mutant *suc1* n'atteint pas le niveau d'expression d'*AtSUC1* dans Col-0.

Dans un second temps, le niveau d'expression d'*AtSUC5* a été évalué sur des plantes cultivées en rhizobox. L'expression d'*AtSUC5* a été déterminée par RT-PCR et RT-qPCR dans les feuilles et les racines de plantes Col-0 et *suc1* âgées de 30 jours cultivées en rhizobox. Après migration sur gel d'électrophorèse 1%, un amplicon correspondant à la taille de l'ADNc pleine longueur d'*AtSUC5* est visualisé sur toutes les pistes correspondant aux feuilles et racines de Col-0 et *suc1*, soulignant qu'*AtSUC5* est exprimé dans les feuilles et racines de Col-0 et *suc1*. Cependant l'intensité est beaucoup plus importante au niveau des pistes correspondant à *suc1* par rapport à celles correspondant à Col-0, démontrant qu'*AtSUC5* est plus exprimé chez le mutant *suc1* que chez Col-0 (**Figure 31**), tout comme en culture *in vitro*. Ce résultat a aussi été confirmé par RT-qPCR (**Figure 32**). En effet l'expression d'*AtSUC5* est multipliée par 2 dans les feuilles (Col-0, $2^{-\Delta Ct}$ = 0 ,052 ; *suc1*, $2^{-\Delta Ct}$ = 0,100) et 8 dans les racines (Col-0, $2^{-\Delta Ct}$ = 0,015; *suc1*, $2^{-\Delta Ct}$ = 0,122) de *suc1* par rapport à Col-0 (**Figure 32**).

Pour aller plus loin concernant la régulation d'*AtSUC5* dans le mutant *suc1,* une expérience de carence hydrique a été menée sur des plantes Col-0 et *suc1* en rhizobox. L'analyse de l'architecture racinaire n'a pas pu être effectuée sur ces plantes, cependant l'observation quotidienne des systèmes racinaires n'a révélé aucune différence au niveau du développement et de l'architecture. De même, le développement de la rosette ne présentait pas de différence phénotypique notable entre Col-0 et *suc1* que ce soit en condition « Tm » ou en condition « St » à l'issue des 30 jours de culture en rhizobox (**Figure 33**). L'expression d'*AtSUC5* a ensuite été mesurée par RT-PCR et RT-qPCR dans les racines des plantes Col-0 et *suc1* âgées de 30 jours cultivées en régime hydrique classique (« Tm ») ou restreint (« St »). Après migration sur gel d'électrophorèse 1%, la bande d'intensité la plus importante correspondant à la taille de l'ADNc pleine longueur d'*AtSUC5* est visualisée sur la piste correspondant à la racine « Tm » de *suc1* soulignant qu'*AtSUC5* est ici le plus exprimé. Sur la

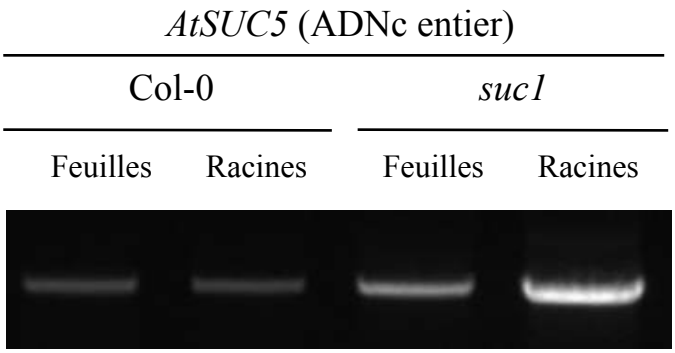


Figure 31 *Profil d'expression du gène AtSUC5 (ADNc entier) dans les feuilles et racines de Col-0 et suc1 cultivés en rhizobox*.
Les ADNc ont été synthétisés à partir de 1 μg d'ARN extraits de plantes âgées de 30 jours cultivées en rhizobox. L'expression d'*AtSUC5* a été évaluée par PCR en amplifiant les ADNc pleine longueur. Les amplicons ont été visualisés en électrophorèse sur gel d'agarose 1%.

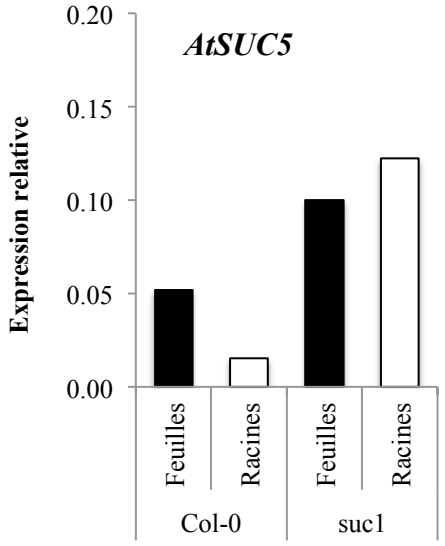


Figure 32 *Niveaux d'expression du gène AtSUC5 dans les feuilles et racines de Col-0 et suc1 cultivés en rhizobox*.
Les ADNc ont été synthétisés à partir de 1 μg d'ARN extraits de plantes âgées de 30 jours cultivées en rhizobox. L'expression relative du gène *AtSUC5* a été évaluée par qPCR. Les expressions relatives ont été normalisées par rapport au gène de référence *At5g12240* (Czechowski *et al*., 2005). Les données présentées correspondent à une expérimentation.

piste correspondant à la racine « Tm » de Col-0, cette même bande est aussi observée, cependant son intensité est moindre part rapport à celle associée à la racine « Tm » de *suc1*, indiquant qu'il y est bien moins exprimé. En revanche la bande correspondant à l'ADNc pleine longueur d'*AtSUC5* n'est presque pas visible ni dans la racine « St » de Col-0 et ni dans la racine « St » de *suc1* (**Figure 34A**), démontrant qu'*AtSUC5* n'est quasiment pas exprimé en condition « St » dans les deux génotypes. Ce résultat a aussi été confirmé par RT-qPCR (**Figure 34B**). En effet l'expression d'*AtSUC5* a respectivement été divisée par 2,7 et 5 dans les racines de Col-0 (« Tm », $2^{-\Delta Ct}$ = 0,031; « St », $2^{-\Delta Ct}$ 0.011) et *suc1* (« Tm », $2^{-\Delta Ct}$ = 0,113; « St », $2^{-\Delta Ct}$ 0,022) en réponse à la carence hydrique.

2 Etude la localisation de l'expression d'At*SUC1* dans la racine

Afin de mieux comprendre la répression d'*AtSUC1* dans la racine d'*A. thaliana* en réponse au stress osmotique et à la carence hydrique, il est nécessaire de connaître la localisation de l'expression d'*AtSUC1* dans la racine d'*A. thaliana*. De part la complexité de l'étude du système racinaire d'*A. thaliana*, la localisation de l'expression d'*AtSUC1* n'a jusqu'à présent été déterminée dans la racine qu'à des stades précoces de développement (plantules en boîte de Pétri). En revanche, la rhizobox développée au laboratoire nous offre la possibilité d'observer et de récolter intégralement des systèmes racinaires de plantes dont le développement est avancé (rosette presque pleinement développée). Ainsi, à l'aide de lignées exprimant le gène rapporteur *GUS* sous le contrôle du gène *AtSUC1* (Sivitz *et al.*, 2007), la localisation de l'expression d'*AtSUC1* a été déterminée dans les racines de plantes SUC1-GUS âgées de 30 jours cultivées en rhizobox en régime hydrique classique (« Tm ») (**Figure 35**) ou en carence hydrique (« St ») (**Figure 36**). Les plantes « GUS » ici utilisées, expriment le gène *AtSUC1* dans son intégralité (introns + exons) sous le contrôle du promoteur d'*AtSUC1*, étant donné que l'expression d'*AtSUC1* dans la racine est dépendante de la présence de séquences intragéniques (Sivitz *et al.*, 2007). Les graines de ces plantes nous ont généreusement été données par John Ward de l'université du Minnesota (Sivitz *et al.*, 2008).

En régime hydrique classique, le marquage GUS est à la fois retrouvé dans les racines présentes à proximité de la surface du sol mais aussi dans celles localisées plus en profondeur (**Figure 35A**). Au niveau du sol peu profond (5-6 cm de profondeur), le marquage est essentiellement retrouvé au niveau des pointes racinaires. Dans cette zone, il est intéressant de noter qu'en dehors des pointes racinaires et des primordia racinaires nouvellement développés, aucune autre zone marquage n'est visualisée au niveau des racines latérales et de

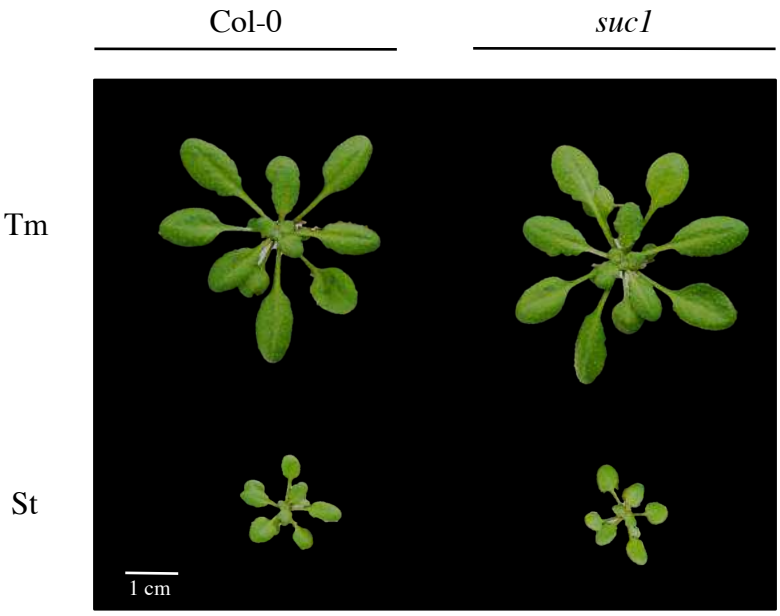


Figure 33 *Photographie des rosettes des plantes Col-0 et suc1 âgées de 30 jours cultivées en rhizobox en régime hydrique classique (Tm) ou restreint (St).*

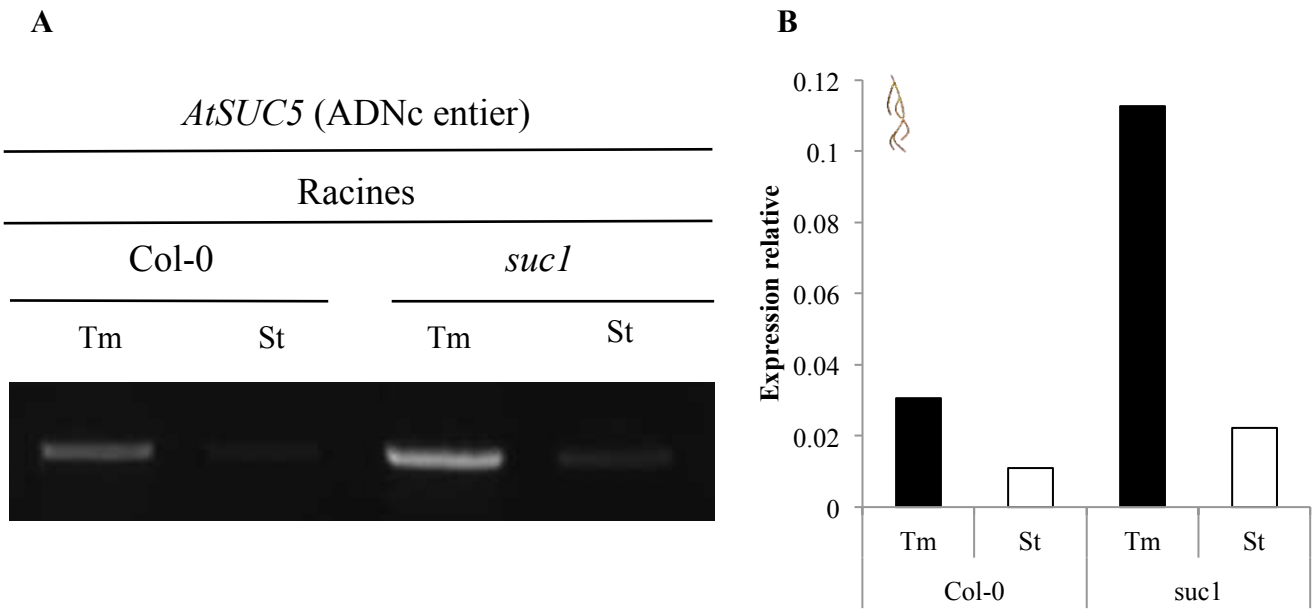


Figure 34 *Impact de la carence hydrique sur le profil et le niveau d'expression du gène AtSUC5 dans les racines des plantes Col-0 et suc1 cultivées en rhizobox.*
Les ADNc ont été synthétisés à partir de 1 μg d'ARN extraits de plantes âgées de 30 jours cultivées en rhizobox en régime hydrique classique et restreint. L'expression d'*AtSUC5* a été évaluée par PCR en amplifiant les ADNc de taille entière. Les amplicons ont été visualisés en électrophorèse sur gel d'agarose 1% (**A**). L'expression relative du gène *AtSUC5* a ensuite été évaluée par qPCR (**B**). Les expressions relatives ont été normalisées par rapport au gène de référence *At5g12240* (Czechowski *et al.*, 2005). Les données présentées correspondent à une expérimentation.

la racine principale (**Figure 35B**). En profondeur (> 6 cm), le marquage GUS localisé au niveau des pointes racinaires est plus facilement visualisable du fait du nombre important de ces dernières dans cette zone (**Figure 35A et C**). En plus des pointes racinaires, les primordia nouvellement développés sont aussi marqués (**Figure 35D**) alors que la racine primaire et les racines latérales ne le sont pas, comme dans la zone en surface. De manière plus précise, le marquage GUS est retrouvé au niveau des zones de transition et d'élongation de la racine (**Figure 35E**). Le marquage est d'ailleurs plus intense à proximité de la zone méristématique, cependant cette dernière n'est pas marquée, de même que la coiffe (**Figure 35E**). Les mesures réalisées indiquent le marquage est en moyenne retrouvé à environ 290 µm de l'extrémité des pointes racinaires (**Figure 37**).

En régime hydrique restreint, le système racinaire des plantes SUC1-GUS est clairement moins développé que son homologue cultivé en régime hydrique classique. De ce fait le marquage GUS, néanmoins présent, est plus difficile à percevoir, étant donné qu'il est, là aussi, localisé au niveau des pointes racinaires, celles-ci étant moins nombreuses que les racines développées en régime hydrique classique (**Figure 36A**). A proximité de la surface du sol, le marquage GUS est limité à quelques pointes racinaires et primordia alors que la racine principale et les rares racines latérales présentes ne sont pas marquées (**Figure 36B**). De plus la zone de marquage GUS des pointes racinaires semble plus restreinte chez les plantes « St » (**Figure 36B et C**) par rapport aux plantes « Tm » (**Figure 35B et C**) alors que les racines « Tm » et « St » ont subi le même traitement pour révéler le marquage GUS (**Figure 36B et C**). La majorité du marquage GUS observé est limitée à quelques racines latérales localisées plus en profondeur (**Figure 36A et D**). Enfin tout comme en régime hydrique classique, le marquage reste limité aux zones de transition et d'élongation alors que la zone méristématique et la coiffe et ne sont pas marquées (**Figure 36E**). Dans le détail, le marquage est en retrouvé à environ 190 µm de l'extrémité des pointes racinaires (**Figure 37**), soit une réduction de 35% par rapport à la condition « Tm ».

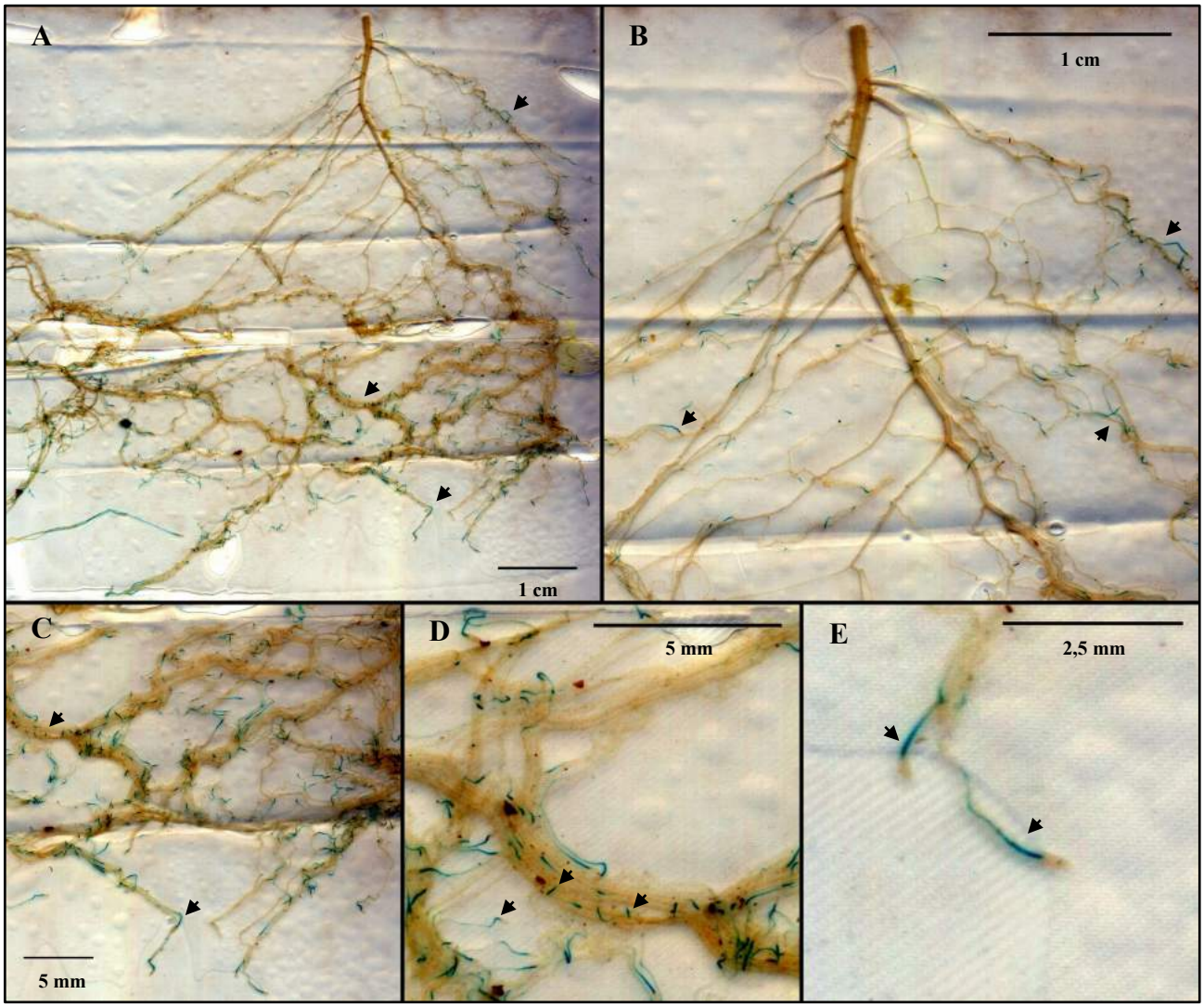


Figure 35 *Localisation de l'expression d'AtSUC1 dans la racine de plantes âgées de 30 jours, cultivées en rhizobox avec un régime hydrique classique*.
La localisation a été déterminée en utilisant des plantes *pAtSUC1::SUC1::GUS*, exprimant le gène GUS sous le contrôle du gène *AtSUC1* entier (Sivitz *et al*., 2007). Les flèches noires indiquent les zones d'expression du gène *AtSUC1*. **A**, Vue du système racinaire dans son intégralité. **B**, Grossissement de la partie supérieure de la racine principale. **C et D**, Grossissement des racines de la partie inférieure du système racinaire. **E**, Grossissement des pointes racinaires.

Discussion

L'étude de l'expression des transporteurs de sucres dans la racine au cours de l'expérimentation « Développement » a mis en évidence qu'*AtSUC1* était le gène le plus le exprimé parmi les transporteurs *SUC* exprimés dans la racine (non stressée en hydroponie) d'*A. thaliana*, et ce quelque soit le stade de développement. Ce même profil a été observé dans la racine (non stressée) d'*A. thaliana* âgées de 30 jours cultivées en rhizobox. Néanmoins, l'expression d'*AtSUC1* est sévèrement réprimée dans la racine que ce soit en réponse à la contrainte osmotique (**Chapitre III**) ou à la carence hydrique (**Chapitre IV**), deux contraintes modifiant considérablement la physiologie de la racine au niveau de la croissance, du métabolisme et des relation-source puits (**Chapitre III et IV**). A partir de cette observation, l'étude de la fonction et de la localisation racinaire d'*AtSUC1* a été effectuée.

1 Caractérisation du mutant *suc1*

1.1 L'expression du gène *AtSUC5* est stimulée dans les racines du mutant *suc1*

Conformément à ce qui a été démontré par Sivitz *et al.* (2008), le mutant *suc1* ne présente aucun défaut de croissance racinaire au stade de développement étudié (**Figure 28E**). Jusqu'à maintenant, les seules modifications phénotypiques observées chez le mutant *suc1* sont la perte de fertilité des grains de pollen et l'absence d'accumulation d'anthocyanes en présence de fortes concentrations en saccharose (Sivitz *et al.*, 2008). Ainsi, en dépit du fort niveau d'expression d'*AtSUC1* dans la racine Col-0, aucune étude ne fait référence à l'évaluation de l'expression des autres transporteurs de type *SUC* dans la racine du mutant *suc1*. L'analyse de l'expression des 9 gènes *AtSUCs* a révélé que seul le gène *AtSUC5* était différentiellement exprimé, son expression étant induite par rapport à Col-0 dans les feuilles et racines de plantules du mutant *suc1* cultivées sur milieu MS ½ supplémenté de 3% de saccharose (**Figure 29**). Néanmoins, les sucres sont connus pour réguler l'expression des gènes de transporteurs de sucres (Chiou and Bush, 1998), c'est pourquoi l'analyse de l'expression d'*AtSUC5* a du être effectuée en absence et en présence de plusieurs concentrations en saccharose. Les résultats ont d'ailleurs montré que la surexpression d'*AtSUC5* dans les racines du mutant *suc1* était conservée en absence et en présence de saccharose (**Figure 30**), mettant en lumière un nouveau profil moléculaire pour le mutant *suc1*.

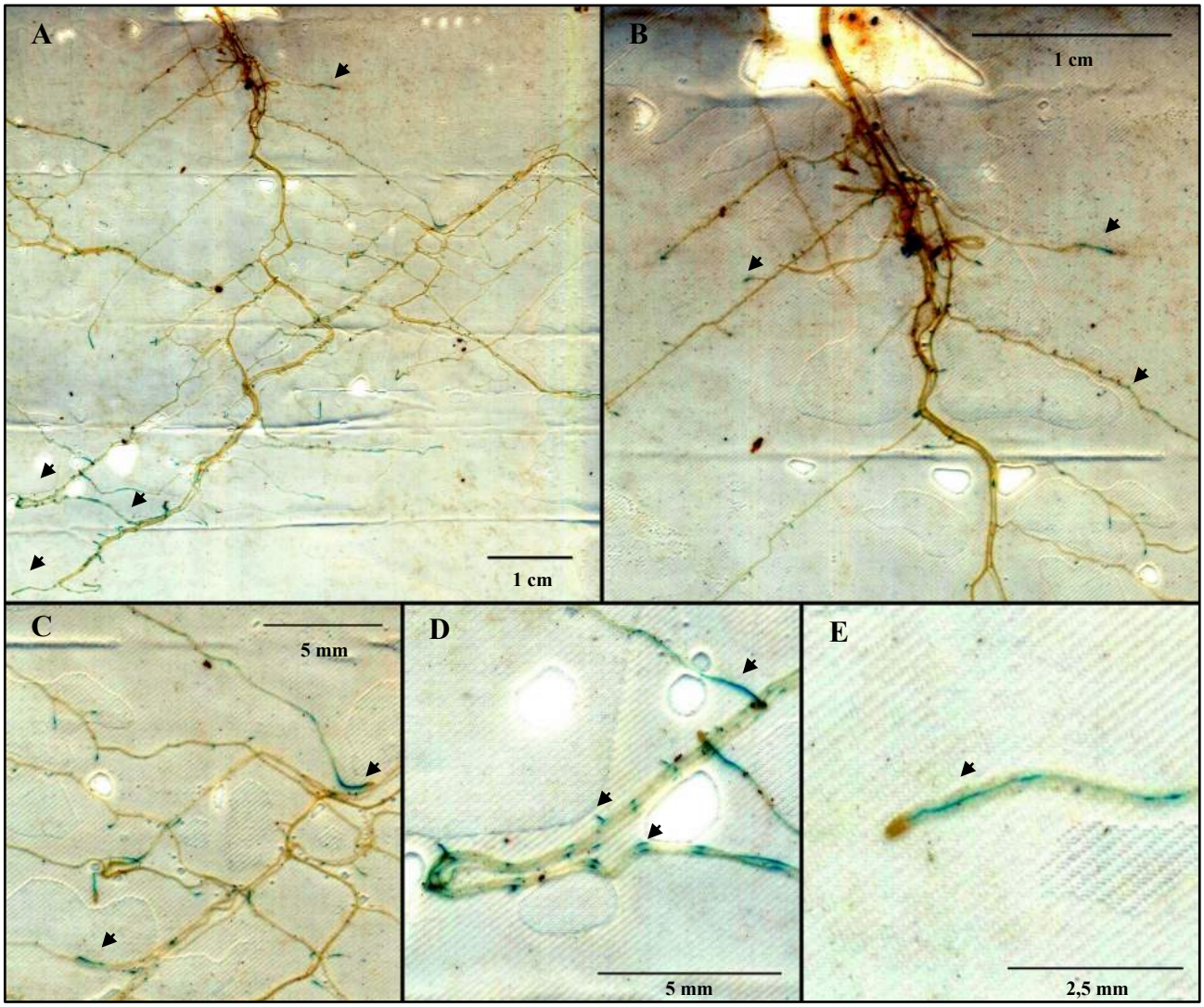


Figure 36 *Localisation de l'expression d'AtSUC1 dans la racine de plantes âgées de 30 jours cultivées en rhizobox en carence hydrique*.
La localisation a été déterminée en utilisant des plantes *pAtSUC1::SUC1::GUS*, exprimant le gène GUS sous le contrôle du gène *AtSUC1* entier (Sivitz *et al*., 2007). Les flèches noires indiquent les zones d'expression du gène *AtSUC1*. **A**, Vue du système racinaire dans son intégralité. **B**, Grossissement de la partie supérieure de la racine principale. **C et D**, Grossissement des racines de la partie inférieure du système racinaire. **E**, Grossissement des pointes racinaires.

1.2 Etude de l'expression d'*AtSUC5* dans les racines du mutant *suc1* : vers une régulation analogue à celle d'*AtSUC1* dans la racine de Col-0 ?

Le niveau maximum d'expression d'*AtSUC5* dans la racine est obtenu, non seulement pour *suc1* mais aussi pour Col-0, sur milieu supplémenté avec 0,5% de saccharose. Ceci laisse à penser que l'expression d'*AtSUC5* dans la racine est en partie gouvernée par la concentration en saccharose du milieu quelque soit le génotype même si l'expression d'*AtSUC5* est toujours plus importante dans les racines du mutant *suc1* (**Figure 30**). La faible expression d'*AtSUC5* dans les racines de Col-0 cultivées en absence de saccharose (**Figure 30**) conforte cette hypothèse et est en accord avec les données d'expression obtenues pour la racine de Col-0 cultivée en hydroponie et ce quelque soit le stade de développement (**Chapitre III**) (l'expression d'*AtSUC5* n'y étant jamais relevée). Enfin, l'expression du gène *AtSUC5* dans la racine *suc1* présente le même profil de régulation par le saccharose que ce qui a été montré avec *AtSUC1* dans la racine Col-0, à savoir une augmentation de son expression en présence de saccharose (Sivitz *et al.*, 2008).

L'un des objectifs de notre équipe est de travailler sur la racine d'*A. thaliana* cultivée dans les conditions les plus proches de celles en pot et dont le stade de développement est avancé. C'est pourquoi, l'analyse du mutant *suc1* a été effectuée par la suite sur des plantes âgées de 30 jours cultivées en rhizobox. Conformément à ce qui a été observé en culture *in vitro* (**Figure 28E**), le mutant *suc1* ne présente pas de différence avec Col-0 en terme de développement foliaire à l'issue de 30 jours de culture en rhizobox (**Figure 33**). Quant au développement racinaire, celui-ci n'a pu être évalué de manière quantitative même si l'observation quotidienne des systèmes racinaires n'a pas révélé de différence notable (croissance, développement) entre Col-0 et *suc1*. Ainsi l'absence de différence phénotypique entre le mutant *suc1* et Col-0 observée sur plantules cultivées en boîte de Pétri se confirme sur plantes adultes cultivées en rhizobox.

La surexpression d'*AtSUC5* mesurée dans les feuilles (**Figure 29**) et racines (**Figure 30**) du mutant *suc1* cultivé en boîte de Pétri est aussi retrouvée dans les feuilles et racines des plantes *suc1* âgées de 30 jours cultivée en rhizobox (**Figure 31 et 32**). Ainsi la stimulation de l'expression d'*AtSUC5* découverte initialement sur plantules *suc1* cultivées en boîte de Pétri n'est ni spécifique de l'âge de la plante, ni du système de culture utilisé. Néanmoins, si l'expression d'*AtSUC5* est presque nulle dans les racines de Col-0 cultivées sur milieu sans saccharose (**Figure 30**) et absente dans les racines de Col-0 cultivées en hydroponie

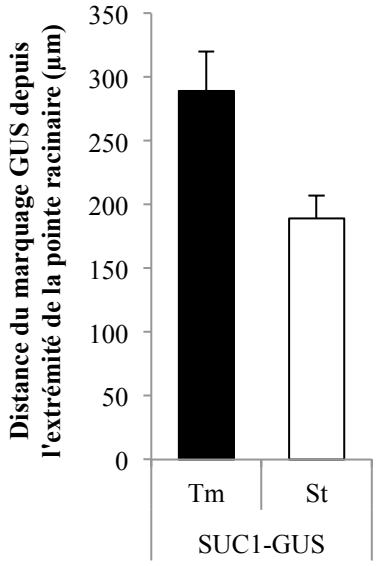


Figure 37 *Histogramme représentant la distance séparant l'extrémité de la pointe racinaire du début du marquage GUS observé dans les plantes SUC1-GUS âgées de 30 jours cultivées en rhizobox en régime hydrique classique ou restreint*.
La localisation a été déterminée en utilisant des plantes *pAtSUC1::SUC1::GUS*, exprimant le gène GUS sous le contrôle du gène *AtSUC1* entier (Sivitz *et al*., 2007). Les données présentées correspondent à la moyenne (± ES) de 12 mesures.

(**Chapitre III**), son expression est détectable dans les racines de Col-0 âgées de 30 jours cultivées en rhizobox (**Figure 31 et Chapitre IV**). Ainsi, le niveau d'expression d'*AtSUC5* dans la racine de Col-0 semble dépendant des conditions de culture appliquées, ce qui expliquerait pourquoi la présence de l'expression du gène *AtSUC5* n'ait jusqu'alors été décrite que dans la graine en formation d'*A. thaliana* (Baud *et al.*, 2005; Pommerrenig *et al.*, 2013) et non dans la racine.

Pour conclure cette étude, le mutant *suc1* a été cultivé, en parallèle de Col-0, en rhizobox en présence d'un régime hydrique classique (Tm) ou restreint (St). A l'issue de la période de carence hydrique le mutant *suc1* présentait un développement (feuilles, racines) comparable à Col-0, tout comme en condition « Tm » (**Figure 33**), soulignant ainsi que la seule mutation KO du gène *AtSUC1* ne semble pas suffisante pour altérer le développement de la plante quel que soit le régime hydrique appliqué. Par conséquent, nous avons supposé que l'absence de différence de développement racinaire entre Col-0 et *suc1*, quel que soit le régime hydrique, était due à la surexpression d'*AtSUC5* dans la racine même si l'expression d'*AtSUC5* dans *suc1* n'est pas aussi importante que l'expression d'*AtSUC1* dans Col-0. Cependant, l'expression d'*AtSUC5* est réprimée en réponse à la carence hydrique dans le mutant *suc1* de telle sorte que le niveau d'expression d'*AtSUC5* est approximativement le même dans les racines St de Col-0 et *suc1* (**Figure 34**). Curieusement, ce profil de régulation de l'expression d'*AtSUC5* rappelle la répression de l'expression d'*AtSUC1* dans la racine de Col-0 en réponse à la carence hydrique (**Chapitre IV**). Il semblerait donc que l'expression d'*AtSUC5* dans la racine *suc1* soit régulée de la même façon que celle d'*AtSUC1* dans la racine Col-0 lors de la carence hydrique, suggérant la présence d'éléments cis-régulateurs communs.

Ainsi, après analyse des différentes expériences menées sur *suc1* (différentes concentrations en saccharose, carence hydrique), il existerait une forte corrélation positive entre les variations d'expression d'*AtSUC5* observées chez le mutant *suc1* et celles d'*AtSUC1* observées chez Col-0, laissant supposer l'existence d'une éventuelle complémentation fonctionnelle chez le mutant *suc1*. Conformément à cette hypothèse, *AtSUC5* pourrait remplacer fonctionnellement *AtSUC1* dans le mutant *suc1*, et cette fonction serait particulièrement essentielle en condition « Tm » mais pas en « St » (**Figure 34**). De plus, cette fonction pourrait être nécessaire dans la racine de *suc1* en présence de saccharose dans le milieu extérieur (**Figure 30**), comme cela a été supposé pour la protéine AtSUC1 dans la racine de Col-0 (Sivitz *et al.*, 2008).

Une éventuelle complémentation fonctionnelle est tout à fait plausible étant donné que les gènes *AtSUC1* et *AtSUC5* sont tous les deux des transporteurs de saccharose de type I (Reinders *et al.*, 2012). Les gènes *AtSUC5* et *AtSUC1* sont, de plus, de très proches paralogues et présentent une homologie de séquences au niveau des acides aminées de 86,3% (Sauer *et al.*, 2004). On peut ajouter que les protéines AtSUC1 et AtSUC5 ont été caractérisées comme des transporteurs de saccharose ayant les mêmes spécificités de substrats et propriétés cinétiques (Ludwig *et al.*, 2000; Sauer *et al.*, 2004; Sauer and Stolz, 1994). Afin de vérifier une éventuelle complémentation et éventuellement trouver un phénotype particulier, nous avons cherché à obtenir le double mutant *suc1/suc5* de manière classique en réalisant des allo-fécondations entre le mutant *suc5* (♂) et le mutant *suc1* (♀). Cependant, cela n'a pas été possible puisque les gènes *AtSUC1* et *AtSUC5* sont situés l'un à côté de l'autre sur le chromosome 1 (*At1g71880* et *At1g71890*, respectivement). Toutefois, l'émergence des techniques de mutagénèse ciblée comme CRISPR/CAS9 nous permettra bientôt d'obtenir ce double mutant.

2 Quelle fonction pour AtSUC1 dans la racine ?

En condition « Tm », l'expression d'*AtSUC1* est concentrée dans les racines en développement mais est absente des régions adultes (**Figure 35**), comme cela a pu être décrit à des stades de développement plus précoces (Sivitz *et al.*, 2007). En accord avec Sivitz *et al.* (2007), l'expression d'*AtSUC1* pourrait être concentrée au niveau des tissus conducteurs (**Figures 35 et 36**). Indépendamment du stade de développement, *AtSUC1* est donc exprimé dans les zones de la racine en croissance suggérant un potentiel rôle pour AtSUC1 dans la croissance racinaire. Pour Sivitz *et al.* (2008), AtSUC1 contribuerait au déchargement du saccharose délivré depuis le phloème dans les cellules des zones en croissance de la racine isolées symplastiquement. Aussi, il est imaginable que le déchargement du saccharose induit par AtSUC1 pourrait participer à la croissance racinaire depuis qu'il a été montré que le transport du saccharose lié à l'activité d'AtSUC1 dans le tube pollinique est fortement associé à l'augmentation de la turgescence nécessaire à la croissance de ce dernier (Stadler *et al.*, 1999). Dans un tel scénario, le saccharose une fois chargé dans la cellule pourrait participer à l'efflux d'eau nécessaire à la pression de turgescence pour l'expansion cellulaire.

En accord avec un tel scénario, la répression de l'expression d'AtSUC1 pourrait être liée à la réduction de la croissance racinaire observée en réponse à la carence hydrique. En effet, la proportion de zones ainsi que la taille des zones racinaires où *AtSUC1* est exprimé

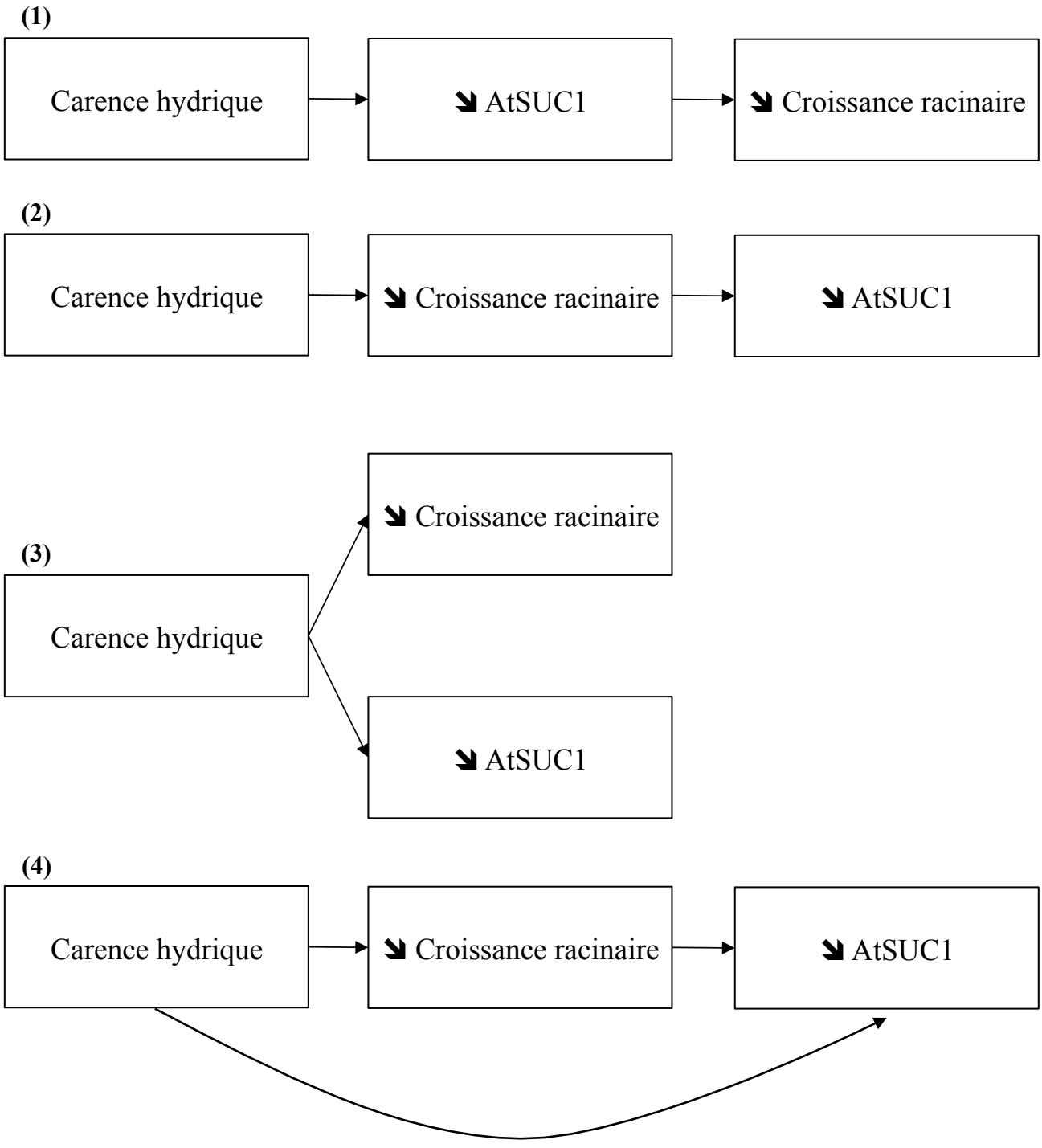


Figure 38 *Hypothèses possibles entre la carence hydrique, la croissance racinaire et l'expression d'AtSUC1.*

semblent moins élevées en condition « St » par rapport à la condition « Tm » (**Figures 35 et 36**). Ainsi, la répression d'*AtSUC1* serait simplement associée à la réduction de la proportion de zones en croissance de la racine. Néanmoins, plusieurs questions peuvent être posées (**Figure 38**) quant à la répression de l'expression d'*AtSUC1* dans la racine en réponse à la carence hydrique : (1) la répression de l'expression d'*AtSUC1* est-elle la cause de la réduction de croissance racinaire ? (2) la répression de l'expression d'*AtSUC1* est-elle une simple conséquence de la réduction de croissance racinaire lors de la carence hydrique ? (3) la répression de l'expression d'*AtSUC1* et la réduction de la croissance racinaire sont-elles deux réponses indépendantes générées en amont par la carence hydrique ? (**Figure 38**). Ne disposant pas encore du double mutant KO *suc1*/*suc5,* il est encore tôt pour statuer quant au rôle essentiel que pourrait avoir AtSUC1 dans la croissance racinaire (Hypothèse (1), **Figure 38**). De ce fait l'hypothèse (2) (**Figure 38**) reste la plus plausible au vu de la réduction de la proportion de zones où l'expression d'*AtSUC1* est retrouvée dans la racine stressée (**Figure 36**). Cependant, l'expression d'*AtSUC1* est régulée négativement par le facteur de transcription ABI5, dont la présence est stabilisée par l'ABA (Hoth *et al.*, 2010). Or, en réponse à la carence hydrique, la racine, en tant que senseur de la disponibilité en eau (Blackman and Davies, 1985; Gowing *et al.*, 1990; Saab and Sharp, 1989; Zhang *et al.*, 1987), génère un signal ABA (Zhang and Davies, 1989). Ce signal pourrait donc participer à la stabilisation du facteur de transcription ABI5, et générer la répression de l'expression d'*AtSUC1* dans les zones où il est classiquement exprimé dans la racine. A partir de ce scénario, il convient de rassembler les hypothèses (2) et (3), pour générer un scénario plus adéquat (Hypothèse (4), **Figure 38**). Dans un tel scénario, la réduction de l'expression d'*AtSUC1* serait liée à la fois à la carence hydrique et la réduction de croissance. De plus, la carence hydrique conserverait son effet direct sur le ralentissement de la croissance (Hypothèse (4), **Figure 38**).

Bilan

AtSUC1 est le gène de type *SUC* le plus exprimé dans la racine de Col-0 et son expression est fortement réprimée dans la racine dont la croissance est réduite en réponse à la carence hydrique. Cependant la seule mutation KO du gène *AtSUC1* ne permet pas de distinguer un éventuel effet sur le développement du système racinaire. L'analyse de l'expression a révélé que parmi les 9 gènes *AtSUC* existant chez *A. thaliana*, seul *AtSUC5* était différentiellement exprimé. L'expression du gène *AtSUC5* est en effet induite dans la racine de plantules (en boite de Pétri) et de plantes adultes (en rhizobox) du mutant *suc1*. De manière intéressante, nos résultats indiquent que la régulation d'*AtSUC5* dans la racine du mutant *suc1* est similaire à celle d'*AtSUC1* dans la racine de Col-0 en réponse au saccharose et à la carence hydrique, suggérant l'existence d'une éventuelle complémentation fonctionnelle chez le mutant *suc1*. C'est d'ailleurs l'existence de cette éventuelle complémentation fonctionnelle qui pourrait être responsable de l'absence de phénotype morphologique au niveau racinaire entre *suc1* et Col-0. Pour vérifier cette hypothèse, nous aurions voulu obtenir par allo-fécondation (*suc5* ♂ x *suc1* ♀) le double mutant KO *suc1*/*suc5*, mais cela ne fut pas possible, les deux gènes étant situés côte à côte sur le chromosome 1 d'*A. thaliana*. C'est pourquoi l'obtention de ce double mutant est pour la suite envisagée à l'aide de la technique CRISPR/CAS9 (Jiang *et al.*, 2013), actuellement en cours de mise au point au laboratoire (Travaux de Florian Veillet).

Etant donné qu'*AtSUC1* est exclusivement exprimé dans les zones de la racine en croissance, il est tentant de penser que la présence d'AtSUC1 est étroitement liée au développement racinaire comme cela a pu être démontré pour la croissance du tube pollinique (Stadler *et al.*, 1999). L'existence éventuelle de cette relation est appuyée par la répression d'*AtSUC1* dans la racine en réponse à la carence hydrique. La raison de cette répression pourrait être double : d'une part elle pourrait être la conséquence de la réduction du nombre de zones en croissance lors de la contrainte hydrique et d'autre part elle pourrait être la conséquence de la signalisation par l'ABA mise en place dans la racine en réponse au manque d'eau.

VII. Chapitre « *AtSUC2* »

Résultats

1 Etude de l'effet de la mutation d'AtSUC2

Les expérimentations de carence hydrique menées au cours de cette thèse sur des plantes Col-0 cultivées en rhizobox ont révélé que l'expression du gène *AtSUC2* était augmentée dans les racines et feuilles des plantes stressées par rapport aux plantes témoins (**Chapitre IV**). Si la fonction et la localisation d'AtSUC2 dans la feuille sont très bien décrites dans la littérature (voir Ludewig and Flügge (2013) pour une revue), le rôle d'AtSUC2 dans la racine est plus énigmatique, même si plusieurs études s'accordent à dire qu'AtSUC2 est impliqué dans la récupération du flux de saccharose relâché depuis le phloème de transport (Gould *et al.*, 2012; Srivastava *et al.*, 2008). La difficulté de l'établissement de la fonction spécifique d'*AtSUC2* dans la racine réside dans le phénotype sévère du mutant *suc2* (Gottwald *et al.*, 2000a; Srivastava *et al.*, 2009). En effet, le chargement du phloème du mutant *suc2* est clairement perturbé conduisant à un fort ralentissement de la croissance foliaire et racinaire. Dans un tel contexte, il est impossible de discerner l'effet de la mutation au niveau racinaire tant la mutation au niveau foliaire conditionne le développement racinaire, car celui-ci est entièrement dépendant du saccharose exporté depuis les feuilles. Ce problème a en partie été résolu en exprimant le gène *AtSUC2* sous le contrôle du promoteur de la galactinol synthase du melon (*CmGAS1p*) dans le mutant *suc2* (Srivastava *et al.*, 2008). Les plantes alors générées (*suc2*F), exprimant *AtSUC2* uniquement dans les cellules compagnes des fines nervures des feuilles, présentent un phénotype partiellement restauré puisque leur croissance foliaire et racinaire reste inférieure à celle de Col-0 (Srivastava *et al.*, 2008). Les plantes *suc2*F dont la croissance racinaire est réduite, n'expriment pas *AtSUC2* dans la racine. Ainsi la réduction de la croissance racinaire pourrait être associée à l'absence d'*AtSUC2* au niveau racinaire. Pour vérifier cette hypothèse, il convient d'annuler l'effet de la présence de la mutation dans la rosette *suc2*F. La technique de micro-greffe apparaît donc comme une solution pour répondre à cette question biologique. C'est pourquoi des micro-greffes ont été réalisées entre Col-0 et *suc2-F* (Rosette/Racine : Col-0/Col-0, *suc2*F/*suc2*F, Col-0/*suc2*F, *suc2*F/Col-0). Les graines des différentes plantes utilisées dans ce chapitre nous ont été généreusement données par Sylvie Dinant de l'INRA de Versailles.

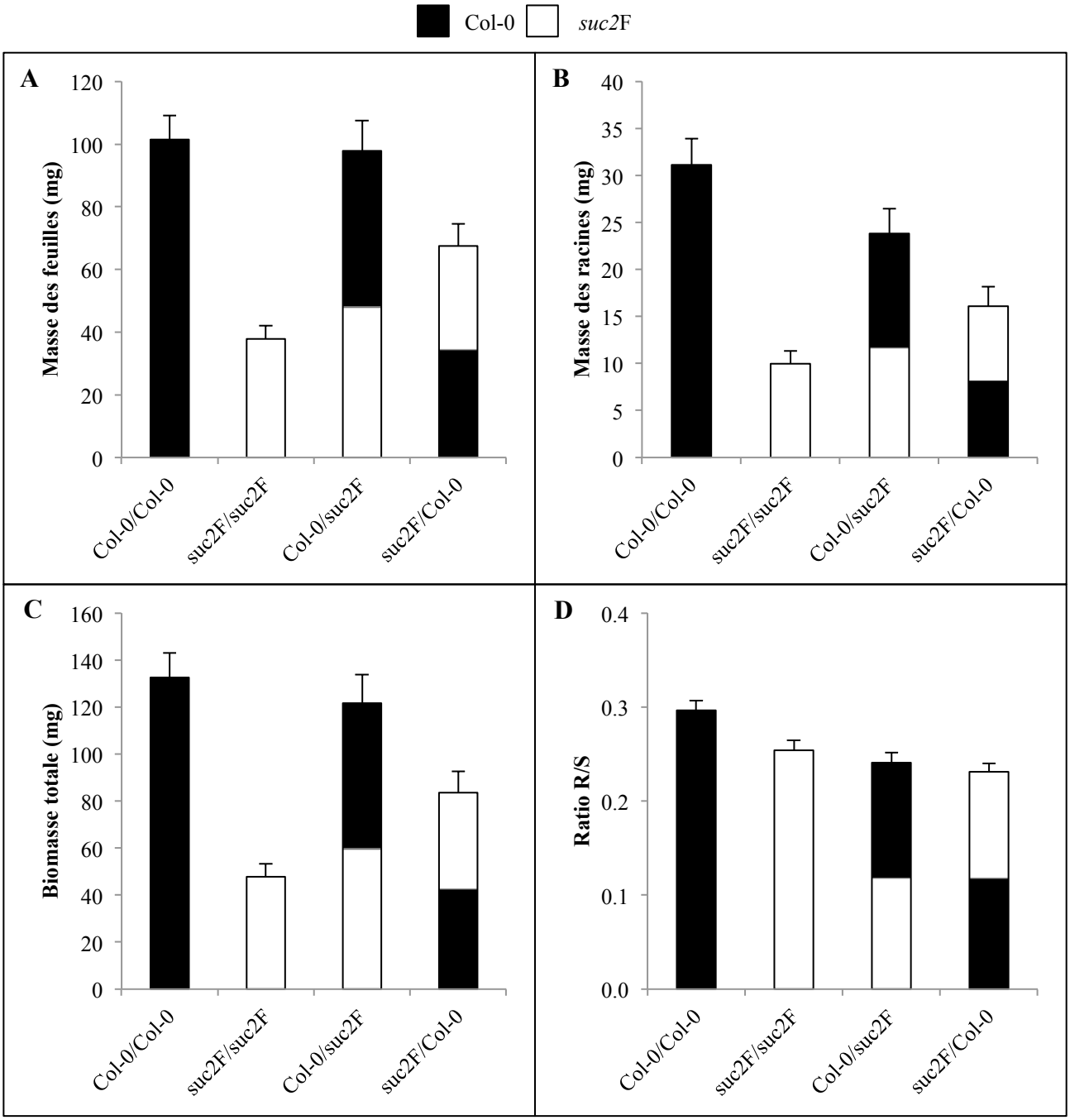


Figure 39 *Biomasses fraiches et ratio R/S de plantes greffées (Col-0; suc2F) cultivées en rhizobox en régime hydrique classique pendant 21 jours après la prise de la greffe.*

A, Masse fraiche des feuilles des plantes greffées. **B**, Masse fraiche des racines des plantes greffées. **C**, Masse fraiche totale des plantes greffées. **D**, Ratio R/S des plantes greffées. Les valeurs présentées correspondent aux moyennes (± ES) de 12 à 17 plantes.

Le génotype des plantes greffées est indiqué de la façon suivante : Rosette/Racine. Les couleurs supérieures et inférieures d'une barre correspondent respectivement au fond génétique de la rosette et de la racine (Noir, Col-0 ; Blanc, *suc2*F).

1.1 Avant propos sur la micro-greffe chez *A. thaliana*

Avant toute chose, il convient de noter qu'à âge temporel équivalent, les plantes greffées présentent une importante réduction de la biomasse malgré l'absence de carence hydrique ou nutritionnelle dans la rhizobox. Le développement des plantes greffées n'est pas le seul paramètre affecté par le processus de greffe. En effet, les teneurs en sucres solubles sont plus importantes dans les plantes greffées et plus particulièrement au niveau de la racine, où les hexoses se sont particulièrement accumulés. Plusieurs contrôles sont toutefois nécessaires pour discerner les effets spécifiques de la greffe des effets induits par l'environnement nécessaire à la greffe. C'est pourquoi les prochaines greffes devront être effectuées en parallèle avec des plantes dont le cotylédon et la racine ne seront pas coupés, et des plantes dont seulement un cotylédon sera coupé. Les données relatives à la comparaison des plantes greffées et non-greffées sont présentées en **Annexe VII**.

1.2 Effet des différentes greffes sur la biomasse

Les plantes greffées âgées d'une dizaine de jours (5 jours de culture en boîte de Pétri + 5 jours pour la prise de la greffe) ont été cultivées en rhizobox en régime hydrique classique pendant 21 jours après la prise de la greffe. Les plantes ont été récoltées au milieu de la photopériode, soit après 5h d'éclairement, puis la biomasse fraîche a été mesurée pour chacun des organes. La biomasse des plantes à la récolte permet d'évaluer le développement des plantes greffées.

La masse des feuilles des plantes greffées de Col-0/Col-0 (101,5 mg) n'est pas foncièrement différente de celle des plantes greffées Col-0/*suc2*F (97,8 mg) (**Figure 39A**). En revanche, la masse des feuilles de *suc2*F/Col-0 (67,5 mg) et *suc2*F/*suc2*F (37,8 mg) est plus faible que celle de Col-0/Col-0 et Col-0/*suc2*F. De plus, la masse des feuilles de *suc2*F/*suc2*F est réduite par rapport à celle de *suc2*F/Col-0 (**Figure 39A**).

La masse des racines de Col-0/Col-0 (31,1 mg) est légèrement supérieure à celle de Col-0/*suc2*F (23,8 mg) (**Figure 39B**). La masse des racines de *suc2*F/Col-0 (16,1 mg) et *suc2*F/*suc2*F (10,0 mg) est, comme pour les feuilles, moins importante que celle de Col-0/Col-0. De plus, la masse des racines de *suc*2F/Col-0 semble plus importante que celle de *suc*2F/*suc2*F (**Figure 39B**).

Etant donné que la masse des feuilles est proportionnellement toujours plus importante que celle des racines, la tendance observée pour la biomasse totale suit approximativement celle observée pour les feuilles (**Figure 39C**). La masse des plantes Col-0/Col-0 (132,6 mg)

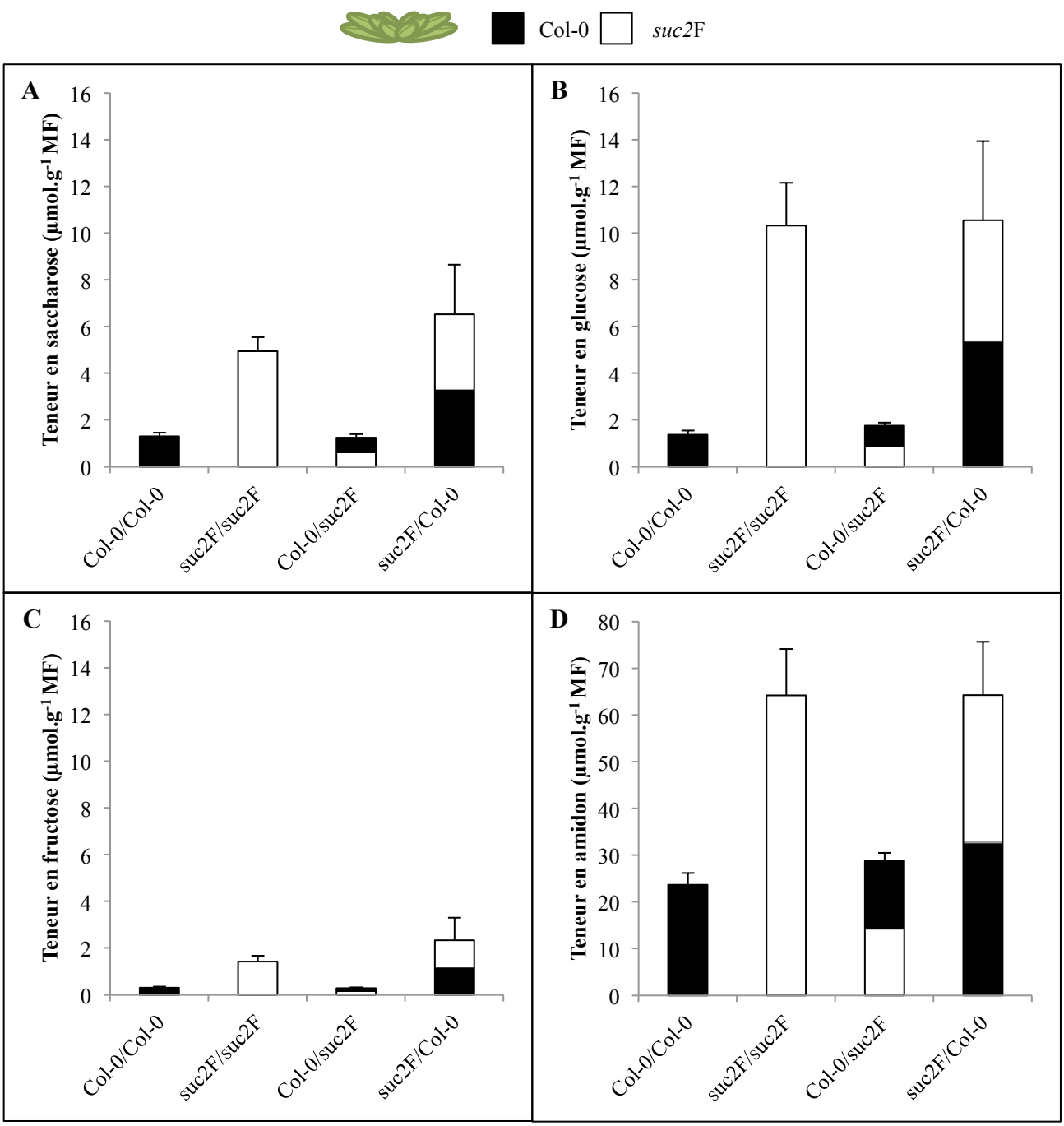


Figure 40 *Teneurs en sucres solubles et amidon des feuilles de plantes greffées (Col-0; suc2F) cultivées en rhizobox en régime hydrique classique pendant 21 jours après la prise de la greffe.*
A, Teneur en saccharose des feuilles de plantes greffées. **B**, Teneur en glucose des feuilles de plantes greffées. **C**, Teneur en fructose des feuilles de plantes greffées. **D**, Teneur en amidon des feuilles de plantes greffées. Les extractions ont été effectuées sur plante individuelle et les données sont exprimées en µmol.g^{-1} de poids frais. Les teneurs en amidon sont données en équivalent glucose. Les valeurs présentées correspondent aux moyennes (± ES) de 5 à 8 plantes.
Le génotype des plantes greffées est indiqué de la façon suivante : Rosette/Racine. Les couleurs supérieures et inférieures d'une barre correspondent respectivement au fond génétique de la rosette et de la racine (Noir, Col-0 ; Blanc, *suc2*F).

est donc sensiblement équivalente à celle des plantes Col-0/*suc2*F (121,7 mg) (**Figure 39C**). De même, *suc2*F/*suc2*F (47,8 mg) et *suc2*F/Col-0 (83,6 mg) présentent une biomasse totale inférieure à celle de Col-0/Col-0. Enfin, la biomasse totale de *suc2*F/*suc2*F est plus faible que celle de *suc2*F/Col-0 (**Figure 39C**).

En ce qui concerne le ratio R/S, il présente une faible variation pour l'ensemble des combinaisons de greffe. En effet, les valeurs oscillent de 0,231 (*suc2*F/Col-0) à 0,297 (Col-0/Col-0) (**Figure 39D**). Néanmoins, les greffes portant un fond génétique *suc2*F dans les feuilles et/ou racines (*suc2*F/*suc2*F, 0,254 ; *suc2*F/Col-0, 0,231 ; Col-0/*suc2*F, 0,241) peuvent être rassemblées dans un même groupe dont le ratio R/S est inférieur à celui de Col-0/Col-0 (0,297) (**Figure 39D**).

En résumé, la masse des rosettes Col-0 ne semble pas affectée par la présence (Col-0/Col-0) ou l'absence d'*AtSUC2* dans la racine (Col-0/*suc2*F). En revanche, ce n'est pas le cas de la racine. En effet, la mutation KO d'*AtSUC2* confinée à la racine (Col-0/*suc2*F) semble réduire légèrement la croissance de cette dernière, réduisant faiblement dans le même temps le ratio R/S. Cependant, l'expression d'*AtSUC2*, restreinte à la racine (*suc2*F/Col-0), semble favoriser le développement de la rosette *suc2F*.

1.3 Effet des différentes greffes sur les teneurs en sucres

Les feuilles et racines de chacune des greffes ont été récoltées, séparées puis pesées et les extractions de sucres ont ensuite été effectuées sur feuille et racine individuelle.

1.3.1 Teneurs en sucres solubles et amidon dans les feuilles

Les plantes ayant une rosette Col-0 présentent des teneurs en saccharose comparables (Col-/Col-0, 1,31 µmol.g^{-1} MF ; Col-0/*suc2*F, 1,25 µmol.g^{-1} MF) (**Figure 40A**). En revanche, les plantes ayant une rosette *suc2*F ont des teneurs certes équivalentes entre elles (*suc2*F/*suc2*F, 4,95 µmol.g^{-1} MF ; *suc2*F/Col-0, 6,53 µmol.g^{-1} MF) mais bien supérieures à celle des plantes présentant une rosette Col-0 (**Figure 40A**).

Concernant les teneurs en glucose, les plantes dont la rosette est de génotype Col-0 possèdent des teneurs non seulement proches entre elles (Col-/Col-0, 1,37 µmol.g^{-1} MF ; Col-0/*suc2*F, 1,76 µmol.g^{-1} MF) (**Figure 40B**) mais aussi équivalentes à celles des teneurs en saccharose (**Figure 40A**). En revanche, *suc2*F/*suc2*F et *suc2*F/Col-0 présentent des teneurs en glucose plus importantes que leurs homologues ayant une rosette Col-0 (*suc2*F/*suc2*F, 10,32 µmol.g^{-1} MF ; *suc2*F/Col-0, 10,55 µmol.g^{-1} MF). De plus, les teneurs en glucose sont plus

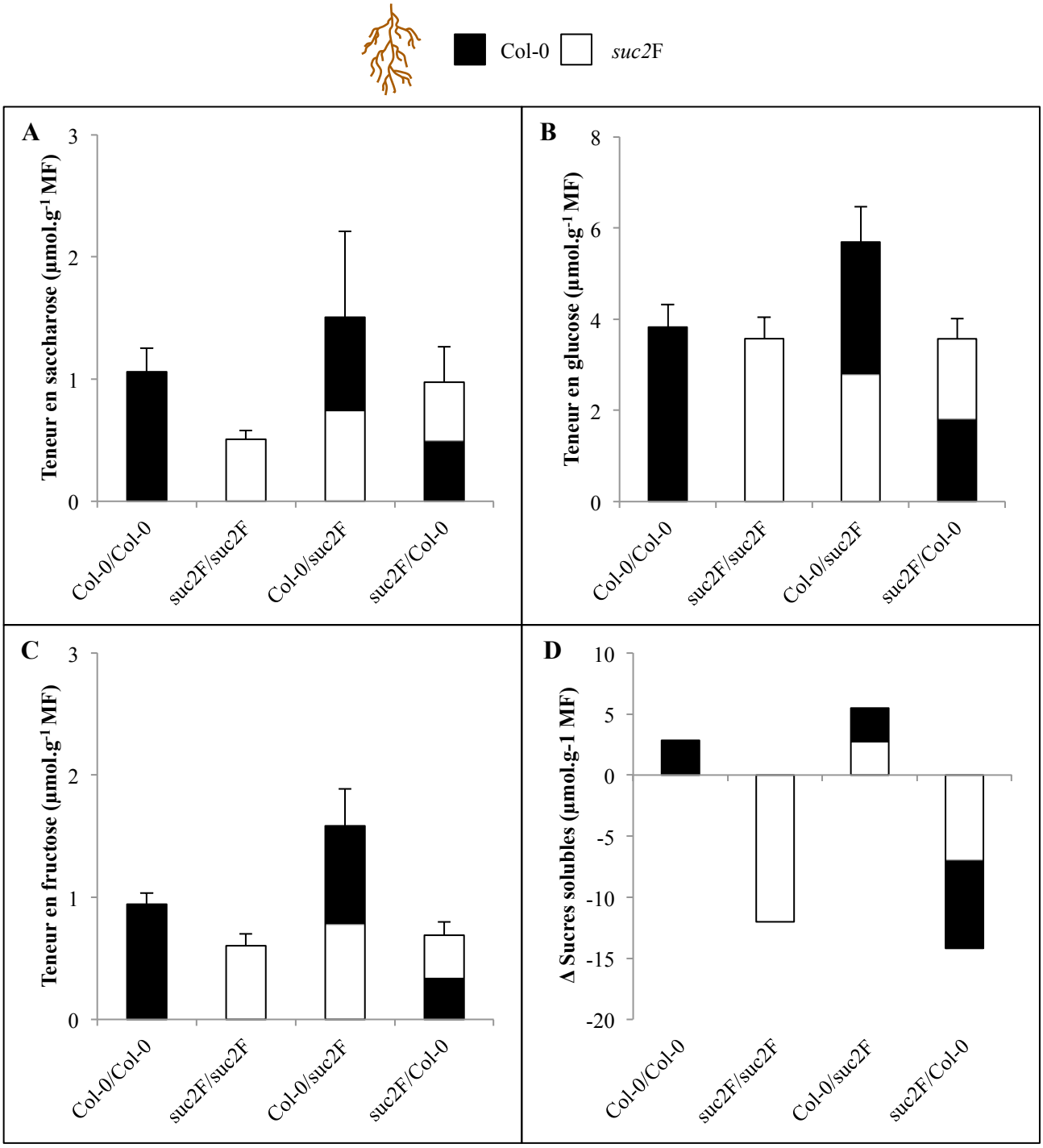


Figure 41 *Teneurs en sucres solubles des racines de plantes greffées (Col-0; suc2F2) cultivées en rhizobox en régime hydrique classique pendant 21 jours après la prise de la greffe.*

A, Teneur en saccharose des racines de plantes greffées (Col-0 ; *suc2*F). **B**, Teneur en glucose des racines de plantes greffées (Col-0 ; *suc2*F). **C**, Teneur en fructose des racines de plantes greffées (Col-0 ; *suc2*F). **D**, Différence de teneurs en sucres entre les racines et les feuilles des plantes greffées (Col-0; *suc2*F). Les extractions ont été effectuées sur plante individuelle et les données sont exprimées en µmol.g^{-1} de poids frais. Les valeurs présentées correspondent aux moyennes (± ES) de 5 à 8 plantes.

Le génotype des plantes greffées est indiqué de la façon suivante : Rosette/Racine. Les couleurs supérieures et inférieures d'une barre correspondent respectivement au fond génétique de la rosette et de la racine (Noir, Col-0 ; Blanc, *suc2*F).

importantes que celles en saccharose chez *suc2*F/*suc2*F et *suc2*F/Col-0 (**Figure 40B**), ce qui n'est pas observé chez Col-0/Col-0 et Col-0/*suc2*F.

Quant au fructose, il est présent en quantité moindre par rapport au saccharose et au glucose dans chacune des greffes, les valeurs oscillant entre 0,29 µmol.g^{-1} MF (Col-0/*suc2*F) et 2,34 µmol.g^{-1} MF (*suc2*F/Col-0) (**Figure 40C**). Comme pour le saccharose et le glucose, les teneurs en fructose relevées pour les plantes présentant une rosette Col-0 ne sont pas différentes entre elles (Col-/Col-0, 0,31 µmol.g^{-1} MF; Col-0/*suc2*F, 0,29 µmol.g^{-1} MF). De même, les teneurs en fructose sont supérieures dans les plantes dont la rosette est de génotype *suc2*F (*suc2*F/*suc2*F, 1,43 µmol.g^{-1} MF ; *suc2*F/Col-0, 2,34 µmol.g^{-1} MF) comparées à leurs homologues avec une rosette Col-0 (**Figure 40C**).

Alors que les teneurs en amidon oscillent autour de 25 µmol.g^{-1} MF chez les plantes dotées d'une rosette Col-0 (Col-/Col-0, 23,67 µmol.g^{-1} MF ; Col-0/*suc2*F, 28,88 µmol.g^{-1} MF), celles ayant une rosette *suc2*F présentent des teneurs presque 3 fois supérieures comparées à ces dernières (*suc2*F/*suc2*F, 64,19 µmol.g^{-1} MF; *suc2*F/Col-0, 64,25 µmol.g^{-1} MF) (**Figure 40D**).

En résumé, l'analyse des teneurs en sucres solubles et amidon dans les feuilles des différentes plantes greffées a permis de distinguer deux groupes, un premier groupe rassemblant les plantes ayant une rosette Col-0 (Col-/Col-0, Col-0/*suc2*F) et un second groupe comprenant les plantes ayant une rosette *suc2*F (*suc2*F/ *suc2*F et *suc2*F/Col-0). Les plantes du second groupe ont des teneurs en saccharose, glucose, fructose et amidon supérieures à celle du premier groupe (**Figure 40**).

1.3.2 Teneurs en sucres solubles dans les racines

Le saccharose est présent à hauteur d'environ 1 µmol.g^{-1} MF dans les racines de Col-0/Col-0 (1,06 µmol.g^{-1} MF) et *suc2*F/Col-0 (0,97 µmol.g^{-1} MF). La teneur en saccharose de la racine de Col-0/*suc2*F (1,51 µmol.g^{-1} MF) est supérieure à celle des plantes ayant une racine Col-0. En revanche la teneur en saccharose de la racine de *suc2*F/*suc2*F (0,5 µmol.g^{-1} MF) est inférieure à celle de toutes les autres plantes (**Figure 41A**).

En ce qui concerne le glucose, les teneurs oscillent entre 3,57 µmol.g^{-1} MF (*suc2*F/*suc2*F) et 5,69 µmol.g^{-1} MF (Col-0/*suc2*F), ce qui est bien plus important que les teneurs en saccharose relevées dans les racines. La teneur maximale en glucose est obtenue pour Col-0/*suc2*F (5,69 µmol.g^{-1} MF), même si les teneurs des autres plantes restent elles

aussi importantes, quoique plus basses (Col-0/Col-0, 3,83 µmol.g^{-1} MF ; *suc2*F/*suc2*F, 3,57 µmol.g^{-1} MF; *suc2*F/Col-0, 3,57 µmol.g^{-1} MF) (**Figure 41B**).

Le fructose est présent dans des quantités avoisinant celles mesurées pour le saccharose dans les racines des différentes plantes greffées. En effet le fructose est présent à hauteur de 1 µmol.g^{-1} MF dans les racines des différentes plantes greffées (Col-/Col-0, 0,94 µmol.g^{-1} MF ; *suc2*F/*suc2*F, 0,6 µmol.g^{-1} MF ; Col-0/*suc2*F, 1,58 µmol.g^{-1} MF ; *suc2*F/Col-0, 0,69 µmol.g^{-1} MF) (**Figure 41C**). Notons que comme pour le saccharose et le glucose, la teneur maximale en fructose est obtenue dans la racine de Col-0/*suc*2F (**Figure 41C**).

La teneur en sucres solubles totaux est plus importante dans les racines que dans les rosettes des plantes Col-0/Col-0 (+ 2,84 µmol.g^{-1} MF) et Col-0/*suc2*F (+5,48 µmol.g^{-1} MF). En revanche, les plantes présentant une rosette *suc2*F ont une teneur en sucres solubles moins importante dans les racines que dans les feuilles (*suc2*F/*suc2*F, -12,0 µmol.g^{-1} MF ; *suc2*F/Col-0, -14,2 µmol.g^{-1} MF).

En résumé, de très faibles fluctuations sont observées dans les racines des plantes greffées. Cependant, alors que la racine de *suc2F/suc2F* présente les teneurs minimales en chacun des sucres solubles dosées, la racine de Col-0/*suc2F* montre les teneurs maximales en chacun des sucres solubles. De plus, quel que soit le type de greffe considéré, le glucose est présent en quantité importante dans la racine par rapport aux plantes non greffées (**Chapitre III et IV**) (**Figure 41**).

2 Etude de la localisation de l'expression d'*AtSUC2* dans la racine

En parallèle de la recherche de la fonction d'AtSUC2 dans la racine, des études ont été menées pour définir la localisation de l'expression de ce gène au niveau racinaire. En effet, connaître la localisation de ce transporteur de sucre dans la racine est une étape nécessaire à la compréhension de son rôle dans la racine de la plante *A. thaliana*. Comme c'est le cas pour la localisation de l'expression du gène *AtSUC1,* l'expression du gène *AtSUC2* n'a jusqu'à présent été déterminée qu'à des stades précoces de développement (environs 15 jours). C'est pourquoi, nous avons procédé à la localisation de l'expression d'*AtSUC2* dans la racine de plantes pSUC2-GUS (Truernit and Sauer, 1995b) âgées de 30 jours cultivées en rhizobox en régime hydrique classique ou restreint. En complément, la localisation de l'expression d'*AtSUC2* dans la racine a aussi été réalisée en utilisant des plantes pSUC2-GFP (Stadler *et al.*, 2005a) (GFP soluble) greffées avec Col-0 (pAtSUC2-GFP/pAtSUC2-GFP, Col-

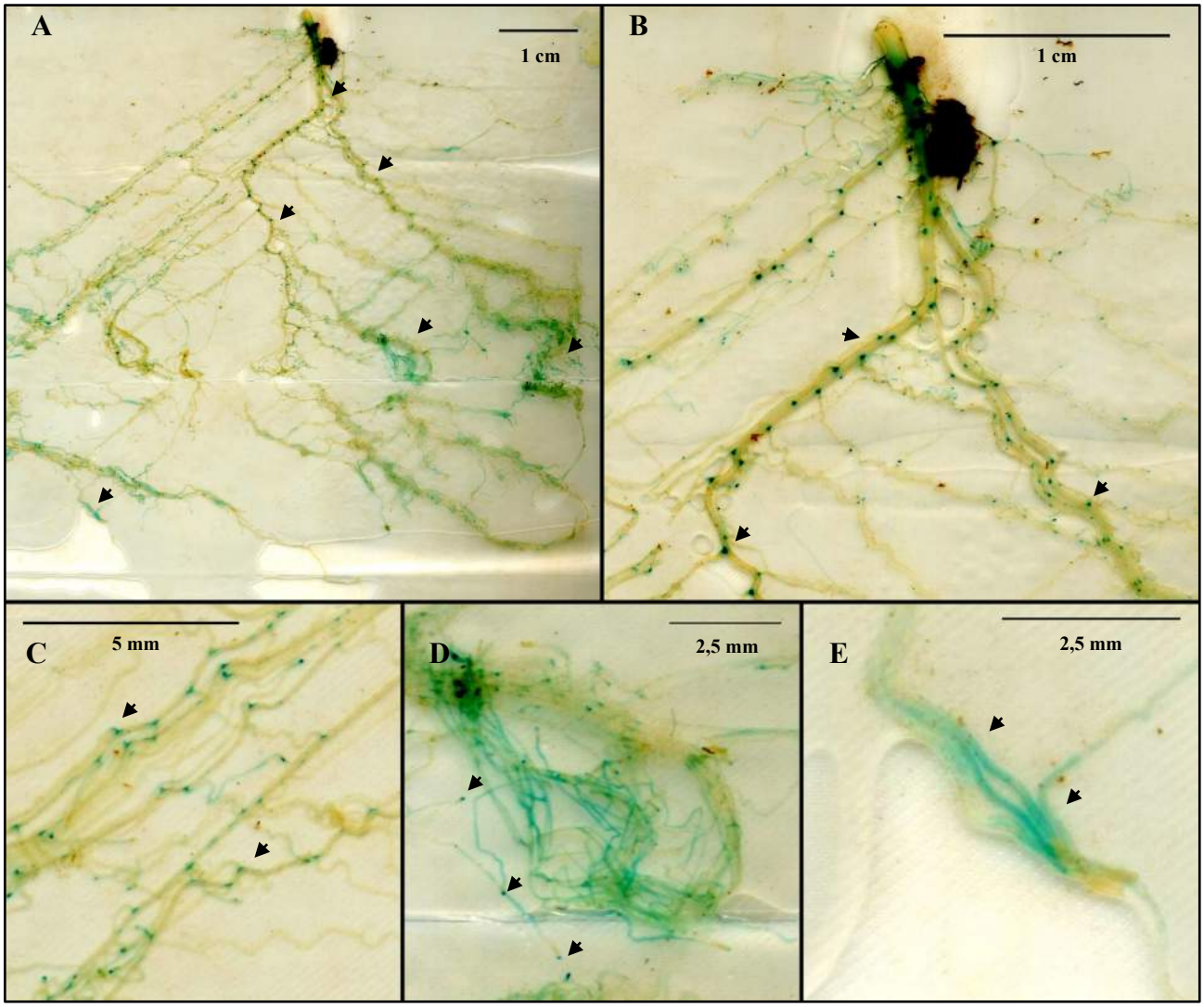


Figure 42 *Localisation de l'expression d'AtSUC2 dans la racine de plantes âgées de 30 jours cultivées en rhizobox en régime hydrique classique.*
La localisation a été déterminée en utilisant des plantes *pAtSUC2::GUS*, exprimant le gène GUS sous le contrôle du promoteur du gène (2,3 kb) *AtSUC2*. Les flèches noires indiquent les zones d'expression du gène *AtSUC2*. **A**, Vue du système racinaire dans son intégralité. **B**, Grossissement de la partie supérieure de la racine principale. **C**, Grossissement des racines de la partie inférieure du système racinaire. **D et E**, Grossissement des pointes racinaires.

0/pAtSUC2-GFP et pAtSUC2-GFP/Col-0) et cultivées durant 21 jours en rhizobox après la prise de la greffe.

2.1 Localisation de l'expression d'*AtSUC2* dans la racine à l'aide de plantes pAtSUC2-GUS

En régime hydrique classique, le marquage GUS est retrouvé dans les racines situées à la fois à proximité de la surface du sol ou en profondeur (**Figure 42A**). Le marquage GUS est visualisé au niveau de la racine primaire (**Figure 42A et B**) et des racines latérales (**Figure 42A, B et C**). Plus précisément, l'expression d'*AtSUC2* est particulièrement localisée au niveau de la zone de départ des racines secondaires et tertiaires (**Figure 42A, B et C**). De plus, la zone où le marquage GUS est visualisé, est restreinte à quelques cellules situées de part et d'autre de la zone de départ des racines. Le marquage GUS n'est observé que du côté où la racine latérale se développe (**Figure 42B**). Le marquage GUS est aussi retrouvé au niveau des pointes racinaires sous forme de deux bandes (**Figure 42D et E**). A ce niveau, l'expression est relevée sur une zone assez large (**Figure 42D et E**) située à environ 860 µm de l'extrémité de la pointe racinaire (**Figure 44**), soit dans la zone de terminaison de la croissance de la racine. L'expression d'*AtSUC2* est parfois aussi retrouvée au niveau de la coiffe de la racine (**Figure 42D**).

Conformément à ce qui pouvait être attendu, le système racinaire des plantes SUC2-GUS est moins développé en régime hydrique restreint par rapport à leurs homologues cultivés en régime hydrique classique (**Figure 43A**). Tout comme chez les plantes « Tm », le marquage est retrouvé dans toutes les zones de la racine, même si la proportion de racines marquées semble plus importante ici, alors même que les conditions pour révéler le marquage GUS sont les mêmes (**Figure 43A**). Le profil de la localisation de l'expression d'*AtSUC2* dans la racine n'est pas différent en condition « St » par rapport à la condition « Tm ». Le marquage GUS est en effet visualisé au niveau des départs des racines secondaires et tertiaires (**Figure 43A, B et C**), au niveau des pointes racinaires (**Figure 43D et E**) et de la coiffe (**Figure 43E**). En revanche, la distance séparant l'extrémité de la pointe racinaire du début du marquage GUS est clairement réduite (-58%) en condition « St » (353 µm) (**Figure 44**).

La zone de départ des racines secondaires et tertiaires, où le marquage GUS est localisé a ensuite été visualisée en détail en microscopie confocale (**Figure 45A**) et au macroscope (**Figure 45B**) étant donné qu'une telle localisation de l'expression d'*AtSUC2* n'avait jamais été décrite jusqu'alors. Les observations réalisées montrent que l'expression d'*AtSUC2* est

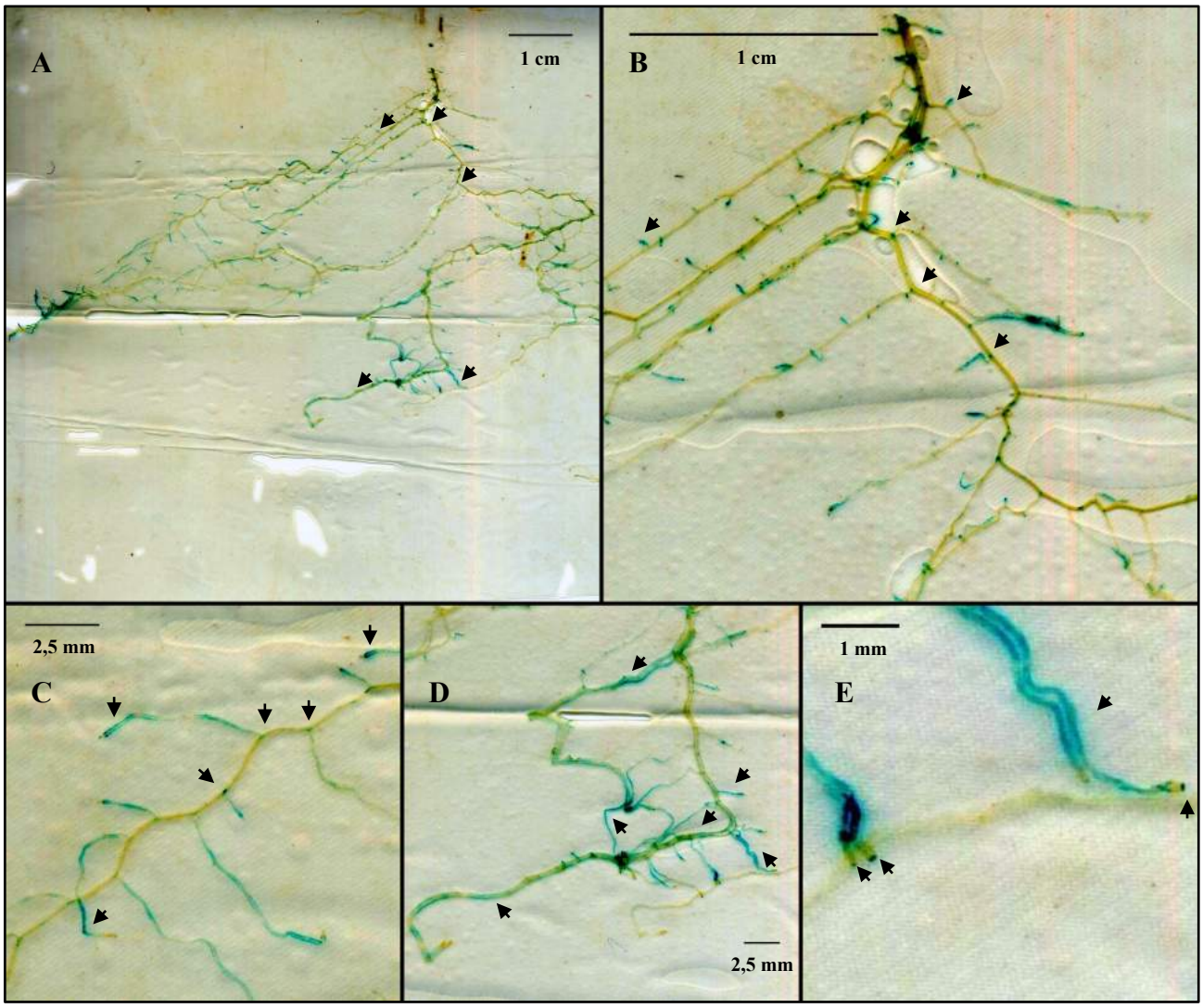


Figure 43 *Localisation de l'expression d'AtSUC2 dans la racine de plantes âgées de 30 jours cultivées en rhizobox en carence hydrique*.
La localisation a été déterminée en utilisant des plantes *pAtSUC2::GUS*, exprimant le gène GUS sous le contrôle du promoteur du gène (2,3 kb) *AtSUC2*. Les flèches noires indiquent les zones d'expression du gène *AtSUC2*. **A**, Vue du système racinaire dans son intégralité. **B**, Grossissement de la partie supérieure de la racine principale. **C**, Grossissement des racines de la partie inférieure du système racinaire. **D**, Grossissement de l'extrémité inférieure de la racine principale. **E**, Grossissement sur des pointes racinaires.

bien localisée dans une zone restreinte de part et d'autre de la zone de départ d'une racine (**Figure 45**). Plus précisément, l'expression d'*AtSUC2* est retrouvée dans des cellules pouvant être situées en périphérie de la stèle ou dans le cortex (**Figure 45**). De plus, le marquage GUS n'est ni visible dans le cœur de la stèle (**Figure 45A**), ni dans les zones éloignées de la zone de départ entre deux racines (**Figure 45B**).

L'observation des racines pSUC2-GUS au macroscope a révélé que l'expression d'*AtSUC2* est aussi présente dans la racine adulte entre les départs de racines (**Figure 45C**). L'expression d'*AtSUC2* y est retrouvée de part et d'autre de la racine, sous forme de deux fines bandes situées à proximité de l'épiderme (**Figure 45C**). Ce marquage est invisible à l'œil nu, c'est pourquoi il n'est pas observé dans les **figures 42 et 43**.

2.2 Localisation de l'expression d'*AtSUC2* dans la racine à l'aide de plantes pAtSUC2-GFP

Les plantes greffées entre pSUC2-GFP (soluble) et Col-0 ont premièrement été utilisées pour contrôler la fusion des faisceaux conducteurs des greffes mais elles se sont aussi avérées utiles quant à la localisation de l'expression d'*AtSUC2* dans la racine.

Conformément à ce qui pouvait être attendu, aucun signal visuel correspondant à la GFP n'a été retrouvé dans la racine de Col-0/Col-0 utilisée ici comme contrôle négatif (**Figure 46A**). Il doit être noté que le temps d'exposition pour capturer l'image a été considérablement augmenté afin de pouvoir discerner la racine, d'où le fort bruit de fond. En ce qui concerne pSUC2-GFP/pSUC2-GFP, la fluorescence est visualisée dans la racine sous la forme de deux lignes au centre de cette dernière. Cette localisation pourrait correspondre à la position du phloème. De plus, l'intensité de la fluorescence est beaucoup plus marquée au niveau de la zone de départ des racines (**Figure 46B**).

Au niveau de la racine des plantes Col-0/pSUC2-GFP, la fluorescence est localisée au niveau de la zone de départ des racines ainsi que sous forme de deux faisceaux tout le long des racines (**Figure 46C**). En revanche, aucune accumulation de fluorescence n'a été notée dans les pointes racinaires.

Enfin, deux faisceaux de fluorescence au centre des racines sont observés tout le long des racines pour pSUC2-GFP/Col-0 (**Figure 46D**). Une accumulation de fluorescence a aussi été notée au niveau des pointes racinaires de la racine de pSUC2-GFP/Col-0. En revanche, aucune augmentation de l'intensité de la fluorescence n'a été observée au niveau des zones entre deux racines (**Figure 46D**).

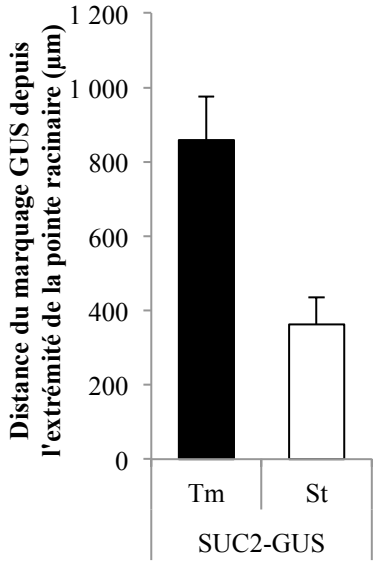


Figure 44 *Distance séparant l'extrémité de la pointe racinaire du début du marquage GUS observé dans les plantes SUC2-GUS âgées de 30 jours cultivées en rhizobox en régime hydrique classique ou restreint*.

La localisation a été déterminée en utilisant des plantes *pAtSUC2::GUS*, exprimant le gène GUS sous le contrôle du promoteur du gène *AtSUC2 (*2,3 kb). Les données présentées correspondent à la moyenne (± ES) de 12 mesures.

3 Etude de la localisation de la protéine AtSUC2

L'étude des plantes pSUC2-GUS nous a permis de situer l'expression d'*AtSUC2* dans la racine au niveau des départs des racines secondaires et tertiaires, entre ces zones et dans les pointes racinaires. En revanche, l'utilisation de plantes exprimant la GFP soluble sous le contrôle du promoteur d'*AtSUC2* ne nous a permis que de confirmer la présence de l'expression d'*AtSUC2* au niveau des départs des racines secondaires et tertiaires étant donné que le signal observé le long du phloème de transport peut correspondre à deux types de GFP, la GFP synthétisée sur place et la GFP transportée.

Nous avons souhaité aller plus loin quant à la localisation de l'expression d'*AtSUC2* dans la racine, c'est pourquoi l'analyse de la localisation de la protéine AtSUC2 dans la racine a récemment été initiée. Dans un premier temps, l'anticorps anti-AtSUC2 disponible au laboratoire a été testé sur coupe transversale de hampe florale de Col-0 (contrôle positif) et *suc2*F (contrôle négatif). Par la suite, la localisation d'AtSUC2 sur des coupes transversales de racine primaire de Col-0 a pu débuter.

3.1 Validation de l'anticorps anti-AtSUC2

L'anticorps anti-AtSUC2 utilisé est un anticorps polyclonal issue du lapin dirigé contre un peptide (SD22) de l'extrémité C-terminale d'AtSUC2. La réactivité de l'anticorps anti-AtSUC2 a préalablement été testée contre un extrait de protéines membranaires de *Saccharomyces cerevisiae* exprimant la protéine AtSUC2. Ce premier test s'est avéré concluant puisque la protéine correspondant à la taille supposée d'AtSUC2 était reconnue par l'anticorps anti-AtSUC2 après western blot. De plus, aucun signal n'a été détecté quand l'anticorps a été testé contre un extrait de protéines membranaires provenant de levures n'exprimant pas AtSUC2, ce qui démontre bien sa spécificité de reconnaissance pour AtSUC2 dans la levure.

L'anticorps anti-AtSUC2 a été utilisé en parallèle de l'anticorps anti-RS6 (préparé dans la souris) sur coupe transversale de hampe florale de plantes Col-0 et *suc2*F. L'anticorps monoclonal anti-RS6 cible spécifiquement les protéines du tube criblé (Khan *et al.*, 2007). Chaque anticorps primaire (anti-AtSUC2 et anti-RS6) est ciblé par un anticorps secondaire dont la longueur d'onde d'émission et la cible sont différentes (Alexa 488, chèvre anti-lapin ; Alexa 555, chèvre anti-souris, respectivement). Ainsi le signal correspondant à AtSUC2 apparaît en vert alors que celui correspondant à RS6 apparaît en rouge.

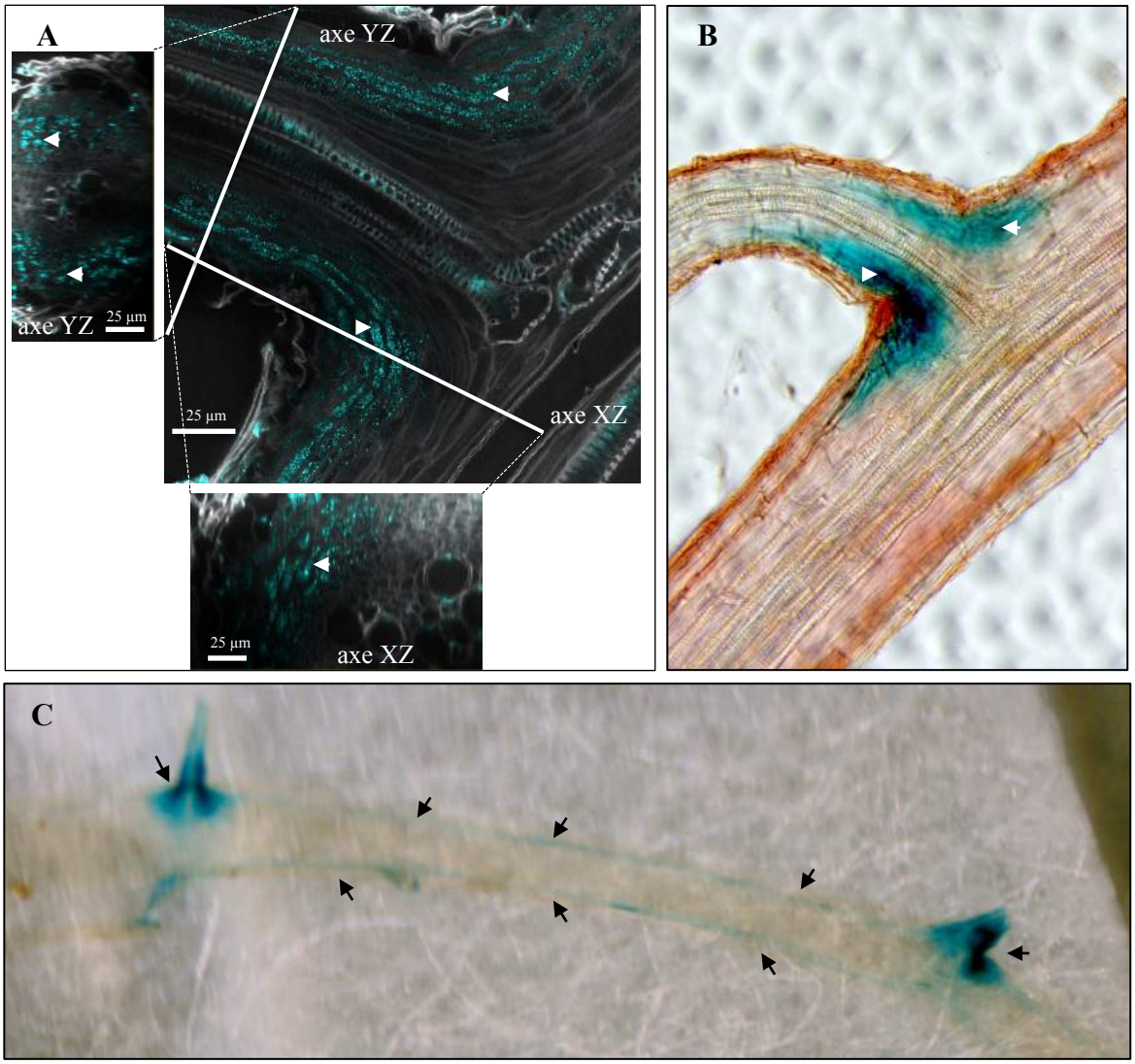


Figure 45 *Localisation détaillée de l'expression de AtSUC2 dans la racine principale de plantes âgées de 30 jours cultivées en rhizobox en régime hydrique classique*.
La localisation a été déterminée en utilisant des plantes *pAtSUC2::GUS*, exprimant le gène GUS sous le contrôle du promoteur du gène (2,3 kb) *AtSUC2*. Le marquage GUS a été observé en utilisant le mode réflexion du microscope confocal (A) (FV1000, Olympus), et le macroscope (B et C). Pour la microscopie confocale, les coupes de racines ont été colorées au iodure de propidium. Les flèches blanches (A et B) et noires (C) indiquent les zones d'expression du gène *AtSUC2*. **A**, Zone de départ d'une racine observée au microscope confocal. **B**, Zone de départ d'une racine observée au macroscope. **C**, Zone de la racine mature entre deux zones de départ de racines latérales observée au macroscope.

Dans la hampe florale de Col-0, le signal correspondant à la protéine AtSUC2 est localisé dans des cellules de faible diamètre toujours juxtaposées à des cellules de diamètre plus important où le signal correspondant à RS6 est retrouvé (**Figure 47A et B**). Ainsi l'anticorps anti-AtSUC2 cible des protéines de cellules situées autour de cellules du tube criblé : les cellules compagnes (**Figure 47A et B**). De plus, le signal correspondant à la protéine AtSUC2 délimite parfaitement le contour des cellules, suggérant une localisation membranaire de sa cible.

Dans la hampe florale de *suc2*F, le signal correspondant à RS6 est bien retrouvé (**Figure 47C et D**). En revanche, aucun signal correspondant à la présence de la protéine AtSUC2 n'est visible, confirmant l'absence d'expression de la protéine AtSUC2 dans le phloème de transport de *suc2*F (**Figure 47C et D**). De plus, ceci prouve la spécificité de l'anticorps anti-AtSUC2 utilisé car il n'y pas de réaction croisée avec une autre protéine chez *suc2*F.

3.2 Etude de la localisation de la protéine AtSUC2 dans la racine d'*A. thaliana*

Les études concernant la localisation de la protéine AtSUC2 dans la racine d'*A. thaliana* n'ont été commencées que récemment, aussi seule la racine primaire de Col-0 a pu faire l'objet de l'étude. Les coupes transversales ont été effectuées à proximité des départs des racines secondaires et tertiaires, autant que possible.

L'immunolocalisation de la protéine AtSUC2 effectuée sur coupe transversale de la partie supérieure de la racine primaire a révélé que seul un faible nombre de cellules de faible diamètre présentait le signal correspondant à la présence de la protéine AtSUC2 (**Figure 48A**). Ces cellules sont souvent rassemblées au nombre de trois autour d'une même cellule non marquée (**Figure 48B**). Il est encore cependant difficile d'être formel quant à l'identité du type cellulaire des cellules présentant le signal correspondant à la présence de la protéine AtSUC2. Néanmoins, ces cellules sont situées à plus de 3 couches de cellules de l'épiderme, écartant alors une présence dans le cortex (**Figure 48A**). Ces cellules sont aussi éloignées du xylème par une couche de 15 à 20 cellules (probablement les cellules du cambium/procambium), et sont donc situées en périphérie de la stèle (**Figure 48A**).

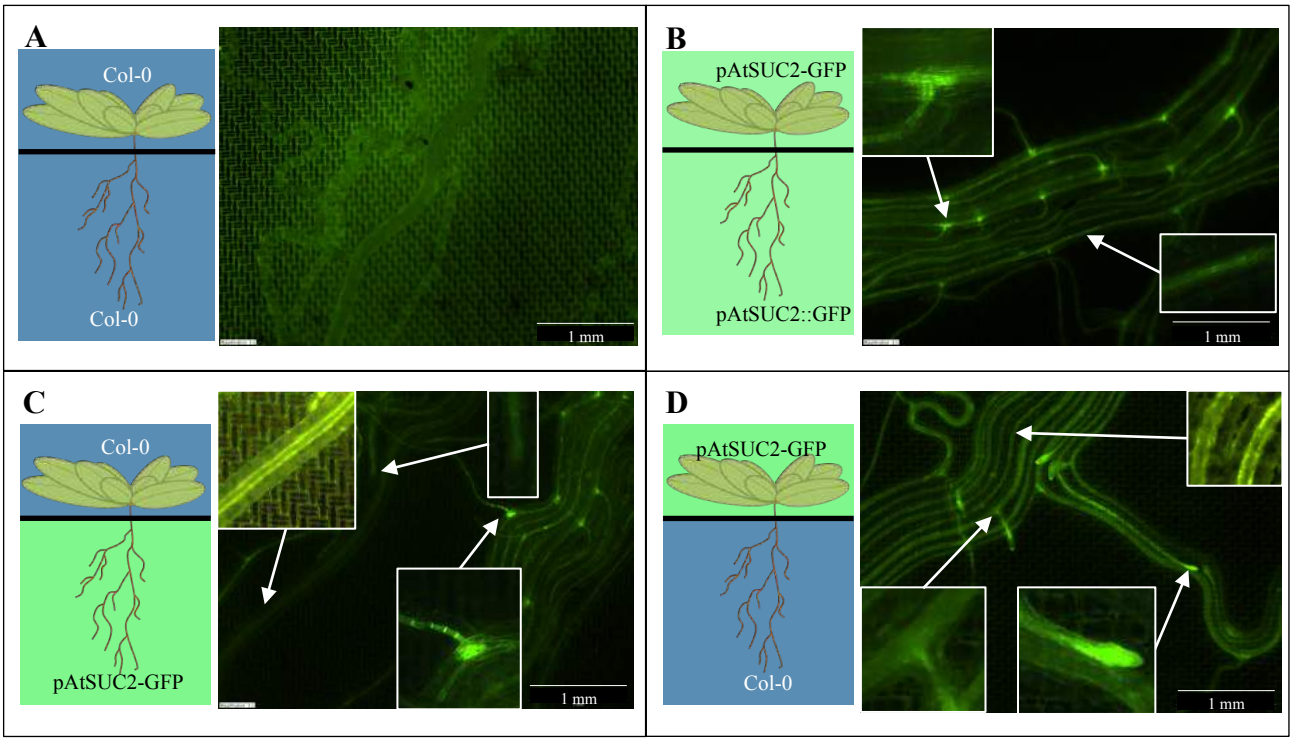


Figure 46 *Localisation de la GFP soluble exprimée sous le contrôle du promoteur d'AtSUC2 dans les racines de plantes greffées âgées de 30 jours cultivées en rhizobox en régime hydrique classique*.

La localisation a été déterminée en utilisant des plantes greffées (Col-0/Col-0 (A), pAtSUC2-GFP/pAtSUC2::GFP (B), Col-0/pAtSUC2-GFP (C) et pAtSUC2-GFP/Col-0 (D)). Les plantes pAtSUC2-GFP expriment la GFP soluble sous le contrôle du promoteur d'*AtSUC2 (*0,9 kb*)*. La GFP a été visualisée à l'aide d'un macroscope. Les flèches blanches indiquent les zones où la GFP est visible. **A**, Observation de la GFP soluble dans les racines de plantes Col-0/Col-0. **B**, Observation de la GFP soluble dans les racines de plantes pAtSUC2-GFP/pAtSUC2-GFP. **C**, Observation de la GFP soluble dans les racines de plantes Col-0/pAtSUC2-GFP. **D**, Observation de la GFP soluble dans les racines de plantes pAtSUC2-GFP/Col-0.

Discussion

Si la fonction et la localisation d'AtSUC2 sont très bien décrites dans la feuille d'*A. thaliana* (Ludewig and Flügge, 2013), son rôle est plus énigmatique dans la racine d'*A. thaliana*. Le gène *AtSUC2* est en effet exprimé de manière détectable dans la racine d'*A. thaliana* quel que soit le stade de développement (2ème SUC derrière *AtSUC1*) (**Chapitre III**). En réponse à la carence hydrique, l'expression d'*AtSUC2* est augmentée tandis que l'expression d'*AtSUC1* est sévèrement réduite, faisant du gène *AtSUC2* le plus exprimé des gènes *SUC* dans cette condition (**Chapitre IV**). A partir de ces données, nous avons souhaité étudier la fonction d'AtSUC2 dans la racine d'*A. thaliana* à l'aide de micro-greffes entre Col-0 et *suc2*F, génotype dont l'expression d'*AtSUC2* est partiellement restaurée au niveau foliaire mais absente au niveau racinaire (données non présentées).

1 La mutation KO d'*AtSUC2* confinée à la racine impacte son développement sans pour autant affecter celui de la rosette

Alors qu'il a été montré que la mutation KO d'*AtSUC2* (plante entière) inhibe considérablement le développement de la plante (Gottwald *et al.*, 2000a; Srivastava *et al.*, 2009), la mutation KO d'*AtSUC2* restreinte à la racine n'affecte pas le développement de la rosette Col-0 greffée (**Figure 39A**). En revanche, le développement de la racine n'exprimant pas *AtSUC2*, dont le développement est assuré par la présence d'une rosette Col-0 (Col-0/*suc2*F), est légèrement réduit par rapport à la racine sauvage (Col-0/Col-0) (**Figure 39B**). Bien que cette observation ne soit pas retrouvée au niveau de la biomasse totale (**Figure 39C**) en raison de la plus grande proportion de feuilles que de racines, cette légère réduction de la croissance est finalement perceptible *via* la légère diminution du ratio R/S (**Figure 39D**). Ainsi, malgré la présence d'une rosette Col-0 dont le développement est maintenu (par rapport à celle de Col-0/Col-0), l'absence d'*AtSUC2* dans la racine (Col-0/*suc2*F) suffit à réduire légèrement la croissance de celle-ci et par conséquent le ratio R/S (par rapport à Col-0/Col-0), un bon révélateur des relations source-puits. De ce fait, si la présence des transcrits d'*AtSUC2* dans la feuille d'*A. thaliana* est quasi vitale (Srivastava *et al.*, 2009), son absence dans la racine est certes préjudiciable, mais pas létale (**Figure 39**). De plus, la mutation KO d'*AtSUC2* confinée à la racine n'affecte pas le développement de la rosette Col-0 greffée, écartant un éventuel effet rétroactif de la mutation KO sur le développement de la rosette Col-0 greffée.

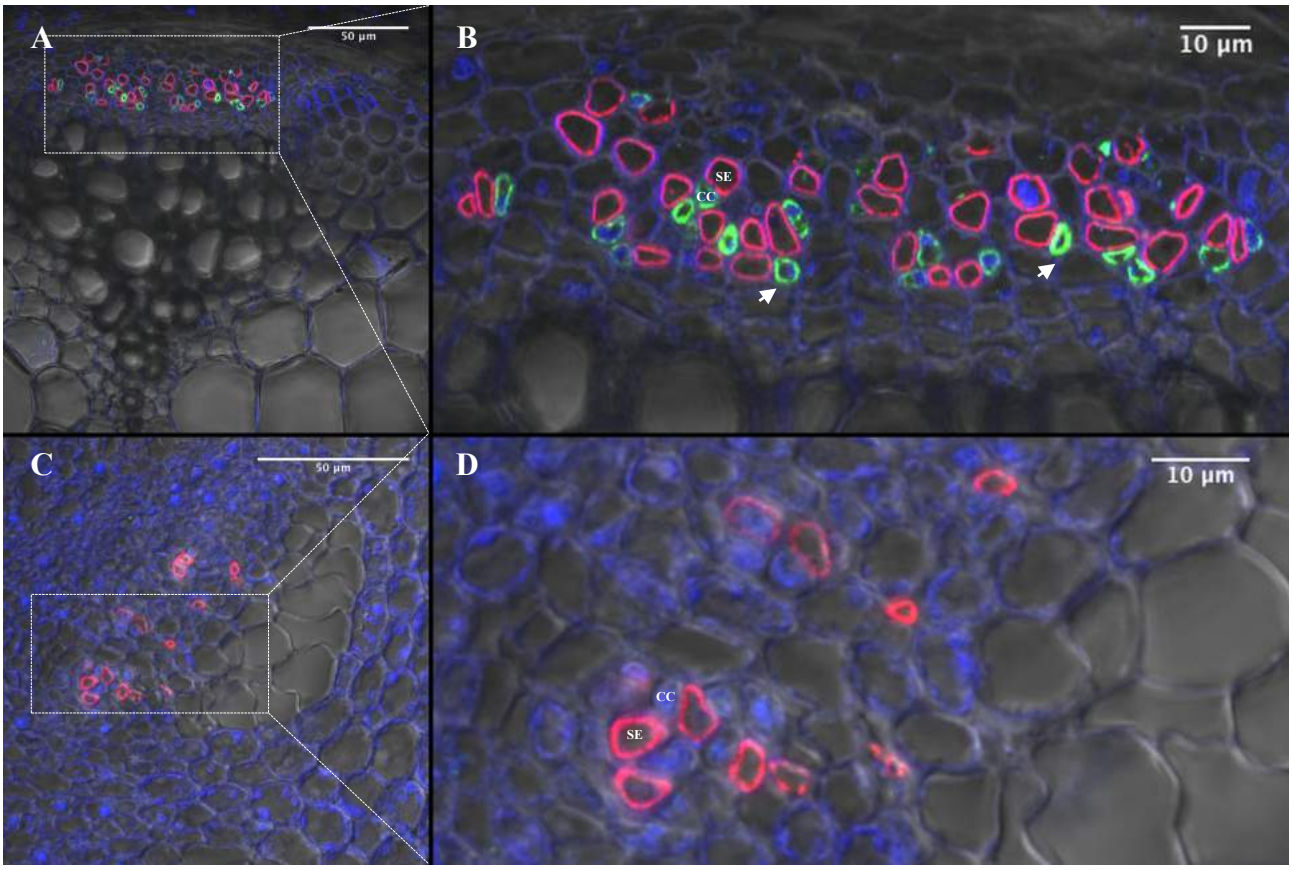


Figure 47 *Localisation de la protéine AtSUC2 dans la hampe florale de plantes Col-0 et suc2F âgées de 60 jours cultivées en pots en régime hydrique classique.*
La localisation a été effectuée sur des coupes transversales de hampes de plantes Col-0 (A et B) et *suc2*F (C et D) en utilisant l'anticorps primaire anti-AtSUC2 et l'anticorps secondaire Alexa 488 « chèvre anti-lapin » (vert). L'anticorps anti-RS6 couplé à l'anticorps secondaire Alexa 555 « chèvre anti-souris » a été utilisé pour marquer spécifiquement les cellules criblées (rouge). Les observations ont été effectuées au microscope confocal (FV1000, Olympus). Les flèches blanches indiquent les zones où la protéine AtSUC2 a été retrouvée. Les cellules criblées (SE) et les cellules compagnes (CC) sont indiquées par des lettres. **A**, Tissus conducteurs de la hampe de Col-0. **B**, Grossissement des tissus conducteurs de la hampe de Col-0. **C**, Tissus conducteurs de la hampe de *suc2*F. **D**, Grossissement des tissus conducteurs de la hampe de *suc2*F.

2 Quel rôle pour AtSUC2 dans la racine ?

Si la réduction de la croissance de la racine de Col-0/*suc2*F est bien observée, il reste néanmoins à en définir les causes. La croissance et le développement de la racine sont clairement dépendants de l'apport en carbone (ici le saccharose) depuis les organes sources. Plus en détail, la croissance et le développement des racines primaire et secondaires est sous le contrôle de la disponibilité en sucres chez *A. thaliana* (Freixes *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2011). Ainsi, le développement de la racine est soumis à deux composantes majeures, (1) l'export du carbone depuis les organes sources et (2) l'utilisation du carbone au niveau du puits, utilisation directement associée à l'accessibilité du carbone. Plus simplement, le développement des organes puits comme la racine est dépendant (1) de la capacité source et (2) de la force de puits (Bihmidine *et al.*, 2013; Lemoine *et al.*, 2013). Si la mutation d'*AtSUC2* confinée à la racine n'a pas affecté le contenu en sucres solubles de la rosette source Col-0 greffée par rapport à Col-0/Col-0 (**Figure 40**), il en est tout autrement pour la racine puits de Col-0/*suc2*F par rapport à Col-0/Col-0 (**Figure 41**). En effet, la seule présence de la mutation KO d'*AtSUC2* confinée à la racine de Col-0/*suc2*F suffit à produire une augmentation des teneurs en sucres solubles dans cette dernière par rapport à Col-0/Col-0 (**Figure 41**). L'accumulation de sucres solubles dans un compartiment donné peut être la conséquence (1) d'une augmentation de l'import, (2) d'une baisse de l'utilisation, ou (3) des deux. Il est ainsi tentant d'imaginer que l'accumulation de sucres solubles observée dans la racine de Col-0/*suc2*F (**Figure 41**) est la résultante d'une réduction de l'utilisation des sucres. En accord avec une telle hypothèse, AtSUC2 pourrait être impliqué dans un processus visant à rendre les sucres accessibles pour un compartiment donné et isolé symplastiquement d'un autre compartiment. Ainsi, l'absence d'AtSUC2 pourrait générer dans un compartiment donné une augmentation des sucres solubles et dans un autre compartiment un déficit de sucres solubles. Par conséquent le flux de carbone serait réduit localement, générant alors une diminution locale de la disponibilité en sucres qui, en accord avec Freixes *et al.* (2002), pourrait être associée à la réduction de croissance de la racine *suc2*F greffée à Col-0 (**Figure 39C**).

Pour autant, un tel effet n'est vraisemblable que si *AtSUC2* est exprimé dans les zones en forte croissance de la racine alors très demandeuses en squelettes carbonés. Nos résultats montrent que l'expression d'*AtSUC2* est retrouvée au niveau des pointes racinaires dans une zone assez large sous forme de deux brins (**Figure 42**) située à environ 850 µm de l'extrémité de la pointe racinaire (**Figure 44**). Il est fort probable que ces deux brins soient deux filets de

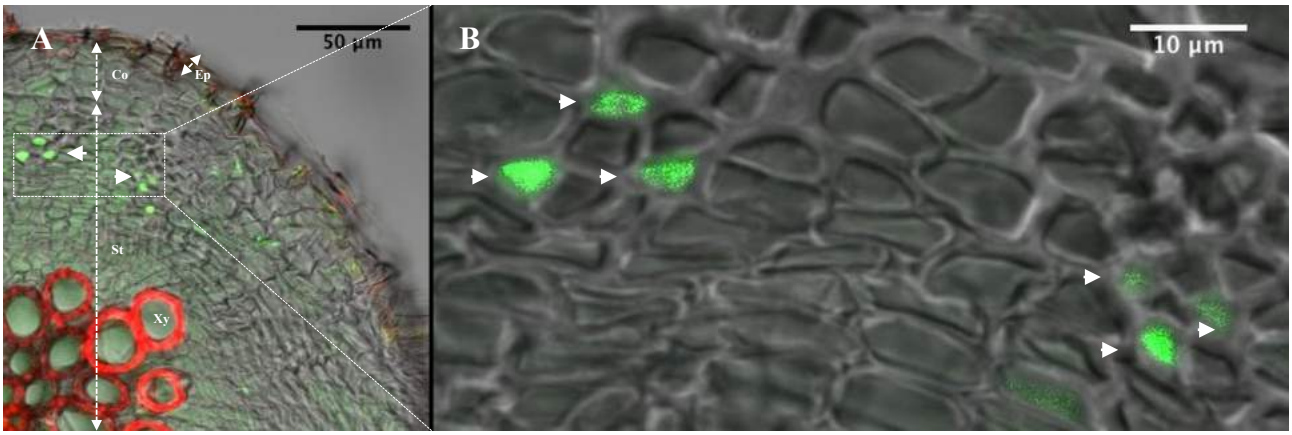


Figure 48 *Localisation de la protéine AtSUC2 dans la racine principale de plantes Col-0 âgées de 30 jours cultivées en rhizobox en régime hydrique classique.*
La localisation a été déterminée dans la partie supérieure de la racine principale à proximité du départ d'une racine latérale en utilisant l'anticorps primaire anti-AtSUC2 et l'anticorps secondaire Alexa 488 « goat anti-rabbit ». Les flèches blanches indiquent les zones où la protéine AtSUC2 a été retrouvée. Les observations ont été effectuées au microscope confocal (FV1000, Olympus). L'épiderme (Ep), le cortex (Co), la stèle (St) et le xylème (Xy) sont indiqués par des lettres. **A**, Vue du quart d'une coupe transversale de la partie supérieure de racinaire primaire. **B**, Grossissement sur les cellules spécifiquement marquées par l'anticorps anti-AtSUC2.

métaphloème situés dans la pointe racinaire. Stadler *et al.* (2005b) ont en effet démontré que le promoteur d'*AtSUC2,* dans la racine de plantules de l'écotype C24, était spécifique de la cellule compagne du métaphloème. Ainsi la probabilité qu'il en soit de même chez Col-0 est élevée, d'autant plus que l'expression de la protéine AtSUC2 a été spécifiquement retrouvée dans les cellules compagnes du phloème de transport de la hampe florale de Col-0 (**Figure 47**). De plus, dans la racine principale, AtSUC2 est aussi retrouvé dans de petites cellules entourant une même et unique cellule, suggérant une expression d'AtSUC2 restreinte aux cellules compagnes entourant les élément du tubes criblées du métaphloème de la racine. Stadler and Sauer (1996) ont rapporté une telle localisation dans la racine, cependant la localisation était non seulement effectuée sur de jeunes racines de l'écotype C24, mais surtout peu convaincante vu la qualité des clichés. Enfin, l'expression d'*AtSUC2* est retrouvée au niveau des pointes racinaires à environ 850 µm de l'extrémité de la pointe racinaire (**Figure 44**) et cette localisation coïncide très fortement avec la présence du métaphloème, étant donné que sa formation débute à environ 1000 µm de l'extrémité de la pointe racinaire (Dolan *et al.*, 1993; Oparka *et al.*, 1994). Verbelen *et al.* (2006) ont divisé la pointe racinaire en 4 zones distinctes, (1) le méristème situé à 200 µm de l'extrémité de la pointe racinaire, (2) la zone de transition, une zone de faible croissance localisée de 200 µm à 520 µm de la pointe racinaire, (3) la zone d'élongation, une zone de forte croissance cellulaire située de 520 à 800 µm de la pointe racinaire et (4) la zone de terminaison de la croissance où la croissance est plus faible qu'en (3) localisée de 850 à 1500 de la pointe racinaire. Si l'on s'en réfère donc à l'étude de Verbelen *et al.* (2006), *AtSUC2* serait particulièrement exprimé dans la zone de terminaison de croissance. Cette zone n'est pas une zone de forte croissance, l'élongation cellulaire y étant mineure mais néanmoins présente (Verbelen *et al.*, 2006). De ce fait, le plus faible développement de la racine de Col-0/*suc2*F pourrait être dû au rôle putatif d'AtSUC2 dans cette zone. D'ailleurs, à partir de la localisation racinaire d'AtSUC2, Truernit and Sauer (1995b) ont supposé qu'il pouvait être impliqué dans le transport du saccharose depuis le phloème vers l'apoplaste étant donné que le phloème de transport est presque totalement isolé symplastiquement (Kempers *et al.*, 1998; Wright and Oparka, 1997).

Un tel rôle est très plausible, étant donné que la répression de l'expression de *StSUT1*, l'homologue d'*AtSUC2* exprimé dans le phloème des tubercules de pomme de terre en développement, réduit l'accumulation de biomasse du tubercule, suggérant un rôle pour StSUT1 dans le déchargement des sucres (Kühn *et al.*, 2003). De plus, il a été démontré que *ZmSUT1,* l'homologue d'*AtSUC2* dans le maïs*,* peut être impliqué dans le déchargement du

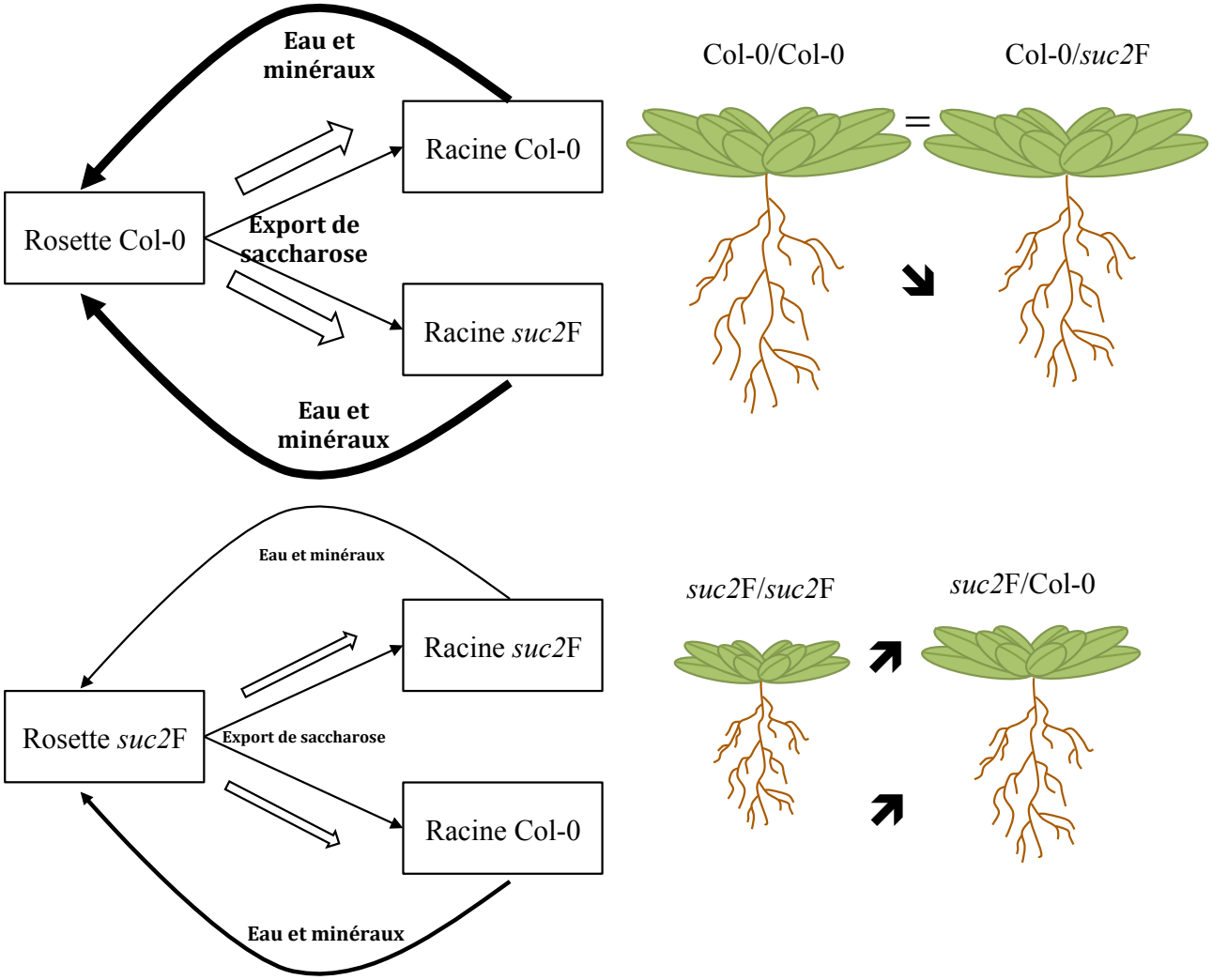


Figure 49 *Modèle hypothétique quant à l'effet de la présence ou de l'absence d'AtSUC2 dans la racine sur le développement de plante.*
La présence de la mutation KO d'*AtSUC2* confinée à la racine greffée à la rosette Col-0 provoque une réduction de la croissance de la racine mais pas de la rosette Col-0 (par rapport à Col-0/Col-0).
La présence d'*AtSUC2* confinée à la racine greffée à la rosette *suc2*F provoque une amélioration du développement racinaire et de la rosette (par rapport à *suc2*F/*suc2*F). On suppose que dans un contexte où l'export de saccharose vers la racine est altéré, AtSUC2 aide à optimiser la croissance racinaire. En retour le plus grand système racinaire permet une meilleure croissance de la rosette probablement en alimentant la rosette en eau et minéraux.

saccharose dans les organes puits (Carpaneto *et al.*, 2005). L'activité de ZmSUT1 est en effet réversible. En fonction de son environnement (différence de potentiel transmembranaire, concentration en H^+ et saccharose de part et d'autre de la membrane), le co-transport du saccharose et des protons peut s'effectuer depuis l'apoplaste vers la cellule compagne (chargement du phloème) mais il peut aussi se faire depuis la cellule compagne vers l'apoplaste (déchargement du phloème). Dans le cas du chargement du phloème ou de la récupération du saccharose le long du phloème de transport ($[H^+]_{apoplaste} >> [H^+]_{cytosol}$; $[saccharose]_{apoplaste} < [saccharose]_{cytosol}$; Différence de potentiel transmembranaire ++) l'environnement est tel que c'est le flux de protons qui conduit le saccharose dans le phloème. En revanche, dans le cas du déchargement du phloème au niveau du puits ($[H^+]_{apoplaste} > [H^+]_{cytosol}$; $[saccharose]_{apoplaste} << [saccharose]_{cytosol}$; Différence de potentiel transmembranaire +), les conditions sont telles que ce serait le flux de saccharose qui conduirait les protons à travers ZmSUT1 (Carpaneto *et al.*, 2005; Geiger, 2011). Carpaneto *et al.* (2005) ont ainsi montré que le transport du saccharose à travers ZmSUT1 pouvait avoir lieu depuis la cellule vers le milieu extérieur contre le gradient de pH. Cette activité de transport est optimale quand la concentration cytosolique en saccharose est importante alors que la concentration apoplastique est faible. Plus la concentration apoplastique est faible, plus la concentration cytosolique requise pour assurer le transport est réduite (Carpaneto *et al.*, 2005). L'environnement existant au niveau des cellules du phloème dans les organes puits est compatible avec l'activité de transport du saccharose vers l'apoplaste (Geiger, 2011), d'autant qu'il est admis que le saccharose une fois « déchargé », peut être clivé par des invertases (Ruan, 2014), contribuant ainsi au maintien d'une concentration apoplastique en saccharose relativement faible. Toutefois, à la vue de l'environnement dans lequel se déroulent le « mode source » et le « mode puits » de ZmSUT1, les caractéristiques de transport de chacun de ces modes sont totalement différentes : quand le Km pour le « mode source » est de l'ordre de 2 mM, celui pour le « mode puits » est situé autour de 300 mM (Carpaneto *et al.*, 2005).

Srivastava *et al.* (2008) ont observé plusieurs éléments laissant supposer qu'AtSUC2 pourrait être responsable du re-chargement du saccharose relâché le long du phloème de transport. Gould *et al.* (2012) ont confirmé cette hypothèse en montrant que le mutant *suc2* présentait une augmentation du relargage de saccharose le long du phloème de transport, générant un allongement du temps de transit de la sève phloémienne. Ce phénomène pourrait aussi expliquer la réduction de la croissance de la racine privée d'*AtSUC2* (**Figure 39B**)

puisque que la croissance racinaire est liée à la vitesse du flux de sève phloémienne (Boyer *et al.*, 2010; Pritchard *et al.*, 2000; Wardlaw, 1969).

Ainsi les éléments de discussion apportés semblent souligner deux grandes fonctions pour AtSUC2 dans la racine, le rechargement du phloème lors du transit de la sève et le déchargement du phloème au niveau de la zone de terminaison de croissance. De ce fait, la mutation KO d'*AtSUC2* confinée à la racine (Col-0/*suc2*F) aboutit à une réduction de la croissance (en masse) de cette dernière par rapport à Col-0/Col-0 (**Figure 39B**), laissant supposer un rôle non négligeable dans la croissance de la racine. D'ailleurs cette hypothèse est d'autant plus vraisemblable que l'expression endogène d'*AtSUC2* limitée à la racine du mutant *suc2*F (*suc2F*/Col-0) permet un meilleur développement de la racine par rapport à *suc2*F/*suc2*F (**Figure 39B**) confirmant l'importance de la présence d'*AtSUC2* dans la racine. Néanmoins, le développement de la racine *suc2*F/Col-0 (présence d'*AtSUC2* dans la racine) reste plus faible que celui de la racine de Col-0/*suc2*F (absence d'*AtSUC2* dans la racine) (**Figure 39B**), confirmant le rôle prédominant de la rosette sur le développement de la racine. Si la présence d'*AtSUC2* est préférable dans la racine pour assurer le bon développement de cette dernière, c'est principalement la capacité exportatrice de la feuille qui gouverne son bon développement. Comme cela a pu être montré pour la racine Col-0 stressée (**Chapitre IV**), la théorie du « poussoir » (« push hypothesis ») semble aussi gouverner les relations source-puits dans ce cas (Tm, Rhizobox, Micro-greffe) (Brauner *et al.*, 2014; Farrar and Jones, 2000). En accord avec une telle théorie, la rosette gouverne le développement de la racine en fonction de sa capacité source, les transporteurs de sucres comme AtSUC2 n'étant présents dans la racine que pour faciliter le drainage du flux de carbone.

Toutefois, un éventuel effet de la racine sur le développement de la rosette ne peut être exclu puisque l'expression d'*AtSUC2* limitée à la racine suffit à améliorer la croissance de la rosette greffée *suc2*F (par rapport à *suc2*F/ *suc2*F) (**Figure 39A**) dont le développement reste cependant inférieur aux plantes ayant une rosette Col-0 (Col-0/Col-0, Col-0/*suc2*F) (**Figure 39A**). En revanche, la présence d'*AtSUC2* dans la racine ne suffit pas à empêcher l'accumulation de sucres dans la rosette *suc2*F mais contribue cependant à l'augmentation des teneurs en saccharose de la racine par rapport à *suc2*F/*suc2*F (**Figure 40**). Ainsi la présence d'AtSUC2 au niveau de la racine serait nécessaire dans un contexte physiologique où le flux de carbone depuis la feuille est altéré. On comprend, dans un tel contexte, la nécessité d'un bon drainage du flux de carbone afin d'optimiser son utilisation pour la croissance racinaire. Optimiser la croissance racinaire permettrait en retour d'améliorer la croissance foliaire, la

racine apportant l'eau et les minéraux nécessaires à la croissance de la rosette (**Figure 49**). Si l'absence d'*AtSUC2* dans la racine n'est que peu préjudiciable pour le développement de la rosette Col-0, sa présence est fortement requise dans la racine pour optimiser la croissance non seulement de la racine mais aussi de la rosette *suc2*F greffée. Deux scénarios semblent donc se dégager quant à l'importance d'AtSUC2 dans la racine. Dans le cas où le flux de saccharose exporté, depuis la rosette vers la racine, n'est pas altéré (rosette Col-0), le rôle d'AtSUC2 dans la racine est minime, son extinction conduisant seulement à une réduction de la croissance racinaire non suffisante pour impacter la biomasse totale de la plante (**Figure 39 et 49**). En revanche, dans le cas où le flux de saccharose exporté depuis la rosette vers la racine, est altéré (rosette *suc2*F), la présence d'AtSUC2 dans la racine est fortement requise car, en améliorant le développement racinaire, elle améliore en retour la croissance de la rosette (par rapport *suc2*/*suc2*F) (**Figure 39 et 49**). Néanmoins, les plantes *suc2*F conservent leur phénotype, à savoir une accumulation de sucres dans la rosette et une plus faible croissance, soulignant le rôle dominant de la rosette dans le développement de la plante (rosette + racine).

3 AtSUC2 est particulièrement exprimé au niveau de la zone de départ des racines et dans les pointes racinaires

En accord avec la littérature (Stadler and Sauer, 1996; Stadler *et al.*, 2005b), nos résultats indiquent que l'expression d'*AtSUC2* semble localisée dans le phloème de la racine d'*A. thaliana* (**Figure 45**). La localisation probable de la protéine AtSUC2 dans les cellules compagnes du phloème (**Figure 48**) confirme la localisation de l'expression génique d'*AtSUC2* dans la racine.

L'expression d'*AtSUC2* au niveau des connexions entre deux racines n'est pas un artefact dû à la diffusion du signal GUS étant donné que la même localisation a été observée dans les racines des plantes pSUC2-GFP (**Figure 46B**). Comme ces plantes expriment la GFP soluble (27 kDa) sous le contrôle du promoteur pSUC2, nous avons dû vérifier que le signal observé au niveau des zones de départ des racines était propre à la racine, à l'aide de greffes avec Col-0. Si ce même signal est bien retrouvé au niveau des zones de départ des racines des plantes Col-0/pSUC2-GFP (**Figure 46C**), il ne l'est pas pour les plantes pSUC2-GFP/Col-0 (**Figure 46C**), confirmant que l'accumulation locale de GFP au niveau des zones de départ des racines est propre à l'expression de la GFP sous le contrôle du promoteur d'*AtSUC2* dans la racine. En revanche, l'utilisation des plantes Col-0/pSUC2-GFP ne permet pas de confirmer

l'expression d'*AtSUC2* retrouvée dans le phloème entre les jonctions des racines adultes des plantes pSUC2-GUS (**Figure 45C**) étant donné que la GFP synthétisée est mobile dans le phloème. Quoiqu'il en soit, il paraît clair qu'*AtSUC2* est principalement exprimé (**Figure 47 et 48**) (1) au niveau des zones de départ des racines (**Figure 42, 43, 45 et 46**) (2) au niveau des zones de terminaison de croissance de la racine (**Figure 42, 43**) et (3) de manière plus discrète de part et d'autre de la racine entre les zones de départ des racines (**Figure 45C**). Quant au type cellulaire, il est fortement probable que l'expression d'*AtSUC2* soit localisée dans les cellules compagnes étant donné que l'expression d'AtSUC2 est spécifique des cellules compagnes (Stadler *et al.*, 2005b).

L'expression d'*AtSUC2* a déjà été répertoriée sur les plantules de l'écotype C24 au niveau du phloème des pointes racinaires (Stadler *et al.*, 2005b; Truernit and Sauer, 1995b). Les stades de développement utilisés lors de ces expérimentations ainsi que le système de culture (*CIV*) expliquent probablement pourquoi l'expression d'*AtSUC2,* au niveau des connexions racine/racine, n'ait pas été observée dans ces études.

Si le rôle d'AtSUC2 au niveau des pointes racinaires a déjà été mentionné précédemment dans ce chapitre, son rôle au niveau des zones de départ des racines n'a pas encore été évoqué. L'expression d'*AtSUC2* a donc été localisée au niveau des zones de départ des racines à l'aide de plantes pSUC2-GUS et pSUC2-GFP (**Figure 42, 43, 45 et 46**). Il est fort probable que l'expression d'*AtSUC2* soit localisée dans les cellules compagnes situées au niveau de ces zones puisque l'expression d'*AtSUC2* est spécifique des cellules compagnes (Stadler and Sauer, 1996; Stadler *et al.*, 2005b) (**Figure 47 et 48**), même si la localisation GUS semble quelque peu différente (**Figure 45**). Cependant, il est courant que le produit formé par réaction entre le X-Glu et la β-glucuronidase diffuse au sein de l'échantillon. De plus, la localisation obtenue à l'aide de plantes pSUC2-GFP semble montrer une accumulation de GFP à l'intérieur ou à proximité des tissus conducteurs situés au niveau des zones de départ des racines (**Figure 46**). Enfin l'expression d'*AtSUC2* est de plus retrouvée entres les zones de départ des racines sous la forme de fines bandes suggérant une localisation phloémienne, soit encore un indice en faveur d'une localisation phloémienne pour *AtSUC2* dans la racine.

L'expression d'*AtSUC2* au niveau des zones de départ des racines n'était pas du tout attendue et reste surprenante. Oparka *et al.* (1995) ont démontré l'établissement rapide des connexions intracellulaires entre le phloème de la racine primaire et les cellules du priomordium latéral chez *A. thaliana*. Cependant, ils ont constaté que dans 20% des cas les

primordia nouvellement développés ne présentaient pas de connexions intracellulaires avec le phloème primaire. De ce fait, il est alors tentant d'envisager qu'AtSUC2, par sa localisation probable au niveau du phloème des zones de départ des racines, serait impliqué dans le transfert des sucres depuis la racine principale vers la racine latérale par une voie apoplastique. Il faut savoir qu'une partie du saccharose transporté est relâchée dans l'apoplaste le long du phloème de transport qui est isolé symplastiquement (Gould *et al.*, 2012; Kempers *et al.*, 1998; Oparka *et al.*, 1994). Il est admis qu'AtSUC2 pourrait servir à recharger le saccharose perdu le long du phloème de transport, cependant il n'a jamais été précisé si le saccharose était rechargé dans le phloème d'où il était issu ou s'il était rechargé dans un autre conduit de phloème, par exemple celui d'une racine latérale. Seulement une minorité de racines latérales serait concernée par ce phénomène (20% selon d'Oparka *et al.* (1995)), ce qui expliquerait pourquoi la mutation KO d'*AtSUC2* restreinte au niveau racinaire ne réduit que légèrement le développement racinaire en présence d'une rosette Col-0 (**Figure 39B**).

Enfin, en réponse à la carence hydrique, la localisation de l'expression d'*AtSUC2* est similaire à celle observée en condition témoin, même si la proportion de racines marquées semble plus importante, particulièrement au niveau des pointes racinaires (**Figure 43**). Cette observation s'accorde parfaitement avec l'augmentation de l'expression d'*AtSUC2* relevée dans la racine de Col-0 en réponse à la carence hydrique (**Chapitre IV**). En accord avec un éventuel rôle dans le déchargement des sucres au niveau des pointes racinaires, l'augmentation de l'expression d'*AtSUC2* pourrait être associée à un accroissement du déchargement des sucres étant donné que l'export en carbone depuis la feuille vers la racine est augmentée (**Chapitre IV**). Les sucres seraient alors déchargés puis compartimentés en dehors du phloème. Selon la théorie du flux de masse (Münch, 1930), ceci permettrait de préserver le flux de sève phloémienne en maintenant le gradient de pression de turgescence entre feuilles et racines nécessaire au transport de la sève élaborée mais aussi de la sève brute.

Bilan

AtSUC2 est un des gènes de type SUC (2ème SUC après *AtSUC1*) les plus exprimés dans la racine de Col-0. En réponse à la carence hydrique, son expression est augmentée dans la racine faisant de lui le transporteur de type SUC le plus exprimé dans la racine stressée. L'étude de la fonction d'AtSUC2 dans la racine a été effectuée à l'aide de plantes *suc2*F. Ces plantes *suc2*F sont des mutants KO *suc2* dont l'expression d'AtSUC2 a été partiellement restaurée au niveau foliaire mais reste absente au niveau racinaire. Néanmoins, les plantes *suc2*F présentent toujours un retard de développement et une accumulation de sucres dans les feuilles. C'est pourquoi l'étude de la fonction d'AtSUC2 dans la racine a été effectuée à l'aide de plantes greffées entre Col-0 et *suc2*F.

Nos résultats tendent à montrer qu'AtSUC2 serait associé au développement de la racine. De plus, la présence d'AtSUC2 dans la racine serait d'autant plus requise pour la croissance de la racine quand le flux de carbone exporté vers la racine est diminué (rosette *suc2*F). Toutefois, si la présence de l'expression d'*AtSUC2* est vitale dans les feuilles d'*A. thaliana*, son absence dans les racines est certes préjudiciable mais pas létale, confirmant le rôle prédominant de la rosette sur le développement racinaire.

L'expression d'*AtSUC2* est non seulement particulièrement retrouvée au niveau des pointes racinaires et des zones de départ des racines mais aussi, de façon discrète, dans la racine entre ces mêmes zones. *AtSUC2* est très probablement exprimé dans les cellules compagnes du phloème. En accord avec sa localisation, la présence d'AtSUC2 pourrait être liée au déchargement du phloème au niveau des pointes racinaires et ce particulièrement dans un contexte de carence hydrique. *AtSUC2* serait aussi particulièrement exprimé au niveau du phloème des zones de départ des racines laissant supposer un rôle putatif dans le transfert apoplastique du saccharose depuis le phloème

VIII. Chapitre « *AtSWEET11 et 12* »

Résultats

1 Etude de *sweet11/sweet12* à l'aide de plantes greffées

Les expérimentations de carence hydrique menées au cours de cette thèse sur des plantes Col-0 cultivées en rhizobox ont révélé que l'expression des gènes *AtSWEET11* et *AtSWEET12* était augmentée dans les feuilles et racines des plantes stressées par rapport aux plantes témoins. La fonction et la localisation d'*AtSWEET11* et *AtSWEET12* dans la feuille d'*A. thaliana* ont récemment été décrites (Chen *et al.*, 2012). En revanche, le rôle et la localisation de ces deux transporteurs dans la racine d'*A. thaliana* n'ont pas encore à l'heure actuelle fait l'objet de publications. Cependant, plusieurs auteurs (Chen, 2013; Ludewig and Flügge, 2013) ont émis l'hypothèse qu'ils pourraient éventuellement contribuer à la diffusion du saccharose le long du phloème de transport afin d'alimenter les cellules situées à proximité de ce dernier. Les simples mutants KO *sweet11* et *sweet12* ne présentent pas de phénotype morphologique particulier (Chen *et al.*, 2012). En revanche, le double mutant *sweet11/sweet12* (*sweet11-12*) présente un ralentissement de la croissance foliaire et racinaire ainsi qu'une accumulation de sucres solubles et d'amidon au niveau foliaire (Chen *et al.*, 2012). Le mutant *sweet11-12* présente, au niveau des feuilles, une forte perturbation dans l'acheminement du saccharose depuis les cellules du parenchyme phloémien jusqu'à l'apoplaste, étape préliminaire et nécessaire au chargement du saccharose dans le phloème. De ce fait, le transport des sucres vers les organes puits comme la racine est réduit, générant alors un ralentissement de la croissance racinaire. Si le rôle d'*AtSWEET11* et d'*AtSWEET12* n'a pu être encore déterminé dans la racine, c'est parce que la mutation KO de ces deux transporteurs génère un ralentissement de la croissance foliaire et racinaire. Dans un tel contexte, il est impossible de discerner l'effet de la mutation au niveau racinaire tant la mutation au niveau foliaire conditionne le développement racinaire. Afin de déterminer l'effet de la mutation d'*AtSWEET11* et d'A*tSWEET12* au niveau racinaire, et ce indépendamment de l'effet de la double mutation au niveau foliaire, des greffes ont été effectuées entre Col-0 et le double mutant *sweet11-12* (Rosette/Racine : Col-0/Col-0, *sweet11-12/sweet11-12*, Col-0/*sweet11-12*, *sweet11-12*/Col-0). Les graines des différentes plantes utilisées dans ce chapitre nous ont été généreusement données par Sylvie Dinant et Catherine Bellini de l'INRA de Versailles.

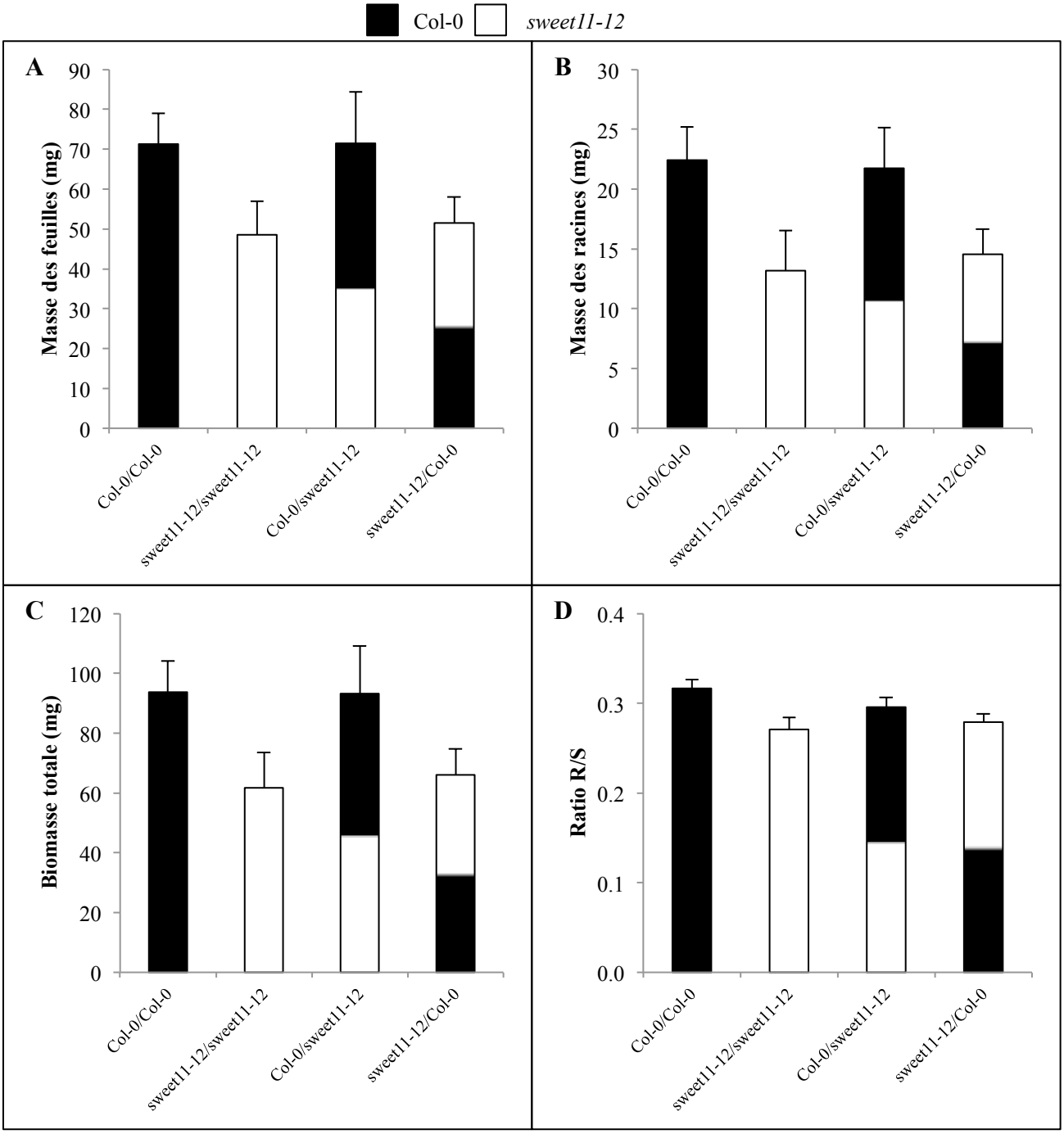


Figure 50 *Biomasses fraiches et ratio R/S de plantes greffées (Col-0 ; sweet11-12) cultivées en rhizobox en régime hydrique classique pendant 21 jours après la prise de la greffe.*

A, Masse fraiche des feuilles des plantes greffées. **B**, Masse fraiche des racines des plantes greffées. **C**, Masse fraiche totale des plantes greffées. **D**, Ratio R/S des plantes greffées. Les valeurs présentées correspondent aux moyennes (± ES) de 4 à 9 plantes.

Le génotype des plantes greffées est indiqué de la façon suivante : Rosette/Racine. Les couleurs supérieures et inférieures d'une barre correspondent respectivement au fond génétique de la rosette et de la racine (Noir, Col-0 ; Blanc, *sweet11-12*).

1.1 Etude la biomasse

Les plantes greffées âgées d'une dizaine de jours (5 jours de culture en boîte de Pétri + 5 jours pour la prise de la greffe) ont été cultivées en rhizobox en régime hydrique classique pendant 21 jours après la prise de la greffe. Les plantes ont été récoltées au milieu de la photopériode soit après 5h d'éclairement puis la biomasse fraîche a été mesurée pour chacun des organes. La biomasse des plantes à la récolte permet d'évaluer le développement des plantes greffées.

Aucune différence n'est observée entre la masse des feuilles Col-0/Col-0 (71,3 mg) et celle de Col-0/*sweet11-12* (71,5 mg). De même, la masse des feuilles des plantes ayant une rosette *sweet11-12* est équivalente (*sweet11-12/ sweet11-12,* 48,5 mg, *sweet11-12*/Col-0, 51,5 mg) (**Figure 50A**). En revanche, la masse des feuilles des plantes ayant une rosette Col-0 est supérieure à celle des plantes ayant une rosette *sweet11-12* (**Figure 50A**).

Les différences observées au niveau foliaire entre les plantes ayant une rosette Col-0 et *sweet11-12* se confirment au niveau racinaire. En effet, les plantes ayant une rosette Col-0 (Col-0/Col-0, 22,4 mg ; Col-0/*sweet-11-12,* 21,7 mg) présentent une masse racinaire plus importante que celles ayant une rosette *sweet11-12* (*sweet11-12*/*swee11-12*, 13,2 mg, *sweet-11*-12/Col-0, 14,6 mg) (**Figure 50B**). Cependant, aucune différence de masse racinaire n'est observée au sein des plantes ayant la même rosette, que ce soit pour les rosettes de génotypes Col-0 ou *sweet11-12* (**Figure 50B**).

Par conséquent, la masse totale des plantes ayant une rosette Col-0 ne présente pas de différence entre elles (Col-0/Col-0, 93,7 mg ; Col-0/*sweet-11-12,* 93,2 mg), et la même tendance est observée pour les plantes ayant une rosette *sweet11-12*/*sweet11-12* (*sweet11-12*/*swee11-12*, 61,7 mg, *sweet-11*-12/Col-0, 66,1 mg) (**Figure 50C**). Enfin, les plantes dont la rosette est de génotype Col-0 ont systématiquement accumulé plus de biomasse totale que celles dont la rosette est de génotype *sweet11-12* (**Figure 50C**).

Quant au ratio R/S, deux groupes se distinguent : le groupe des plantes ayant une rosette Col-0 (Col-0/Col-0, 0,317 ; Col-0/*sweet11-12*, 0,296) et le groupe des plantes ayant une rosette *sweet11-12* (*sweet11-12*/*sweet11-12*, 0,271 ; *sweet11-12*/Col-0, 0,279) (**Figure 50D**).

1.2 Etude des différentes greffes sur les teneurs en sucres

Les feuilles et racines de chacune des greffes ont été récoltées, séparées puis pesées et les extractions de sucres ont ensuite été effectuées sur feuille et racine individuelle.

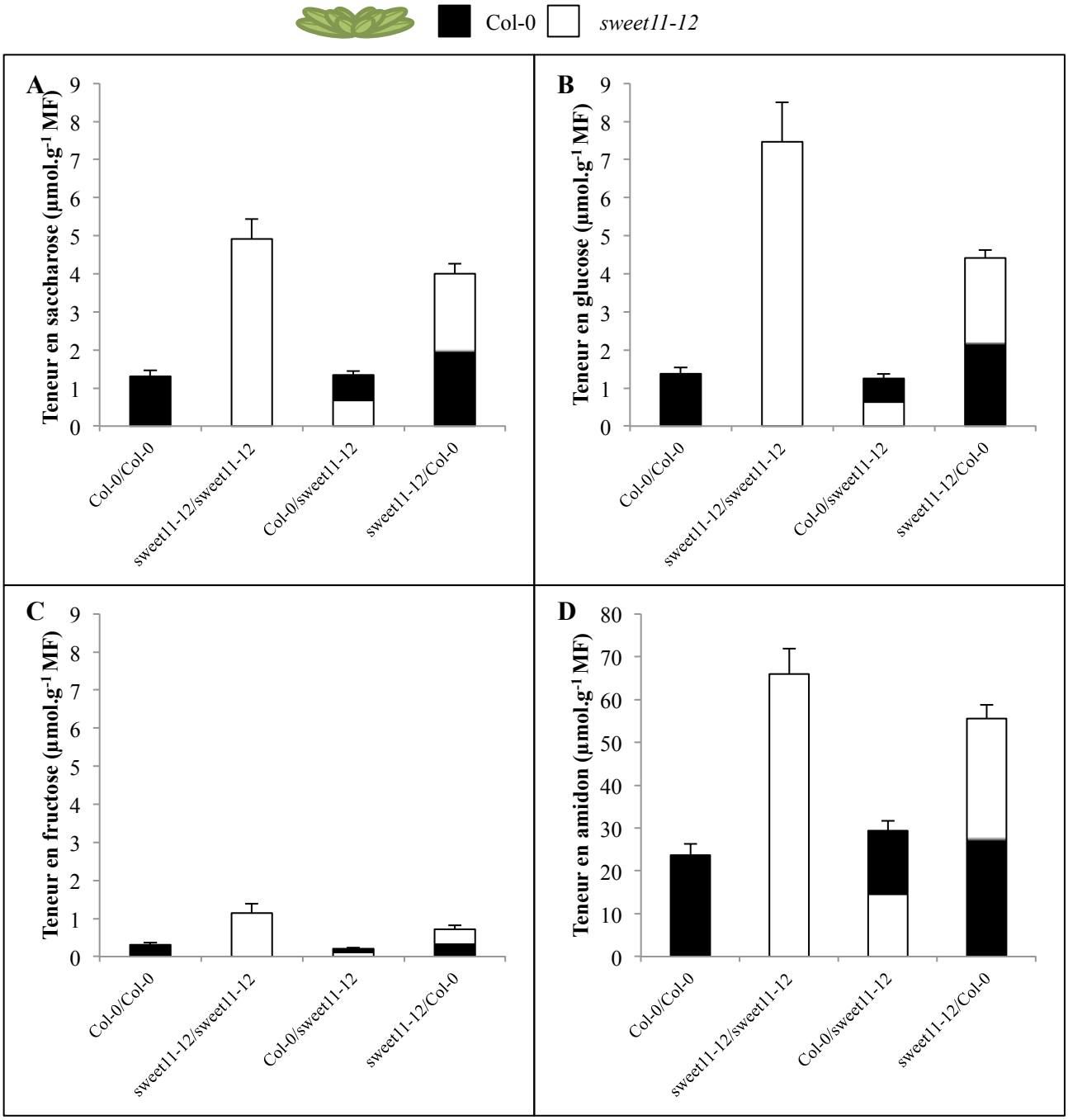


Figure 51 *Teneurs en sucres solubles et amidon des feuilles de plantes greffées (Col-0 ; sweet11-12) cultivées en rhizobox en régime hydrique classique pendant 21 jours après la prise de la greffe.*

A, Teneur en saccharose des feuilles de plantes greffées. **B**, Teneur en glucose des feuilles de plantes greffées. **C**, Teneur en fructose des feuilles de plantes greffées. **D**, Teneur en amidon des feuilles de plantes greffées. Les extractions ont été effectuées sur plante individuelle et les données sont exprimées en µmol.g^{-1} de poids frais. Les teneurs en amidon sont données en équivalent glucose. Les valeurs présentées correspondent aux moyennes (± ES) de 4 à 8 plantes.

Le génotype des plantes greffées est indiqué de la façon suivante : Rosette/Racine. Les couleurs supérieures et inférieures d'une barre correspondent respectivement au fond génétique de la rosette et de la racine (Noir, Col-0 ; Blanc, *sweet11-12*)

1.2.1 Teneurs en sucres solubles et amidon dans les feuilles

Les teneurs en saccharose des feuilles des plantes ayant une rosette *sweet11-12* (*sweet11-12*/*sweet11-12,* 4,91 µmol.g^{-1} MF ; *sweet11-12*/Col-0, 4,00 µmol.g^{-1} MF) sont environ 3 fois supérieures à celles des plantes ayant une rosette Col-0 (Col-0/Col-0, 1,31 µmol.g^{-1} MF ; Col-0/*sweet-11-12*, 1,34 µmol.g^{-1} MF) (**Figure 51A**). Aucune différence au niveau des teneurs en saccharose foliaire n'est observée au sein des plantes ayant le même génotype de rosette (**Figure 51A**).

Les plantes ayant une rosette *sweet11-12* accumulent des quantités de glucose (*sweet11-12*/*sweet11-12,* 7,47 µmol.g^{-1} MF ; *sweet11-12*/Col-0, 4,42 µmol.g^{-1} MF) bien plus importantes que les plantes présentant une rosette Col-0 (Col-0/Col-0, 1,37 µmol.g^{-1} MF ; Col-0/*sweet-11-12*, 1,25 µmol.g^{-1} MF) (**Figure 51B**). De plus, les feuilles des plantes *sweet11-12*/*sweet11-12* présentent une teneur en glucose plus élevée que celle relevée dans les feuilles *sweet11-12*/Col-0. Quant à Col-0/Col-0 et Col-0/*sweet-11-12*, leur teneur en glucose foliaire est équivalente (**Figure 51B**).

Parmi les trois sucres solubles étudiés, le fructose est le sucre le moins présent indépendamment du type de greffe. Les teneurs en fructose sont équivalentes mais néanmoins très faibles dans les feuilles des plantes ayant une rosette Col-0 (Col-0/Col-0, 0,31 µmol.g^{-1} MF, Col-0/*sweet11-12*, 0,21 µmol.g^{-1} MF) (**Figure 51C**). En revanche, elles sont plus élevées dans les plantes dont la rosette est de génotype *sweet11-12* (*sweet11-12*/*sweet11-12,* 1,14 µmol.g^{-1} MF ; *sweet11-12*/Col-0, 0,72 µmol.g^{-1} MF) (**Figure 51C**).

Quant à l'amidon, les plantes dont la rosette est de génotype *sweet11-12* en accumulent environ deux fois plus (*sweet11-12*/*sweet11-12*, 66,0 µmol.g^{-1} MF ; *sweet11-12*/Col-0, 55,6 µmol.g^{-1} MF) que les plantes dont la rosette est de génotype Col-0 (Col-0/Col-0, 23,7 µmol.g^{-1} MF, Col-0/*sweet11-12*, 29,4 µmol.g^{-1} MF) (**Figure 51D**). Aucune différence au niveau des teneurs en amidon foliaire ne semble visible au sein des plantes ayant la même rosette, que ce soit pour les génotypes Col-0 ou *sweet11-12*.

En résumé, l'analyse des teneurs en sucres solubles et amidon dans les feuilles des différentes plantes greffées a permis de distinguer deux groupes : un premier groupe rassemblant les plantes ayant une rosette Col-0 (Col-0/Col-0, Col-0/*sweet11-12*) et un second groupe comprenant les plantes ayant une rosette *sweet11-12* (*sweet11-12*/*sweet11-12, sweet11-12*/Col-0). Les plantes du second groupe ont systémiquement des teneurs en saccharose, glucose, fructose et amidon supérieures à celle du premier groupe.

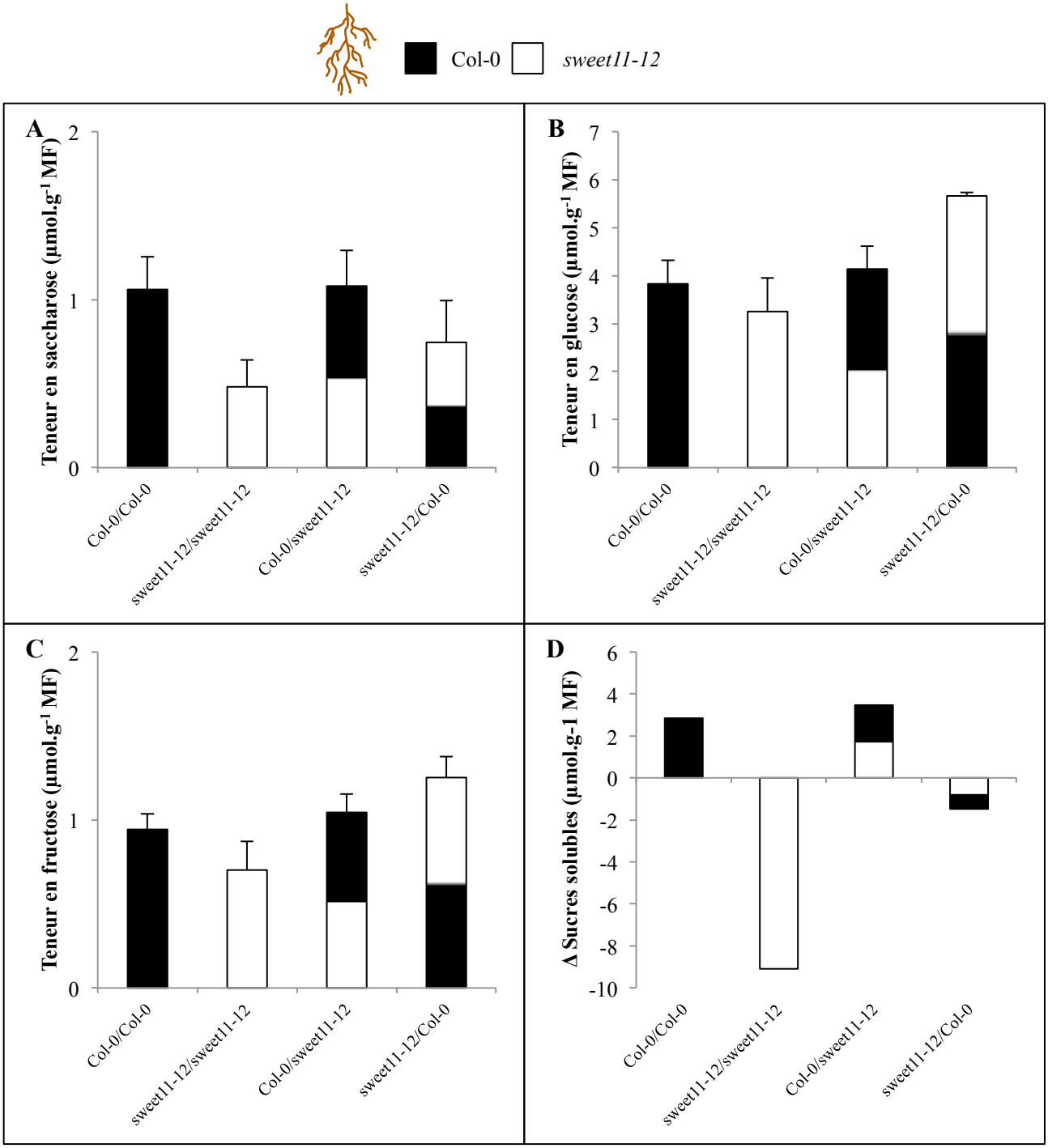


Figure 52 *Teneurs en sucres solubles des racines de plantes greffées (Col-0 ; sweet11-12) cultivées en rhizobox en régime hydrique classique pendant 21 jours après la prise de la greffe.*
A, Teneur en saccharose des racines de plantes greffées. **B**, Teneur en glucose des racines de plantes greffées. **C**, Teneur en fructose des racines de plantes greffées. **D**, Différence de teneurs en sucres entre les racines et les feuilles des plantes greffées. Les extractions ont été effectuées sur plante individuelle et les données sont exprimées en µmol.g^{-1} de poids frais. Les valeurs présentées correspondent aux moyennes (± ES) de 4 à 8 plantes.
Le génotype des plantes greffées est indiqué de la façon suivante : Rosette/Racine. Les couleurs supérieures et inférieures d'une barre correspondent respectivement au fond génétique de la rosette et de la racine (Noir, Col-0 ; Blanc, *sweet11-12*)

1.2.2 Teneurs en sucres solubles dans les racines

Le saccharose est présent à hauteur d'environ 1 µmol.g^{-1} MF dans les racines des plantes ayant une rosette Col-0 (Col-0/Col-0, 1,06 µmol.g^{-1} MF, Col-0/*sweet11-12*, 1,08 µmol.g^{-1} MF) (**Figure 52A**). En revanche, les teneurs en saccharose mesurées sont sensiblement plus faibles dans les racines des plantes dont la rosette est de génotype *sweet11-12* (*sweet11-12*/*sweet11-12,* 0,48 µmol.g^{-1} MF ; *sweet11-12*/Col-0, 0,75 µmol.g^{-1} MF) par rapport aux teneurs mesurées dans les racines des plantes ayant une rosette Col-0 (**Figure 52A**).

En ce qui concerne le glucose, les teneurs oscillent entre 3,83 µmol.g^{-1} MF (Col-0/Col-0) et 5,66 µmol.g^{-1} MF (*sweet11-12*/Col-0), ce qui est bien plus important que les teneurs en saccharose relevées dans les racines (**Figure 52B**). Même si la teneur maximale en glucose est obtenue pour *sweet11-12*/Col-0 (5,69 µmol.g^{-1} MF), les teneurs des autres plantes restent elles aussi importantes et du même ordre de grandeur (Col-0/Col-0, 3,83 µmol.g^{-1} MF ; *sweet11-12*/*sweet11-12*, 3,25 µmol.g^{-1} MF ; Col-0/*sweet11-12*, 4,14 µmol.g^{-1} MF) (**Figure 52B**).

Le fructose est présent dans des quantités avoisinant celles mesurées pour le saccharose dans les racines des différentes plantes greffées (**Figure 52C**). En effet le fructose est présent à hauteur de 1 µmol.g^{-1} MF dans les racines des différentes plantes greffées (Col-0/Col-0, 0 ,94 µmol.g^{-1} MF ; *sweet11-12*/*sweet11-12*, 0,70 µmol.g^{-1} MF ; Col-0/*sweet11-12*, 1,04 µmol.g^{-1} MF ; *sweet11-12*/*sweet11-12*, 1,25 µmol.g^{-1} MF). Notons que la valeur minimale est obtenue pour *sweet11-12*/*sweet11-12* (**Figure 52C**).

La teneur en sucres solubles totaux est plus importante dans les racines que dans les rosettes des plantes Col-0/Col-0 (+ 2,84 µmol.g^{-1} MF) et Col-0/*sweet11-12* (+3,46 µmol.g^{-1} MF). En revanche, les plantes présentant une rosette *sweet11-12* ont une teneur en sucres solubles moins importante dans les racines que dans les feuilles (*sweet11-12*/*sweet-11-12*, -9,1 µmol.g^{-1} MF ; *sweet11-12*/Col-0, -1,5 µmol.g^{-1} MF).

En résumé, les plantes dont la rosette est de génotype *sweet11-12* se caractérisent par des teneurs en saccharose plus faibles dans la racine et ce indépendamment du génotype de la racine. De plus, quel que soit le type de greffe considéré, le glucose est présent en quantité importante dans la racine par rapport aux plantes non greffées.

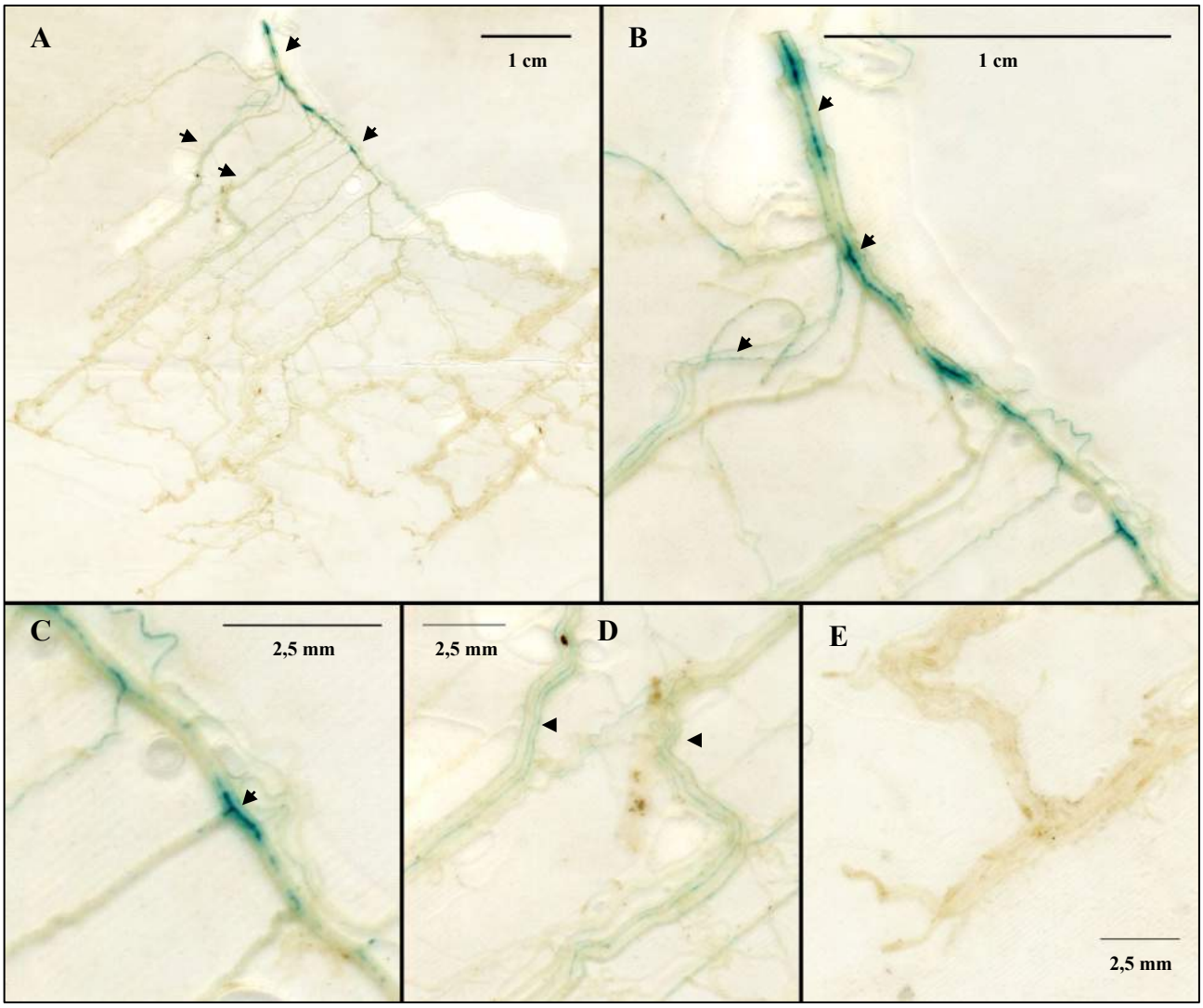


Figure 53 *Localisation de l'expression d'AtSWEET11 dans la racine de plantes âgées de 30 jours cultivées en rhizobox en régime hydrique classique*.
La localisation a été déterminée en utilisant des plantes *pAtSWEET11::GUS*, exprimant le gène GUS sous le contrôle du promoteur du gène (1 kb) *AtSWEET11*. Les flèches noires indiquent les zones d'expression du gène *AtSWEET11*. **A**, Vue du système racinaire dans son intégralité. **B**, Grossissement de la partie supérieure de la racine principale. **C**, Grossissement d'un détail de la racine principale. **D**, Grossissement des racines latérales situées dans la partie supérieure. E, Grossissement des racines latérales et des pointes racinaires situées dans la partie inférieure.

2 Etude de la localisation de l'expression d'AtSWEET11 et d'*AtSWEET12* dans la racine

En parallèle de la recherche de la fonction d'*AtSWEET11* et d'*AtSWEET12* dans la racine, des études ont été menées pour définir la localisation de l'expression de ces deux gènes dans le compartiment racinaire. Connaître la localisation de l'expression de ces transporteurs serait une première avancée concernant leur fonction dans la racine. La localisation de l'expression de ces transporteurs a été effectuée *via* l'utilisation de plantes pSWEET11-GUS et pSWEET12-GUS (Le Hir *et al.*, 2015) âgées de 30 jours cultivées en rhizobox en régime hydrique classique « Tm » ou restreint « St ».

2.1 Localisation de l'expression d'*AtSWEET11* dans la racine

En régime hydrique classique, le marquage GUS est essentiellement retrouvé dans la partie du système racinaire située près de la surface du sol jusqu'à environ 3 cm de profondeur (**Figure 53A**). Le marquage est absent en profondeur tant au niveau de la racine principale, des racines latérales que des pointes racinaires (**Figure 53A et E**). Au niveau de la partie supérieure du système racinaire, le marquage GUS est retrouvé au niveau de la racine principale (**Figure 53A et B**), plus précisément, le signal est localisé au niveau de la stèle (**Figure 53B**). Cependant le marquage GUS est particulièrement intense au niveau de la zone de jonction entre une racine latérale et la racine principale (**Figure 53B et C**). Au niveau de ces jonctions, le marquage GUS reste également localisé au niveau de la stèle. De plus, il est aussi visualisé au niveau de la stèle des racines latérales située dans la partie supérieure du système racinaire, mais de manière moins intense que dans la racine principale (**Figure 53D**).

Conformément à ce qui pouvait être attendu, la carence hydrique a considérablement réduit le développement racinaire (**Figure 54A**). Néanmoins, le marquage GUS présente le même profil de localisation qu'en condition « Tm ». Le marquage GUS n'est en effet retrouvé qu'au niveau des racines présentes à proximité de la surface du sol, aucun marquage n'étant retrouvé dans les racines présentes en profondeur, tant au niveau de la racine principale, des racines latérales et des pointes racinaires (**Figure 54A et E**). Au niveau de la partie supérieure du sol, le marquage GUS est, tout comme en condition « Tm », retrouvé principalement au niveau de la stèle de la racine principale (**Figure 54B et C**). L'intensité du marquage GUS est particulièrement importante au niveau des zones de jonction entre la racine principale et une racine latérale dans la zone supérieure de la racine (**Figure 54B et C**). Il semblerait même que l'intensité de ce marquage soit plus forte en condition « St » (**Figure 54B et C**) par rapport à

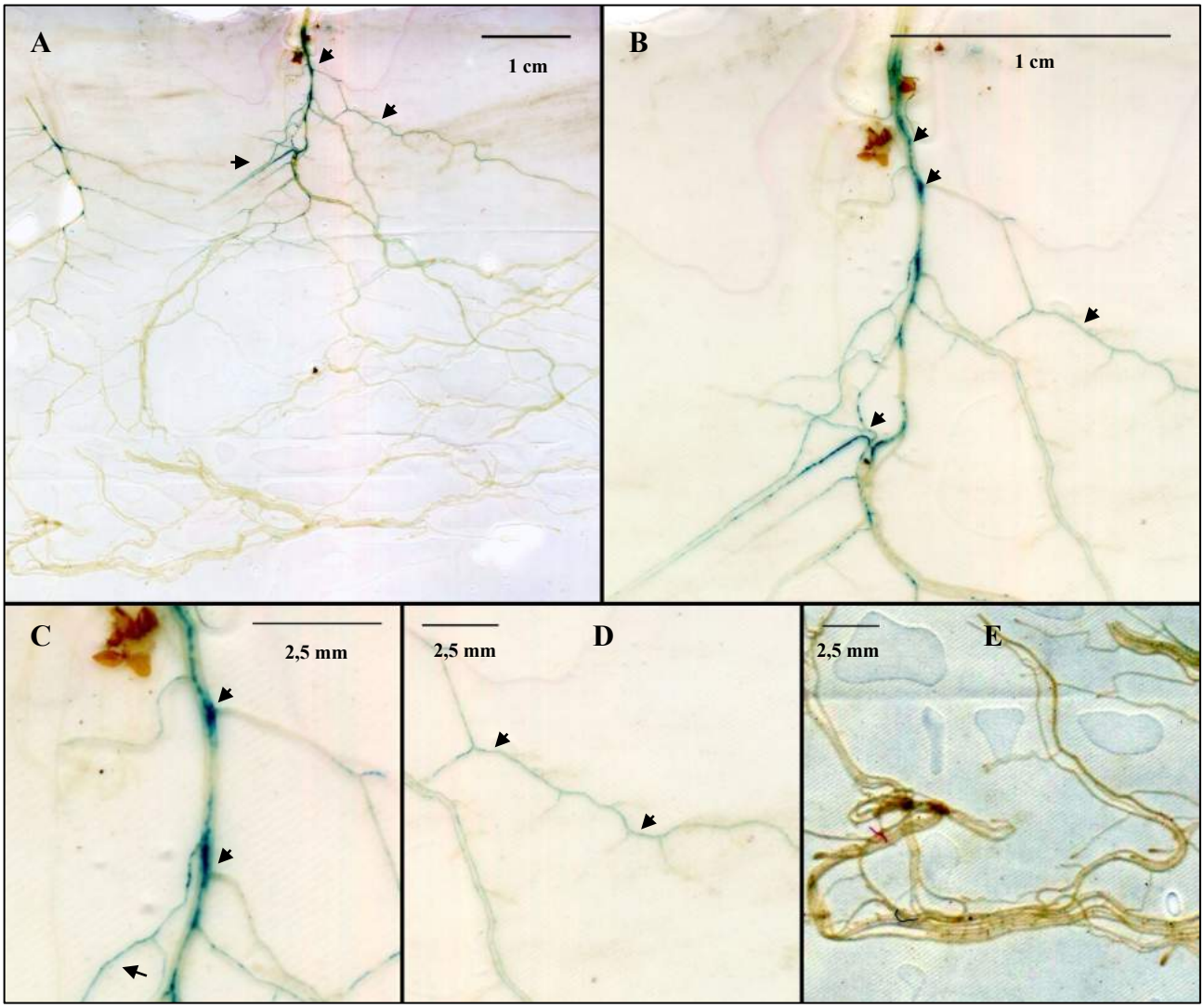


Figure 54 *Localisation de l'expression d'AtSWEET11 dans la racine de plantes âgées de 30 jours cultivées en rhizobox en carence hydrique*.
La localisation a été déterminée en utilisant des plantes *pAtSWEET11::GUS*, exprimant le gène GUS sous le contrôle du promoteur du gène (1 kb) *AtSWEET11*. Les flèches noires indiquent les zones d'expression du gène *AtSWEET11*. **A**, Vue du système racinaire dans son intégralité. **B**, Grossissement de la partie supérieure de la racine principale. **C**, Grossissement d'un détail de la racine principale. **D**, Grossissement des racines latérales situées dans la partie supérieure. **E**, Grossissement des racines latérales et des pointes racinaires situées dans la partie inférieure.

la condition « Tm » (**Figure 54B et C**). Il convient en effet de noter que pour un même génotype, les racines « Tm » et « St » ont été traitées en même temps, dans le même récipient, avec les même temps d'incubation, afin de pouvoir comparer la localisation et le niveau d'expression locale entre les condition « Tm » et « St ». Si le signal correspondant à l'expression d'*AtSWEET11* était faible dans les racines latérales situées dans la partie supérieure du sol en condition « Tm » (**Figure 54B et D**), ce même signal semble en condition « St » plus intense tout en conservant le même profil de localisation (**Figure 54B, C et D**).

2.2 Localisation de l'expression d'AtSWEET12 dans la racine

En condition « Tm », le marquage GUS est retrouvé sur l'intégralité des zones du système racinaire (**Figure 55A**). Cependant, l'intensité du marquage GUS est bien plus importante au niveau des racines situées plus en profondeur (**Figure 55A**). Le marquage GUS de faible intensité retrouvé dans l'intégralité de la racine principale est situé au niveau de la stèle (**Figure 55A, B et C**). Le signal correspondant à l'expression d'*AtSWEET12* est systématiquement retrouvé au niveau des racines latérales (**Figure 55A et D**). Néanmoins, l'intensité du marquage s'accentue progressivement à l'approche de la pointe racinaire (**Figure 55A, D et E**). C'est d'ailleurs pour cette raison que le marquage est plus visible au niveau des racines situées en profondeur (**Figure 55A**). En revanche, le marquage GUS est absent de la coiffe ainsi que de la zone méristématique, la distance séparant le marquage GUS de l'extrémité de la pointe racinaire étant en moyenne de 488 µm (**Figure 57**). En conséquence, le signal correspondant à l'expression d'*AtSWEET12* est trouvée jusqu'à la zone d'élongation de la racine.

En condition « St », le développement racinaire est particulièrement réduit (**Figure 56A**). Le marquage GUS associé à l'expression d'*AtSWEET12* est retrouvé sur l'intégralité du système racinaire (**Figure 56A**). Si le marquage était plus visible au niveau des racines situées en profondeur en condition « Tm », le marquage est en condition « St » aisément visualisable dans les racines situées à proximité de la surface sol et dans celles situées en profondeur malgré la similitude des conditions pour révéler le marquage GUS (**Figure 56A**). Néanmoins, le marquage GUS présente le même profil de localisation qu'en condition « Tm » (**Figure 55**). Le signal est en effet toujours retrouvé au niveau de la stèle de la racine principale (**Figure 56B et C**) ainsi qu'au niveau des racines latérales (**Figure 56D**) et des pointes racinaires (**Figure 56E**). Au niveau des pointes racinaires, le signal est absent de la zone méristématique mais est parfois retrouvé au niveau de la coiffe (**Figure 56E**). Enfin, la

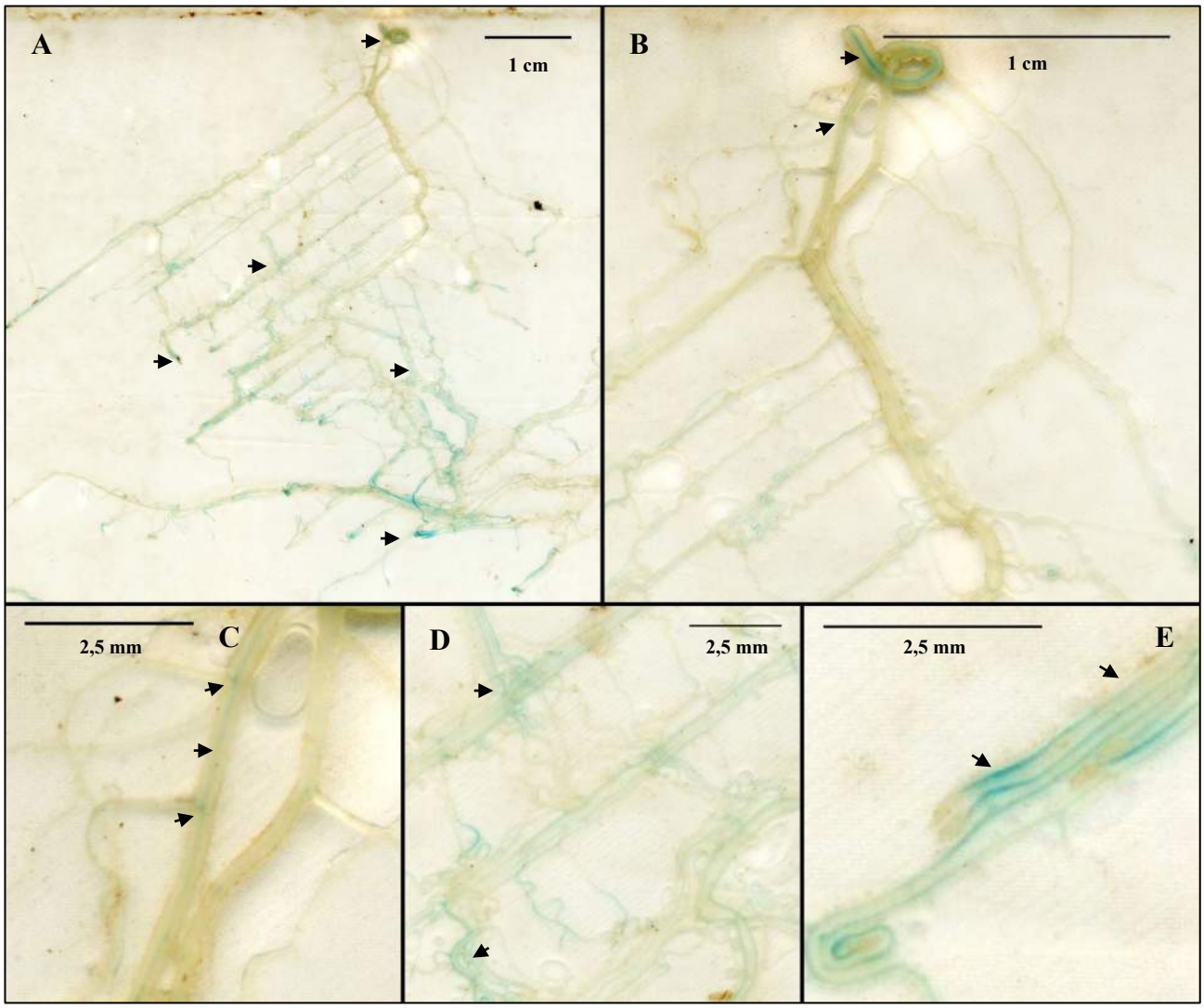


Figure 55 *Localisation de l'expression d'AtSWEET12 dans la racine de plantes âgées de 30 jours cultivées en rhizobox en régime hydrique classique*.
La localisation a été déterminée en utilisant des plantes *pAtSWEET12::GUS*, exprimant le gène GUS sous le contrôle du promoteur du gène (1 kb) *AtSWEET12*. Les flèches noires indiquent les zones d'expression du gène *AtSWEET12*. **A**, Vue du système racinaire dans son intégralité. B, Grossissement de la partie supérieure de la racine principale. **C**, Grossissement d'un détail de la racine principale. **D**, Grossissement des racines latérales situées dans la partie inférieure. **E**, Grossissement des pointes racinaires situées dans la partie inférieure.

distance séparant le marquage GUS de l'extrémité de la pointe racinaire (346 µm) est réduite par la carence hydrique (-30%) (**Figure 57**).

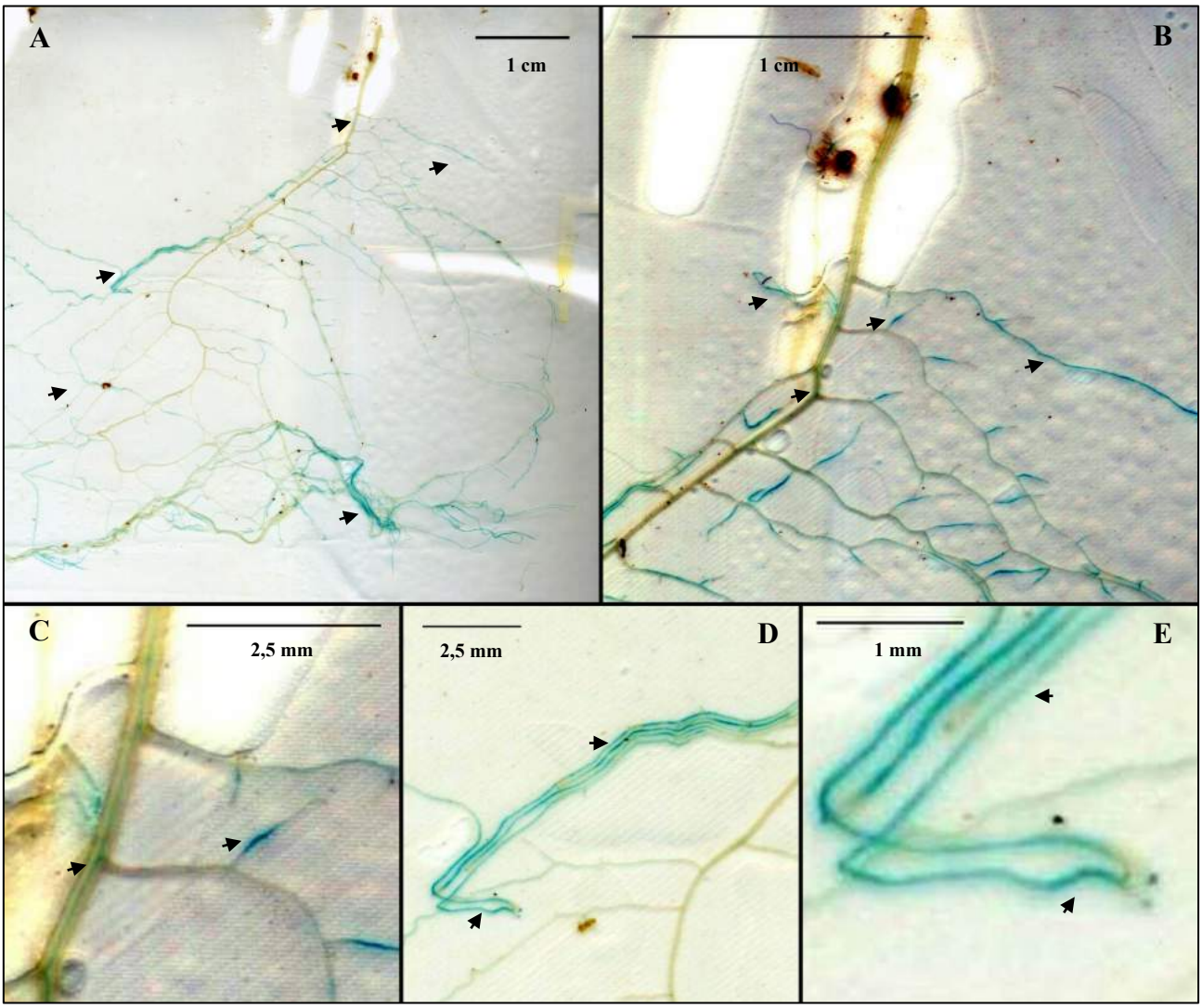


Figure 56 *Localisation de l'expression d'AtSWEET12 dans la racine de plantes âgées de 30 jours cultivées en rhizobox en carence hydrique*.
La localisation a été déterminée en utilisant des plantes *pAtSWEET12::GUS*, exprimant le gène GUS sous le contrôle du promoteur du gène (1 kb) *AtSWEET12*. Les flèches noires indiquent les zones d'expression du gène *AtSWEET12*. **A**, Vue du système racinaire dans son intégralité. **B**, Grossissement de la partie supérieure de la racine principale. **C**, Grossissement d'un détail de la racine principale. **D**, Grossissement des racines latérales. **E**, Grossissement des pointes racinaires.

Discussion

AtSWEET11 et AtSWEET12 sont deux transporteurs de type facilitateur qui sont responsables du transport du saccharose depuis les cellules du parenchyme phloémien vers l'apoplaste au niveau du complexe de chargement du phloème (Chen *et al.*, 2012). Le processus de diffusion du saccharose vers l'apoplaste (situé à proximité du complexe de chargement) constitue la première étape pour le chargement apoplastique du saccharose dans le phloème. Si les mutants KO *sweet11* et *sweet12* ne présentent aucun phénotype morphologique particulier, il en est tout autrement pour le double mutant KO *sweet11*/*sweet12* puisqu'il présente un retard de croissance et une accumulation de sucres solubles et d'amidon dans les feuilles (Chen *et al.*, 2012). AtSWEET11 et AtSWEET12, comme tous les membres du clade III des transporteurs de type SWEET (AtSWEET9 à 15), sont capables de transporter le saccharose dans les deux sens indépendamment du pH (Eom *et al.*, 2015). L'expression d'*AtSWEET11* à *15* a été retrouvée dans la racine d' *A. thaliana* (**Chapitre III et IV**) même si leur rôle respectif n'y a pas été formellement décrit. Cependant, la présence de l'expression des transporteurs *AtSWEET11* à *15* dans la racine est conforme avec l'existence d'un système de transport du saccharose indépendant de la force protomotrice dans la racine (Chaudhuri *et al.*, 2008). A partir de cela, il a été supposé que les transporteurs SWEET du clade III exprimés dans la racine étaient impliqués dans le relargage du saccharose dans l'apoplaste le long du phloème de transport pour nourrir les tissus environnants (Chen, 2013; Ludewig and Flügge, 2013) même si la localisation racinaire de ces transporteurs n'a pas encore été déterminée. Enfin, nous avons montré que l'expression d'*AtSWEET11* à *15* était augmentée dans la racine en réponse à la carence hydrique. Nous avons alors supposé que l'expression de ces transporteurs était augmentée dans la racine stressée pour faciliter le drainage du saccharose dont l'export depuis les feuilles vers les racines est stimulé en réponse à la carence hydrique (**Chapitre IV**). A partir de ces résultats, nous avons commencé à étudier le double mutant KO *sweet11*/*sweet12* afin d'observer l'effet de la double mutation KO d'*AtSWEET11* et d'*AtSWEET12* confinée à la racine en effectuant des micro-greffes entre *sweet11-12* et Col-0.

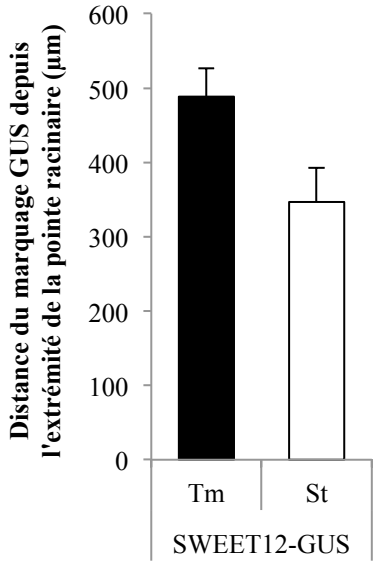


Figure 57 *Distance séparant l'extrémité de la pointe racinaire du début du marquage GUS observé dans les plantes SWEET12-GUS âgées de 30 jours cultivées en rhizobox en régime hydrique classique ou restreint*.

La localisation a été déterminée en utilisant des plantes *pSWEET12::GUS*, exprimant le gène GUS sous le contrôle du promoteur du gène *AtSWEET12* (Rozen Le Hirr, INRA Versailles). Les données présentées correspondent à la moyenne (± ES) de 12 mesures.

1 Le double mutant KO *sweet11-12* présente une teneur en saccharose réduite dans la racine

Conformément à ce qui a été énoncé dans la littérature, la présence de la mutation KO des gènes *AtSWEET11* et *AtSWEET12* retarde la croissance de la rosette et des racines (**Figure 50**) (Chen *et al.*, 2012). Cependant le phénotype morphologique est loin d'être aussi sévère que celui observé dans le cas du mutant *suc2* (Gottwald *et al.*, 2000a; Srivastava *et al.*, 2009). L'expression d'*AtSWEET13*, un gène paralogue très proche d'*AtSWEET11* et d'*AtSWEET12*, est particulièrement importante dans le double mutant KO *sweet11-12* ce qui n'est pas le cas dans Col-0 (Chen *et al.*, 2012). AtSWEET13, tout comme AtSWEET11 et AtSWEET12, est capable de transporter le saccharose, suggérant une redondance de fonction pour les transporteurs SWEET du clade III , contrairement à AtSUC2 dont la fonction n'est pas complémentée par un autre transporteur de type SUC dans le mutant *suc2*. Ceci expliquerait pourquoi la mutation KO d'*AtSUC2* est presque létale, alors que le mutant *sweet11-12* présente un simple retard de croissance. Toutefois, les rosettes des plantes *sweet11-12*, tous comme celles de *suc2* ou *suc2*F (Srivastava *et al.*, 2008), présentent une accumulation de sucres solubles et d'amidon (**Figure 51**), ce qui caractérise typiquement une perturbation du chargement du phloème. En revanche nos résultats indiquent que les teneurs en saccharose des racines des plantes *sweet11-12* sont inférieures à celles de Col-0 (**Figure 52A**), tout comme cela a pu être observé pour *suc*2F (**Figure 41A**), ce qui pourrait être relié au plus faible chargement du phloème. Non seulement le chargement du phloème des plantes *sweet11-12* est perturbé (Chen *et al.*, 2012), mais il semblerait aussi que la proportion du carbone fixée envoyée vers la racine soit légèrement réduite comme le laisse supposer la faible réduction du R/S ratio observée chez les plantes *sweet11-12* (**Figure 50D**). Ainsi, la présence de la double mutation KO d'*AtSWEET11* et *AtSWEET12* réduirait plus la croissance de la racine que de la rosette. Néanmoins, il reste à définir si cette réduction du R/S est due à l'effet de la mutation sur la source ou sur le puits.

2 Quelles conséquences au confinement de la double mutation KO à un seul organe ?

La présence de la double mutation KO d'*AtSWEET11* et d'*AtSWEET12* confinée à la racine n'a guère d'influence sur le développement de cette dernière puisque son développement est restauré en présence d'une rosette Col-0 (**Figure 50B**). Inversement, le

développement de la racine Col-0 est particulièrement réduit en présence d'une rosette *sweet11-12*, suggérant que la réduction de croissance observée chez le mutant *sweet11-12* est principalement liée à un effet de la mutation sur le développement de la rosette. Le développement de la racine greffée (Col-0 ou *sweet11-12*) à une rosette *sweet11-12* est non seulement (1) réduit du fait du retard de développement de la rosette *sweet11-12* mais aussi (2) parce que la part de carbone allouée vers la racine est probablement quelque peu plus faible, comme en témoigne la faible réduction du R/S des plantes ayant une rosette *sweet11-12* par rapport aux plantes ayant une rosette Col-0 (**Figure 50D**). La quantité de carbone envoyé par la totalité de la rosette *sweet11-12* vers la racine serait donc non seulement plus faible en terme de quantité brute, mais aussi probablement plus faible en proportion, et ce, indépendamment du génotype de la racine (Col-0 ou *sweet11-12*).

La restauration de l'expression d'*AtSWEET11* et d'*AtSWEET12* dans la racine n'a pas compensé la réduction de croissance de la rosette, tout comme elle n'a pas fait disparaître l'accumulation de sucres et d'amidon observée dans la rosette de génotype *sweet11-12* (**Figure 51**), confirmant le maintien de la perturbation du chargement du phloème malgré la présence d'une racine Col-0. De même, la réduction de la teneur en saccharose observée dans la racine *sweet11-12* en présence d'une rosette de génotype *sweet11-12* est maintenue quand l'expression d'*AtSWEET11* et d'*AtSWEET12* est restaurée dans la racine (Col-0) (**Figure 52**). Inversement, la restauration de l'expression d'*AtSWEET11* et d'*AtSWEET12* dans la rosette est suffisante pour rétablir la teneur en saccharose de la racine *sweet11-12* (**Figure 52**), soulignant l'effet dominant de la rosette sur le développement de la racine.

En conclusion les deux principales différences observées pour la racine des plantes *sweet11-12*, à savoir la réduction de sa croissance et de sa teneur en saccharose, disparaissent en présence d'une rosette Col-0, soulignant (1) l'effet nul de la double mutation KO au niveau racinaire et (2) l'importance de l'effet de la mutation sur le développement de la rosette qui en retour, altère le développement de la racine. Néanmoins, cela ne veut pas pour autant dire que les transporteurs *AtSWEET* du clade III n'ont pas un rôle dans la racine, que ce soit au niveau du développement ou encore de la compartimentation tissulaire des sucres. On pourrait en effet supposer que d'autres transporteurs SWEET pourraient compenser l'absence d'expression d'*AtSWEET11* et d'*AtSWEET12.*

Parmi les 7 AtSWEET du clade III, 5 sont exprimés dans la racine (*AtSWEET11* à *AtSWEET15*) alors que 4 sont exprimés dans la rosette (*AtSWEET11*, *AtSWEET12*, *AtSWEET13* et *AtSWEET15*) et 7 dans la hampe (*AtSWEET9* à *AtSWEET15*) (**Chapitre III,**

Chapitre IV). De part leur proximité au niveau génétique et leur capacité à transporter le saccharose, on ne peut écarter une certaine redondance fonctionnelle comme l'ont supposé Chen *et al.* (2012) pour *AtSWEET13* dans le double mutant *sweet11-12*. Récemment, Chen *et al.* (2015b) ont démontré qu'il était nécessaire de recourir à un triple mutant (*sweet11/sweet12/sweet15*) pour altérer dramatiquement le remplissage de la graine et le développement de l'embryon chez *A. thaliana*. La redondance des *AtSWEET* du clade III rend en effet difficile l'étude de leur fonction propre par une approche de génétique inverse simple d'où la nécessité de réaliser des doubles, des triples voire peut-être des quadruples mutants. Quant à l'étude du double mutant *sweet11-12,* ce n'était pas forcément le choix le plus judicieux étant donné qu'*AtSWEET11* est peu ou pas exprimé en condition témoin, mais c'était le seul double mutant alors disponible au laboratoire. Néanmoins, l'étude n'a pas été effectuée en condition de carence hydrique, où, au vu du facteur d'induction d'*AtSWEET11*, l'expression d'*AtSWEET11* et des autres *AtSWEET* du clade III semble requise. Il convient effectivement d'étudier les mutants KO *sweet* dans des conditions où l'expression de ces gènes semble induite et par conséquent potentiellement requise pour répondre aux changements de l'environnement. Enfin, si l'expression d'*AtSWEET11* est particulièrement augmentée en réponse à la carence hydrique, celle d'*AtSWEET13* l'est aussi fortement, faisant de lui le gène *AtSWEET* du clade III le plus exprimé dans la racine en condition « St » tout comme en condition « Tm » d'ailleurs. Il convient donc de prendre en compte *AtSWEET13* dans l'étude des mutants KO, et pourquoi ne pas obtenir le triple mutant *sweet11/sweet12/sweet13* ?

3 *AtSWEET11* et *AtSWEET12* présentent une localisation différente dans la racine

Nos résultats montrent qu'*AtSWEET11* est particulièrement exprimé dans la partie supérieure de la racine principale et de façon moindre dans les racines latérales de cette même zone de la racine en condition « Tm » et « St » (**Figure 53 et 54**). Cependant l'ARNm d'*AtSWEET11* est peu ou pas retrouvé dans les racines « Tm » (**Chapitre IV**). Néanmoins, il convient de rappeler que le marquage GUS ici observé est lié à la présence de la β-glucuronidase produite à partir de la transcription de son gène sous le contrôle du promoteur du gène *AtSWEE11*. Ce n'est donc pas l'expression de l'ARNm spécifique du gène *AtSWEET11* qui est ici visualisée mais les zones où est transcrit le gène. Toutefois, ceci

suggère une régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm d'*AtSWEET11*, ce qui expliquerait l'absence de détection en qPCR.

Il semblerait qu'*AtSWEET11* soit localement plus exprimé dans les racines « St » que les racines « Tm », ce qui est en accord avec l'augmentation de l'expression d'*AtSWEET11* relevée en réponse à la contrainte hydrique (**Chapitre IV**). Etant donné qu'*AtSWEET11* est exprimé au centre de la racine, il est très probable qu'il soit localisé dans la stèle, au niveau des tissus vasculaires ou en périphérie de ces tissus d'autant plus que les racines latérales se différencient à partir du péricyle. Le Hir *et al.* (2015) ont montré qu'*AtSWEET11* était exprimé dans les tissus du phloème et dans les cellules associées au xylème, dans la hampe florale. Surtout, *AtSWEET11* est exprimé dans les cellules du xylème adjacentes au cambium dans la hampe florale (Le Hir *et al.*, 2015), le cambium générant les tissus secondaires. A partir de ce résultat, il n'est pas surprenant de retrouver l'expression d'*AtSWEET11* dans les tissus de la racine principale située dans la partie supérieure du sol, étant donné que la racine possède, à ce niveau, des tissus secondaires (**Figure 53 et 54**). Concernant l'expression d'*AtSWEET11* retrouvée dans les racines latérales situées dans le sol peu profond, celle-ci est compatible avec la localisation dans les tissus du phloème ou dans cellules associés au xylème. Enfin *AtSWEET11* est fortement exprimé au niveau des zones de départ des racines latérales sur la racine principale (**Figure 53 et 54**), tout comme *AtSUC2* (**Chapitre VII**).

AtSWEET11 et *AtSUC2* ont de ce fait beaucoup de points communs. Dans la rosette, *AtSWEET11* et *AtSUC2* fonctionnent en tandem de par leur localisation (Chen *et al.*, 2012) et leur expression y est stimulée en réponse à la contrainte hydrique probablement pour soutenir l'augmentation de l'export de saccharose vers la racine (**Chapitre IV**). De même, dans la racine, *AtSWEET11* et *AtSUC2* sont non seulement exprimés au niveau de la même zone de la racine principale (jonctions racine/racine), mais sont aussi tous deux plus exprimés en réponse à la carence hydrique (**Chapitre IV**). En réponse au stress osmotique, *AtSUC2* et *AtSWEET11* sont plus exprimés dans la rosette, alors qu'ils sont tous deux légèrement réprimés dans la racine (**Chapitre III**). Ainsi la régulation de l'expression d'*AtSWEET11* et d'*AtSUC2* tend à montrer une co-régulation (en réponse à la carence hydrique, et au stress osmotique) tant dans la rosette que dans la racine. Cette co-régulation dans la racine associée à la proximité de la localisation de leur expression laisse suggérer que leur fonction respective est liée dans la racine comme cela a pu être relevé dans la feuille (Chen *et al.*, 2012).

Si *AtSWEET11* est fortement exprimé au niveau des jonctions racine/racine de la racine principale, *AtSWEET12,* est lui, particulièrement exprimé au niveau des pointes racinaires

(**Figure 55 et 7**). *AtSWEET12* est cependant aussi exprimé dans la racine principale mais plus légèrement que dans les pointes (**Figure 55 et 56**). *AtSWEET11* et *AtSWEET12* présentent donc des profils de localisation quelque peu différents dans la racine, tout comme dans la hampe florale (Le Hir *et al.*, 2015), ce qui diffère par rapport à la feuille (Chen *et al.*, 2012). Néanmoins, leur expression est localisée dans la stèle, probablement au niveau des tissus vasculaires, ce qui ne contredit pas Le Hir *et al.* (2015), l'expression d'*AtSWEET12* ayant été relevée dans les tissus du phloème et les cellules associés au xylème de la hampe florale.

De façon intéressante, tout comme cela a été montré pour *AtSWEET11*, la localisation de expression d'*AtSWEET12* dans les pointes racinaires coïncide avec la localisation de l'expression d'*AtSUC2* (**Chapitre VI**) même si l'expression d'*AtSWEET12* est localisée plus prés de l'extrémité de la pointe racinaire (**Figure 57**). D'ailleurs *AtSWEET12* et *AtSUC2* fonctionnent en tandem dans la feuille dans un même but : charger le phloème (Chen *et al.*, 2012; Gottwald *et al.*, 2000a). Ils sont de plus tous deux régulés de la même façon dans la racine (induction en réponse à la contrainte hydrique (**Chapitre IV**), répression en réponse au stress osmotique (**Chapitre III**)).

Enfin, tout comme dans le cas d'*AtSWEET11*, la localisation cellulaire d'*AtSWEET12* n'est pas encore connue, même s'il semble être exprimé dans la stèle. Il est toutefois probable qu'AtSWEET11 et qu'AtSWEET12 remplissent des fonctions analogues dans des zones différentes de la racine, et que cette fonction ferait intervenir AtSUC2. L'expression respective d'*AtSWEET11* et d'*AtSWET12* est non seulement co-régulée mais également co-localisée, à l'échelle tissulaire, avec celle d'*AtSUC2*. Il est ainsi probable que ces gènes participent soit à des fonctions communes, soit à des fonctions différentes mais reliées.

La localisation de l'expression d'*AtSWEET11* (**Figure 53 et 54**) appuyée par les travaux de Le Hir *et al.* (2015) est très conforme avec une localisation dans les cellules du phloème mais aussi dans les cellules du xylème secondaires adjacentes au cambium. En accord avec cette localisation, un scénario est envisageable : le saccharose serait relâché depuis le phloème grâce à *AtSWEET11*, une partie de ce saccharose pourrait servir à nourrir les cellules du cambium, l'autre partie étant re-chargée dans le phloème *via AtSUC2*. Le rôle d'AtSWEET11, quant à l'apport des sucres aux cellules du xylème en développement, est hautement probable. En effet, le mutant KO *sweet11* ainsi que le double mutant KO *sweet11-12* présentent une hampe florale dont les aires des pôles de xylème et de phloème sont réduites suite à la réduction du nombre des cellules les composant (Le Hir *et al.*, 2015). De plus les parois des cellules du xylème de la hampe florale du mutant *sweet11*, du double

mutant *sweet11-12*, mais aussi du mutant *sweet12* présenteraient une composition différente de celle de Col-0, la différence majeure étant une composition réduite en cellulose (Le Hir *et al.*, 2015). En conclusion, étant donné que l'expression d'*AtSWEET11* est relevée dans les tissus présentant un épaississement secondaire, nous supposons que tout comme dans la hampe florale, *AtSWEET11* est impliqué dans le développement de ces tissus. Toutefois, nous ne savons pas s'il existe un lien entre la surexpression d'*AtSWEET11* en réponse à la carence hydrique et l'anatomie de la racine, et plus particulièrement des tissus conducteurs.

L'expression d'*AtSWEET12* au niveau de la stèle de la racine principale (dans une moindre mesure) et des pointes racinaires est cohérente avec sa localisation dans les tissus du phloème et dans les cellules associés au xylème dans la hampe florale(Le Hir *et al.*, 2015). De ce fait, AtSWEET12 pourrait, lui aussi, être impliqué dans le relâchement des sucres depuis le phloème de transport pour nourrir les tissus environnants. Au niveau des pointes racinaires, des zones de déchargement des sucres, AtSWEET12 pourrait être associé à la diffusion des sucres libérés *via* AtSUC2 alors en « mode puits » (**Chapitre VII**), depuis l'apoplaste vers les cellules à proximité de la zone de déchargement du phloème.

Bilan

Si la fonction d'*AtSWEET11* et d'*AtSWEET12* est bien établie dans les feuilles, ce n'est pas le cas dans la racine. Le double mutant KO *sweet11-12* présente une réduction de la croissance foliaire et de la croissance racinaire. Toutefois la mutation d'*AtSWEET11* et d'*AtSWEET12* confinée à la racine n'a guère d'influence sur le développement de la racine ou sur la compartimentation des sucres solubles. Par conséquent, c'est l'effet de la double mutation KO d'*AtSWEET11* et d'*AtSWEET12* au niveau foliaire qui conditionne la réduction de la croissance racinaire et du ratio R/S *via* son effet sur la réduction de la croissance foliaire et la perturbation du chargement du phloème.

Enfin, *AtSWEET11* est exprimé au niveau de la stèle de la partie supérieure de la racine principale et plus particulièrement au niveau des zones de départ des racines latérales. L'expression d'*AtSWEET11* semble être spécifique des tissus secondaires dans la racine. *AtSWEET12* est faiblement exprimé dans la stèle de la racine principale, alors qu'il est fortement exprimé au niveau des pointes racinaires. De façon intéressante, il semblerait que l'expression d'*AtSWEET11* et *AtSWEET12* soit co-localisée avec celle d'*AtSUC2*. Il faudrait affiner ces résultats mais on peut déjà imaginer une implication de tous ces transporteurs dans une même grande fonction de transport, non seulement dans les feuilles comme cela a été suggéré (Chen *et al.*, 2012) mais aussi dans les racines comme le suggèrent nos résultats de localisation.

IX. Conclusion générale et perspectives

Mon travail de thèse avait pour principal objectif d'identifier les principaux transporteurs de saccharose de la racine potentiellement impliqués dans les relations source-puits pour le carbone chez *A. thaliana*.

1 Cartographie au cours du développement

Dans un premier temps, nous avons effectué une cartographie détaillée de l'expression des transporteurs de saccharose ainsi que les profils glucidiques pour chacun des organes à chacun des stades de développement, et plus particulièrement de la racine, organe trop souvent oublié de part sa difficulté d'étude. Pour cette première étude, les plantes ont été cultivées en système d'hydroponie. Cette cartographie présentée dans le chapitre III nous a permis de montrer que les transporteurs de saccharose étudiés présentaient des profils et des niveaux d'expression propres à chaque organe, certains transporteurs étant exclusifs ou absents d'un organe donné. Dans le détail, nous avons observé qu'en dépit de la réorientation du flux de saccharose depuis la rosette vers la hampe au détriment de la racine lors de la phase reproductive, la teneur en saccharose de la racine ne connaissait pas de changements notables au cours du développement. En revanche la teneur en hexoses était maximale lors de la phase végétative, période durant laquelle la croissance de la racine était particulièrement prononcée. C'est durant cette période que les principaux transporteurs *AtSWEET* (*AtSWEET13*, *AtSWEET12*, *AtSWEET14* et *AtSWEET11*) étaient les plus exprimés dans la racine, leur expression étant réduite lors de la phase reproductive. Quant à *AtSUC2*, son expression a augmenté légèrement et progressivement dans la racine au cours du développement (**Chapitre III**).

2 La réduction de la disponibilité en eau comme facteur modifiant les relations source-puits ?

Dans un second temps pour répondre à la question biologique initialement posée, la stratégie choisie fut de faire varier les relations source-puits pour le carbone, entre rosette et racine, en réduisant la disponibilité en eau. La réduction de la disponibilité en eau est en effet connue pour modifier les relations source-puits, étant donné que la croissance des parties aériennes est réduite plus précocement et plus intensément que la croissance racinaire (Sharp *et al.*, 2004). Un autre argument concernant la modification des relations source-puits pour le carbone par le manque d'eau est l'existence d'un découplage entre la photosynthèse et l'expansion foliaire : l'expansion foliaire est en effet réduite plus intensément que la

photosynthèse (Muller *et al.*, 2011). Par conséquent, le carbone produit par la photosynthèse alors non investi dans la croissance foliaire, s'accumule dans les parties aériennes. Si une partie du carbone alors excédentaire contribue à l'acclimatation de la rosette particulièrement *via* l'ajustement osmotique, il a été proposé qu'une autre partie du carbone foliaire accumulé était disponible à l'export et serait alors potentiellement exportée vers la racine pour soutenir sa croissance (Hummel *et al.*, 2010). De ce fait, nous avons souhaité nous placer dans un contexte de réduction de la disponibilité en eau pour (1) démontrer que le carbone excédentaire, présent dans les parties aériennes stressées, alors disponible à l'export, est bien alloué vers la racine et (2) étudier l'expression des transporteurs de saccharose quand l'export de carbone vers la racine est alors favorisé.

2.1 Les plantes soumises à la contrainte osmotique ne montrent pas de réallocation de carbone vers la racine

L'éventuelle réallocation du carbone vers la racine que laissait supposer la faible hausse du ratio R/S n'a pas été observée. En effet, en réponse au stress osmotique, la capacité exportatrice des feuilles source est non seulement réduite mais la proportion de carbone envoyée vers la racine est aussi diminuée, et ce probablement en raison de la forte altération du statut hydrique de la rosette flétrie. En conséquence, les sucres solubles sont accumulés en grande quantité dans la rosette, résultant très probablement à la mise en place de la sénescence et au vieillissement accéléré associé.

Finalement, la contrainte osmotique appliquée ne répondait pas aux critères souhaités quant aux objectifs de l'étude. Si nous avons tout de même procédé à l'étude détaillée des effets de la contrainte osmotique (**Chapitre III**) nous avons revu le système de culture des plantes (rhizobox) et le mode d'application de la réduction de la disponibilité en eau (contrainte hydrique).

2.2 Les plantes soumises à la contrainte hydrique appliquée montrent une réallocation du carbone vers la racine

En réponse à la contrainte hydrique la croissance racinaire en rhizobox était particulièrement réduite, toutefois la croissance foliaire l'était encore plus, résultant en une augmentation du ratio R/S, premier indice suggérant une éventuelle réallocation du carbone vers la racine. Cependant, si la hausse du ratio R/S suggérait une réallocation du carbone, cela n'indiquait en rien une augmentation de l'export vers la racine, ce ratio ne mettant en lumière qu'une augmentation de la proportion du carbone fixé investi dans la racine. C'est seulement

les expériences de « pulse-chase » du ^{14}C qui nous ont permis de confirmer que, sur une durée déterminée, la contrainte hydrique provoquait une augmentation de l'export en plus d'une réallocation globale du carbone vers la racine, démontrant ainsi l'hypothèse proposé par Hummel *et al.* (2010) selon laquelle le surplus de carbone accumulé dans la rosette serait exporté dans la racine lors de la contrainte hydrique (**Chapitre IV**).

De plus, nous avons observé une étroite relation entre la biomasse foliaire et l'allocation du carbone vers la racine. En effet, quand l'assimilation du ^{14}C chutait en parallèle avec la biomasse foliaire, la proportion et la quantité de ^{14}C exportées vers la racine augmentaient. La demande en carbone pour la croissance foliaire diminue en même temps que la croissance foliaire, rendant disponible un plus grand pool de carbone pour l'export. Nous avons interprété cette relation comme un indice supplémentaire soulignant le découplage entre la réduction de la photosynthèse et la diminution de croissance des parties aériennes. Ainsi, l'impact différentiel de la contrainte hydrique sur la croissance foliaire et la photosynthèse provoque dans les parties aériennes une accumulation de sucres dont une partie non investie dans la croissance foliaire est allouée vers la racine, contribuant ainsi à l'augmentation l'export de carbone vers la racine (**Chapitre IV**).

2.3 La réallocation du carbone vers la racine est probablement supportée par la régulation de l'expression des transporteurs de saccharose

2.3.1 … dans la rosette

Après avoir démontré que la contrainte hydrique favorisait l'investissement du carbone dans la racine comme le supposait Hummel *et al.* (2010), nous avons observé que l'expression des principaux transporteurs de saccharose impliqués dans le chargement du phloème (*AtSUC2*, *AtSWEET11* et *AtSWEET12*) au niveau de la rosette était augmentée probablement pour soutenir la hausse de l'export de carbone vers la racine. Ainsi, nous avons démontré que l'expression des transporteurs de saccharose impliqués dans le chargement du phloème est stimulée quand la force de puits augmentait, soulignant le lien étroit entre relations source-puits et expression des transporteurs de saccharose (**Chapitre IV**).

2.3.2 …mais aussi dans la racine

Parallèlement à la réallocation du carbone assimilé vers la racine, nous avons observé que la contrainte hydrique stimulait principalement l'expression d'*AtSUC2* et d'*AtSWEET11-15* dans la racine. Nous avons alors émis l'hypothèse que l'augmentation de l'expression de

ces transporteurs pourrait contribuer à drainer le flux de carbone vers la racine au vu du rôle démontré et/ou putatif de chacun de ces transporteurs (**Chapitre IV**).

Cette hypothèse apparaît d'autant plus sensée que ces mêmes transporteurs (excepté *AtSWEET14*) voient leur expression réduite dans la racine soumise à la contrainte osmotique, contrainte à l'issue de laquelle la capacité exportatrice des feuilles sources est réduite (**Chapitre III**).

Ainsi, l'expression des transporteurs de saccharose dans la racine serait particulièrement régulée par le flux de carbone provenant de la rosette (**Chapitre V**).

3 Quel pourrait être le rôle des transporteurs de saccharose dans la racine ?

A partir de l'analyse de l'expression des transporteurs de saccharose dans la racine en réponse aux contraintes osmotique et hydrique, nous avons décidé d'étudier en détail les transporteurs *AtSUC1*, *AtSUC2*, *AtSWEET11* et *AtSWEET12*. Ces 4 transporteurs peuvent être scindés en deux groupes : un premier groupe uniquement composé d'*AtSUC1* dont l'expression est réduite en réponse aux deux contraintes, et un second groupe composé des transporteurs *AtSUC2*, *AtSWEET11* et *AtSWEET12* dont l'expression est respectivement réduite et stimulée en réponse aux contraintes osmotique et hydrique.

3.1 *AtSUC1* : un rôle éventuel dans l'expansion cellulaire racinaire ?

La racine du mutant KO *suc1* ne présentant pas de phénotype morphologique, son développement n'a donc pas été étudié en détail. Toutefois, nous avons découvert l'existence d'une éventuelle complémentation fonctionnelle par le gène *AtSUC5* dans le mutant *suc1*, expliquant potentiellement l'absence de phénotype racinaire notable (**Chapitre VI**).

En revanche, nous avons montré que le gène *AtSUC1* était exclusivement exprimé dans les zones de la racine en croissance, plus particulièrement au niveau des zones de transition et d'élongation de la racine. Cette localisation suggère que la présence du transporteur AtSUC1 est étroitement liée au développement racinaire, plus particulièrement au niveau de l'expansion cellulaire, comme cela a été montré dans le cas de la croissance du tube pollinique (Sivitz *et al.*, 2008). Un tel rôle serait conforme avec la répression d'*AtSUC1* dans la racine en réponse aux contraintes hydrique et osmotique, deux contraintes réduisant la croissance racinaire (**Chapitre VI**).

3.2 *AtSUC2* : un rôle dans le développement racinaire en participant au rechargement et/ou au déchargement du saccharose?

Si la présence d'*AtSUC2* est indispensable dans les feuilles d'*A. thaliana*, son absence dans les racines est certes préjudiciable mais pas létale, confirmant le rôle prédominant de la rosette sur le développement racinaire *via* l'apport de sucres (**Chapitre VII**).

Nous avons montré que le développement plus faible de la racine n'exprimant pas *AtSUC2* en présence d'une rosette Col-0 était concordant avec la fonction de rechargement du phloème d'AtSUC2, fonction participant au maintien de la vitesse du flux de sève phloémienne. De plus, l'existence de cette fonction est en accord avec la localisation de l'expression d'*AtSUC2* dans le phloème des racines adultes. Nous avons aussi retrouvé une expression particulièrement prononcée dans les pointes racinaires au niveau de la zone de terminaison de croissance, suggérant un rôle pour AtSUC2 dans le déchargement des sucres en ce lieu, fonction de déchargement déjà décrite pour ZmSUT1, son homologue chez le maïs. Un tel rôle pourrait expliquer le plus faible développement de la racine dépourvue d'*AtSUC2* en présence d'une rosette Col-0 (**Chapitre VII**).

Enfin, pour la première fois, nous avons montré que l'expression d'*AtSUC2* était particulièrement prononcée au niveau des zones de départ des racines latérales, ce qui laisse supposer un rôle putatif pour AtSUC2 dans le transfert apoplastique du saccharose depuis le phloème de la racine principale vers le phloème de la racine latérale **Chapitre VII**).

3.3 *AtSWEET11* et *AtSWEET12* pourraient contribuer à nourrir les tissus environnant les tissus conducteurs

Nous avons observé que la mutation d'*AtSWEET11* et d'*AtSWEET12* confinée à la racine n'avait guère d'influence sur l'accumulation de biomasse et sur la compartimentation des sucres solubles de la racine (**Chapitre VIII**).

En ce qui concerne la localisation de l'expression de ces transporteurs, nous avons montré qu'*AtSWEET11* était particulièrement exprimé dans les parties de la racine dotée de tissus secondaires, suggérant un rôle pour ce transporteur dans l'apport de sucres pour la formation de ce tissu comme cela a déjà pu être montré dans la hampe florale (Le Hir *et al.*, 2015). Nous avons aussi observé que l'expression d'*AtSWEET11* était notamment localisée au niveau des zones de départ des racines latérales où l'expression d'*AtSUC2* était également

détectée, ce qui suggèrerait un fonctionnement en tandem pour ces deux transporteurs dans la racine comme c'est le cas dans la feuille (**Chapitre VIII**).

Quant à *AtSWEET12*, nous avons constaté qu'il était particulièrement exprimé au niveau des pointes racinaires à partir de la zone d'élongation de la racine ainsi que dans la stèle des zones adultes de la racine dans une moindre mesure. De ce fait, AtSWEET12 pourrait, tout comme AtSWEET11, être impliqué dans la diffusion des sucres depuis le phloème de transport pour nourrir les tissus environnants dans les zones adultes de la racine. De façon intéressante, nous avons observé que l'expression d'*AtSWEET12* était retrouvée à proximité de celle d'*AtSUC2* au niveau des pointes racinaires, des zones de déchargements des sucres. AtSWEET12, en collaboration avec AtSUC2 alors en mode déchargement, pourrait participer à la diffusion des sucres déchargés depuis le phloème (**Chapitre VIII**).

4 Développement d'outils pour l'étude de la racine et des relations source-puits

Nous avons développé un outil intéressant pour l'étude du compartiment racinaire de plantes cultivées au contact d'un « vrai » sol: la rhizobox. Nous avons par la suite mis au point un protocole d'application de la contrainte hydrique suffisant pour altérer le développement des plantes. Toutefois, la rhizobox est aussi compatible avec l'application de la contrainte saline ou encore de carences en certains nutriments. En parallèle, nous avons aussi conçu un système d'assimilation du $^{14}CO_2$ spécifiquement conçu pour la rhizobox afin d'étudier les relations source-puits pour le carbone entre rosette et racine. C'est d'ailleurs à partir des autoradiographies des racines générées à l'issue des expériences de « pulse-chase » du ^{14}C que nous avons pu étudier en détail le RSA des plantes. Cependant ceci a nécessité la mise en place d'un protocole qui reste néanmoins chronophage. A partir de ce protocole, il nous a été possible de mesurer la longueur du système racinaire et de modéliser sa forme moyenne ce qui nous a permis de conclure que le RSA était modifié en réponse à la contrainte hydrique, contribuant vraisemblablement à améliorer l'exploration du sol et à optimiser l'absorption d'eau en profondeur, pour un coût métabolique acceptable.

5 Perspectives

Si le travail effectué a répondu à plusieurs questions initialement posées, certains points n'ont pu être traités et d'autres interrogations sont apparues. C'est pourquoi plusieurs perspectives sont envisageables à court et à moyen terme.

5.1 Quelle est la localisation cellulaire de l'expression des transporteurs de saccharose ?

Une partie du travail de thèse effectué a concerné la localisation de l'expression des gènes codant des transporteurs de saccharose dans la racine (*AtSUC1*, *AtSUC2*, *AtSWEET11* et *AtSWEET12*), travail nécessaire quant à la détermination de la fonction de chacun. Si nous avons apporté une vision macroscopique de l'expression des transporteurs étudiés dans la racine grâce à l'utilisation des rhizobox, nous n'avons, excepté pour AtSUC2 (dans une certaine mesure), pu définir le ou les types cellulaires concernés par l'expression de ces transporteurs, même si des coupes transversales de racines de plantes GUS sont actuellement en cours d'obtention.

Les premières informations tendent à confirmer la localisation dans les cellules adjacentes au xylème pour *AtSWEET11* et *AtSWEET12* dans la racine principale. Concernant AtSUC2, nous avons de fortes suspicions quant à une localisation dans les cellules compagnes du phloème. Toutefois, il manque encore le contrôle avec l'anticorps anti-RS6 ou bien tout autre anticorps spécifique de la cellule criblée afin de confirmer de manière certaine cette localisation. Il est bien sur prévu d'étudier en détail les zones de départ des racines latérales présentant une expression marquée des gènes *AtSUC2* et *AtSWEET11*.

5.2 Déterminer le rôle de la racine dans les relations source-puits pour le carbone

Nous avons montré que la réorientation de l'export du carbone vers la racine est accompagnée d'une part (1) par l'expression accrue des transporteurs de saccharose impliqués dans le chargement du phloème dans la rosette mais aussi (2) de la hausse de l'expression de ces mêmes transporteurs dans la racine, où ils y auraient un rôle putatif dans le déchargement du phloème et/ou la compartimentation des sucres.

Toutefois, s'il est vraisemblable de penser que la capacité source de la rosette est en partie responsable de l'allocation du carbone vers la racine, qu'en est il de la racine et de sa force de puits ? Se peut il que la racine participe à l'augmentation de l'export en attirant les sucres ? En effet la contrainte hydrique semble stimuler la capacité source de la rosette, mais il ne peut être exclu que la force de puits de la racine soit accrue pour maintenir et/ou favoriser l'augmentation de l'export en carbone. L'activité invertasique pariétale est un bon révélateur de la force de puits et devra être mesurée dans la racine en réponse à la contrainte hydrique. Les premières mesures réalisées récemment et devant donc être confirmées, montrent effectivement une augmentation de l'activité invertasique dans la racine soumise au

manque d'eau. Cette hausse de l'activité invertasique pariétale est même accompagnée de la hausse de l'expression génique d'une des deux invertases pariétales exprimées dans la racine, *AtINV5*. De ce fait, il conviendrait de déterminer les conséquences au niveau des relations source-puits pour le carbone de la mutation KO d'un tel gène, premièrement au niveau de la plante puis dans un second temps, confinée à la racine (grâce aux micro-greffes), et ce en régime hydrique classique et restreint.

5.3 Quelle est la structure anatomique du complexe de chargement du phloème et du phloème de transport ?

Etant donné que l'export de carbone depuis la feuille vers la racine est augmenté, des analyses de l'ultra-structure en microscopie électronique du complexe de chargement vont être initiées. Nous supposons en effet l'existence d'invaginations au niveau du plasmalemme des cellules de parenchyme phloémien qui seraient mises en place pour soutenir le chargement du phloème quand la capacité source de la rosette est accrue. De même l'analyse de l'ultra-structure de la racine sera aussi étudiée. D'ailleurs, les premières analyses de coupes transversales de la racine primaire ont montré une réduction du diamètre des vaisseaux du xylème dans les plantes stressées et ceci sera donc à confirmer.

5.4 Quel est le devenir de l'excédent de carbone exporté vers la racine ?

Nous avons démontré que l'export de carbone radiomarqué vers la racine était relativement stimulé en réponse à la contrainte hydrique. Toutefois, il semblerait que l'export de carbone vers la racine reste supérieur à la demande en carbone pour la croissance racinaire, ce qui aboutit à une accumulation de carbone dans la racine soumise à la contrainte hydrique. Etant donné que la chasse effectuée après le « pulse » était courte, nous n'avons pas détecté de radioactivité dans le sol que ce soit en condition « témoin » ou « stressée ». C'est pourquoi il conviendrait d'allonger la période de chasse afin de mesurer l'efflux de ^{14}C dans le sol dans les deux conditions.

La contrainte hydrique appliquée générant une réallocation du carbone vers la racine dont seulement une partie est investie dans la croissance racinaire, il ne peut être exclu qu'une autre partie de ce carbone soit relarguée dans le milieu extérieur pour faciliter l'absorption de certains éléments minéraux (ex : acides organiques) et aussi pour recruter certains micro-organismes. Relâcher du carbone dans le milieu extérieur peut en effet être utile pour faciliter la mobilisation de nutriments (Nguyen, 2003), aider la croissance racinaire par la présence d'un mucilage lubrifiant (Henry *et al.*, 2007) et augmenter la capacité au champ du sol

(Walker *et al.*, 2003). Il est aussi clairement admis que la plante interagit avec les micro-organismes du sol afin de sélectionner la population de la rhizosphère (Badri *et al.*, 2013; Chaparro *et al.*, 2013). La facilité d'accès à la racine et à la rhizosphère obtenue grâce au recours à la rhizobox a permis une première étude du rhizobiome d'*A. thaliana*. Il est envisagé de poursuivre l'étude engagée sur le rhizobiome d'*A. thaliana,* cultivé en rhizobox lors des deux contraintes. Les personnels et compétences nécessaires à ce type d'étude existent au sein de l'UMR EBI.

5.5 Vers une caractérisation de la fonction des transporteurs de saccharose dans la racine

Enfin, nous avons observé que plusieurs gènes de transporteurs de saccharose sont surexprimés dans la racine en réponse à la contrainte hydrique. L'étude de la mutation KO des transporteurs concernés (*AtSUC2*, *AtSWEET11*, *AtSWEET12*) confinée à la racine que nous avons menée *via* des micro-greffes a mis en lumière qu'AtSUC2 était peut-être associé au développement de la racine, probablement en aidant au déchargement des sucres. Toutefois, il convient de réitérer ces expérimentations, le nombre de plantes considérées étant trop faible. Les expérimentations de micro-greffe ont en effet été effectuées sur un grand nombre de génotypes pour n'écarter aucune hypothèse et le nombre de rhizobox étant encore limité, le nombre de plantes par condition a été restreint. Les études se focaliseront certainement sur les plantes *suc2*F par la suite afin de confirmer la réduction de l'accumulation de biomasse de la racine n'exprimant pas *AtSUC2*. En parallèle, plusieurs contrôles n'ont pas été effectués concernant les micro-greffes, et devront donc être réalisés.

Concernant le double mutant KO *sweet11-12*, il est apparu que la double mutation KO d'*AtSWEET11* et d*'AtSWEET12* limitée à la racine n'affectait guère son développement ou son statut glucidique en condition de régime hydrique classique, suggérant que l'expression n'était pas requise pour le bon développement de la racine. Néanmoins, il convient de ne pas omettre que ces deux transporteurs seraient particulièrement actifs dans la racine soumise à la contrainte hydrique. Aussi, il est envisagé de réaliser les micro-greffes dans un contexte de carence hydrique, plus susceptible de mettre en lumière un éventuel phénotype racinaire. En cas d'observation de phénotype racinaire pour les plantes greffées cultivées en régime hydrique restreint, l'étude de la répartition du ^{14}C dans la plante sera effectuée *via* le dispositif d'assimilation mis en place spécifiquement pour les rhizobox.

Enfin, comme cela a pu être discuté précédemment, il existerait une certaine redondance fonctionnelle parmi les *AtSWEET* du clade III, nous envisageons donc la génération du triple mutant KO *sweet11-12-13* puisque le gène *AtSWEET13* présente une expression prononcée dans la racine.

Les gènes *AtSWEET* ne sont d'ailleurs pas les seuls gènes concernés par plus qu'une simple mutation KO. Nous avons en effet suggéré une éventuelle complémentation fonctionnelle par *AtSUC5* dans le mutant *suc1*. C'est pourquoi nous avons actuellement entrepris l'obtention du double mutant KO *suc1*/*suc5* en ayant recours à la technique CRISPR/CAS9, les deux gènes étant situées côte à côte dans le génome d'*A. thaliana* ce qui rend impossible toute obtention d'un double mutant par allo-fécondation.

6 En conclusion

En accord avec la question initiale, nous avons démontré que la contrainte hydrique stimulait l'export de carbone vers la racine dans notre système de culture, la rhizobox. Nous avons montré que la réallocation du carbone passait très probablement par une modification de la synthèse des sucres dans la rosette et un ajustement de la régulation de l'expression des transporteurs de saccharose non seulement dans la rosette mais aussi dans la racine. De ce fait, nous avons vraisemblablement identifié les transporteurs potentiellement impliqués dans l'allocation du carbone au niveau de la racine. Toutefois, il reste encore à déterminer la fonction exacte de ces transporteurs dans la racine et cela va nécessiter un travail important sur la localisation de l'expression de ces transporteurs et sur les mutants KO (simple, double, triple) de ces mêmes transporteurs.

Enfin, ces travaux s'inscrivent pleinement dans la thématique de recherche de l'équipe SEVE, et plus particulièrement au sein de l'axe « Interaction Plante/Contrainte hydrique ». Toutefois, l'ingéniosité du système de culture développé pour l'étude spécifique du compartiment racinaire ouvre la voie vers de nouvelles thématiques et notamment l'étude de la rhizosphère dans un contexte environnemental contraint.

X. Références bibliographiques

Abadie C. 2012. Exploration de la variabilité phénotypique d'Arabidopsis thaliana (L.) Heynh et caractérisation de l'effet d'un deficit hyrique sur la photosynthèse et le contenu glucidique foliaire des écotypes Col-0, MT-0 et Shadara, Université de Poitiers.

Afoufa-Bastien D, Medici A, Jeauffre J, Coutos-Thévenot P, Lemoine R, Atanassova R, Laloi M. 2010. The Vitis vinifera sugar transporter gene family: phylogenetic overview and macroarray expression profiling. *BMC plant biology* **10**, 245.

Aguirrezabal L, Bouchier-Combaud S, Radziejwoski A, Dauzat M, Cookson SJ, Granier C. 2006. Plasticity to soil water deficit in Arabidopsis thaliana: dissection of leaf development into underlying growth dynamic and cellular variables reveals invisible phenotypes. *Plant, Cell and Environment* **29**, 2216-2227.

Ainsworth EA, Bush DR. 2011. Carbohydrate export from the leaf: a highly regulated process and target to enhance photosynthesis and productivity. *Plant Physiol* **155**, 64-69.

Alexandersson E, Fraysse L, Sjovall-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, Johanson U, Kjellbom P. 2005a. Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Mol Biol* **59**, 469-484.

Alexandersson E, Fraysse L, Sjövall-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, Johanson U, Kjellbom P. 2005b. Whole Gene Family Expression and Drought Stress Regulation of Aquaporins. *Plant Molecular Biology* **59**, 469-484.

Aluri S, Buttner M. 2007. Identification and functional expression of the Arabidopsis thaliana vacuolar glucose transporter 1 and its role in seed germination and flowering. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 2537-2542.

Angeles-Núñez JG, Tiessen A. 2011. Mutation of the transcription factor LEAFY COTYLEDON 2 alters the chemical composition of Arabidopsis seeds, decreasing oil and protein content, while maintaining high levels of starch and sucrose in mature seeds. *Journal of Plant Physiology* **168**, 1891-1900.

Antony G, Zhou J, Huang S, Li T, Liu B, White F, Yang B. 2010. Rice xa13 Recessive Resistance to Bacterial Blight Is Defeated by Induction of the Disease Susceptibility Gene Os-11N3. *The Plant Cell Online* **22**, 3864-3876.

Arteca RN, Arteca JM. 2000. A novel method for growing Arabidopsis thaliana plants hydroponically. *Physiologia Plantarum* **108**, 188-193.

Ayre BG. 2011. Membrane-Transport Systems for Sucrose in Relation to Whole-Plant Carbon Partitioning. *Molecular Plant* **4**, 377-394.

Badri DV, Chaparro JM, Zhang R, Shen Q, Vivanco JM. 2013. Application of natural blends of phytochemicals derived from the root exudates of Arabidopsis to the soil reveal that phenolic-related compounds predominantly modulate the soil microbiome. *J Biol Chem* **288**, 4502-4512.

Badri DV, Vivanco JM. 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ* **32**, 666-681.

Baker FR, Leach KA, Braun DM. 2012. SWEET as Sugar: New Sucrose Effluxers in Plants. *Molecular Plant* **5**, 766-768.

Bao Y, Aggarwal P, Robbins NE, II, Sturrock CJ, Thompson MC, Tan HQ, Tham C, Duan L, Rodriguez PL, Vernoux T, Mooney SJ, Bennett MJ, Dinneny JR. 2014. Plant

roots use a patterning mechanism to position lateral root branches toward available water. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 9319-9324.

Barker L, Kühn C, Weise A, Schulz A, Gebhardt C, Hirner B, Hellmann H, Schulze W, Ward JM, Frommer WB. 2000. SUT2, a Putative Sucrese Sensor in Sieve Elements. *The Plant Cell* **12**, 1153-1164.

Bartholomew DM, Bartley GE, Scolnik PA. 1991. Abscissic Acid Control of rbcS and cab Transcription in Tomato Leaves. *Plant Physiology* **96**, 291-296.

Baud S, Dubreucq B, Miquel M, Rochat C, Lepiniec L. 2008. Storage reserve accumulation in Arabidopsis: metabolic and developmental control of seed filling. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists* **6**.

Baud S, Wuillème S, Lemoine R, Kronenberger J, Caboche M, Lepiniec L, Rochat C. 2005. The AtSUC5 sucrose transporter specifically expressed in the endosperm is involved in early seed development in Arabidopsis. *The Plant Journal* **43**, 824-836.

Bihmidine S, Hunter CT, 3rd, Johns CE, Koch KE, Braun DM. 2013. Regulation of assimilate import into sink organs: update on molecular drivers of sink strength. *Front Plant Sci* **4**, 177.

Blackman PG, Davies WJ. 1985. Root to Shoot Communication in Maize Plants of the Effects of Soil Drying. *Journal of Experimental Botany* **36**, 39-48.

Boursiac Y, Chen S, Luu D-T, Sorieul M, van den Dries N, Maurel C. 2005a. Early Effects of Salinity on Water Transport in Arabidopsis Roots. Molecular and Cellular Features of Aquaporin Expression. *Plant Physiology* **139**, 790-805.

Boursiac Y, Chen S, Luu DT, Sorieul M, van den Dries N, Maurel C. 2005b. Early effects of salinity on water transport in Arabidopsis roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiol* **139**, 790-805.

Boyer JS. 1982. Plant Productivity and Environment. *Science* **218**, 443-448.

Boyer JS, Silk WK, Watt M. 2010. Path of water for root growth. *Functional Plant Biology* **37**, 1105-1116.

Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Görlach J. 2001. Growth Stage–Based Phenotypic Analysis of Arabidopsis: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants. *The Plant Cell* **13**, 1499-1510.

Brauner K, Hormiller I, Nagele T, Heyer AG. 2014. Exaggerated root respiration accounts for growth retardation in a starchless mutant of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **79**, 82-91.

Bray EA. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* **2**, 48-54.

Bray EA. 2004. Genes commonly regulated by water-deficit stress in Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2331-2341.

Bresson J, Varoquaux F, Bontpart T, Touraine B, Vile D. 2013. The PGPR strain Phyllobacterium brassicacearum STM196 induces a reproductive delay and physiological changes that result in improved drought tolerance in Arabidopsis. *New Phytol* **200**, 558-569.

Buchanan-Wollaston V. 1997. The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **48**, 181-199.

Büttner M. 2007. The monosaccharide transporter(-like) gene family in Arabidopsis. *FEBS Letters* **581**, 2318-2324.

Büttner M. 2010. The Arabidopsis sugar transporter (AtSTP) family: an update. *Plant Biology* **12**, 35-41.

Büttner M, Truernit E, Scholz-Starke J, Sontheim M, Lauterbach C, Huss VAR, Sauer N. 2000. The Sink-Specific and Stress-Regulated Arabidopsis SPP4 Gene: Enhanced Expression of a Gene Encoding a Monosaccharide Transporter by Wounding, Elicitors, and Pathogen Challenge. *Plant, Cell and Environment* **23**, 175-184.

Carpaneto A, Geiger D, Bamberg E, Sauer N, Fromm J, Hedrich R. 2005. Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier ZmSUT1 mediates sucrose efflux under the control of the sucrose gradient and the proton motive force. *J Biol Chem* **280**, 21437-21443.

Carpita N, Sabularse D, Montezinos D, Delmer DP. 1979. Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. *Science* **205**, 1144-1147.

Casimiro I, Beeckman T, Graham N, Bhalerao R, Zhang H, Casero P, Sandberg G, Bennett MJ. 2003. Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends in Plant Science* **8**, 165-171.

Cha-um S, Charoenpanich A, Roytrakul S, Kirdmanee C. 2009. Sugar accumulation, photosynthesis and growth of two indica rice varieties in response to salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum* **31**, 477-486.

Chaparro JM, Badri DV, Bakker MG, Sugiyama A, Manter DK, Vivanco JM. 2013. Root exudation of phytochemicals in Arabidopsis follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. *PLoS ONE* **8**, e55731.

Chardon F, Bedu M, Calenge F, Klemens Patrick AW, Spinner L, Clement G, Chietera G, Léran S, Ferrand M, Lacombe B, Loudet O, Dinant S, Bellini C, Neuhaus HE, Daniel-Vedele F, Krapp A. 2013. Leaf Fructose Content Is Controlled by the Vacuolar Transporter SWEET17 in Arabidopsis. *Current Biology* **23**, 697-702.

Chaudhuri B, Hörmann F, Lalonde S, Brady SM, Orlando DA, Benfey P, Frommer WB. 2008. Protonophore- and pH-insensitive glucose and sucrose accumulation detected by FRET nanosensors in Arabidopsis root tips. *The Plant Journal* **56**, 948-962.

Chauhan S, Forsthoefel N, Ran Y, Quigley F, Nelson DE, Bohnert HJ. 2000. Na+/myo-inositol symporters and Na+/H+-antiport in Mesembryanthemum crystallinum. *The Plant Journal* **24**, 511-522.

Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS. 2003. Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* **30**, 239-264.

Chaves MM, Pereira JS, Maroco J, Rodriguez ML, Ricardo CPP, Osorio ML, Carvalho I, Faria T, Pinheiro C. 2002. How Plants Cope with Stress in the Fields. Photosynthesis and Growth. *Annals of Botany* **89**, 907-916.

Chazen O, Neumann PM. 1994. Hydraulic Signals from the Roots and Rapid Cell-Wall Hardening in Growing Maize (Zea mays 1.) Leaves Are Primary Responses to Polyethylene Clycol-lnduced Water Def icits. *Plant Physiology* **104**, 1385-1392.

Chen H, Jiang J-G. 2010. Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity. *Environmental Reviews* **18**, 309-319.

Chen HY, Huh JH, Yu YC, Ho LH, Chen LQ, Tholl D, Frommer WB, Guo WJ. 2015a. The Arabidopsis vacuolar sugar transporter SWEET2 limits carbon sequestration from roots and restricts Pythium infection. *Plant J* **83**, 1046-1058.

Chen L-Q. 2013. SWEET sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition. *New phytologist*, n/a-n/a.

Chen L-Q, Hou B-H, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu X-Q, Guo W-J, Kim J-G, Underwood W, Chaudhuri B, Chermak D, Antony G, White FF, Somerville SC, Mudgett MB, Frommer WB. 2010. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **468**, 527-532.

Chen LQ, Lin IW, Qu XQ, Sosso D, McFarlane HE, Londono A, Samuels AL, Frommer WB. 2015b. A cascade of sequentially expressed sucrose transporters in the seed coat and endosperm provides nutrition for the Arabidopsis embryo. *Plant Cell* **27**, 607-619.

Chen LQ, Qu XQ, Hou BH, Sosso D, Osorio S, Fernie AR, Frommer WB. 2012. Sucrose Efflux Mediated by SWEET Proteins as a Key Step for Phloem Transport. *Science* **335**, 207-211.

Chen Z, Hong X, Zhang H, Wang Y, Li X, Zhu JK, Gong Z. 2005. Disruption of the cellulose synthase gene, AtCesA8/IRX1, enhances drought and osmotic stress tolerance in Arabidopsis. *Plant J* **43**, 273-283.

Chiou T-J, Bush DR. 1998. Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 4784-4788.

Cho M-H, Lim H, Shin DH, Jeon J-S, Bhoo SH, Park Y-I, Hahn T-R. 2011. Role of the plastidic glucose translocator in the export of starch degradation products from the chloroplasts in Arabidopsis thaliana. *New phytologist* **190**, 101-112.

Christophe A, Letort V, Hummel I, Cournède P-H, de Reffye P, Lecœur J. 2008. A model-based analysis of the dynamics of carbon balance at the whole-plant level inArabidopsis thaliana. *Functional Plant Biology* **35**, 1147.

Clark RT, Famoso AN, Zhao K, Shaff JE, Craft EJ, Bustamante CD, McCouch SR, Aneshansley DJ, Kochian LV. 2013. High-throughput two-dimensional root system phenotyping platform facilitates genetic analysis of root growth and development. *Plant Cell Environ* **36**, 454-466.

Comas LH, Becker SR, Cruz VMV, Byrne PF, Dierig DA. 2013. Root traits contributing to plant productivity under drought. *Frontiers in Plant Science* **4**, 442.

Cornic G. 2000. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture – not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science* **5**, 187-188.

Cramer GR, Ergul A, Grimplet J, Tillett RL, Tattersall EA, Bohlman MC, Vincent D, Sonderegger J, Evans J, Osborne C, Quilici D, Schlauch KA, Schooley DA, Cushman JC. 2007. Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Funct Integr Genomics* **7**, 111-134.

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

Dasgupta K, Khadilkar AS, Sulpice R, Pant B, Scheible WR, Fisahn J, Stitt M, Ayre BG. 2014. Expression of Sucrose Transporter cDNAs Specifically in Companion Cells Enhances Phloem Loading and Long-Distance Transport of Sucrose but Leads to an Inhibition of Growth and the Perception of a Phosphate Limitation. *Plant Physiol* **165**, 715-731.

Davies WJ, Mansfield TA, Hetherington AM. 1990. Sensing of soil water status and the regulation of plant growth and development. *Plant Cell Environ* **13**, 709-719.

Davies WJ, Zhang J. 1991. ROOT SIGNALS AND THE REGULATION OF GROWTH AND DEVELOPMENT OF PLANTS IN DRYING SOIL. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**, 55-76.

Deak KI, Malamy J. 2005. Osmotic regulation of root system architecture. *The Plant Journal* **43**, 17-28.

Deng X, Joly RJ, Hahn DT. 1990. The influence of plant water deficit on photosynthesis and translocation of 14C-labeled assimilates in cacao seedlings. *Physiologia Plantarum* **78**, 623-627.

Devienne-Barret F, Richard-Molard C, Chelle M, Maury O, Ney B. 2006. Ara-rhizotron: An effective culture system to study simultaneously root and shoot development of Arabidopsis. *Plant and Soil* **280**, 253-266.

Diaz C, Lemaître T, Christ A, Azzopardi M, Kato Y, Sato F, Morot-Gaudry J-F, Le Dily F, Masclaux-Daubresse C. 2008. Nitrogen Recycling and Remobilization Are Differentially Controlled by Leaf Senescence and Development Stage in Arabidopsis under Low Nitrogen Nutrition. *Plant Physiology* **147**, 1437-1449.

Diaz C, Purdy S, Christ A, Morot-Gaudry J-F, Wingler A, Masclaux-Daubresse C. 2005. Characterization of Markers to Determine the Extent and Variability of Leaf Senescence in Arabidopsis. A Metabolic Profiling Approach. *Plant Physiology* **138**, 898-908.

Diaz-Mendoza M, Velasco-Arroyo B, Gonzalez-Melendi P, Martinez M, Diaz I. 2014. C1A cysteine protease-cystatin interactions in leaf senescence. *J Exp Bot* **65**, 3825-3833.

Dinant S, Lemoine R. 2010. The phloem pathway: New issues and old debates. *Comptes Rendus Biologies* **333**, 307-319.

Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B. 1993. Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development* **119**, 71-84.

Earley EJ, Ingland B, Winkler J, Tonsor SJ. 2009. Inflorescences contribute more than rosettes to lifetime carbon gain in Arabidopsis thaliana (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **96**, 786-792.

El‐Lithy ME, Reymond M, Stich B, Koornneef M, Vreugdenhil D. 2010. Relation among plant growth, carbohydrates and flowering time in the Arabidopsis Landsberg erecta× Kondara recombinant inbred line population. *Plant Cell Environ* **33**, 1369-1382.

Endler A, Meyer S, Schelbert S, Schneider T, Weschke W, Peters SW, Keller F, Baginsky S, Martinoia E, Schmidt U. 2006. Identification of a Vacuolar Sucrose Transporter in Barley and Arabidopsis Mesophyll Cells by a Tonoplast Proteomic Approach. *Plant Physiology* **141**, 196-207.

Engel ML. 2005. Green Sperm. Identification of Male Gamete Promoters in Arabidopsis. *Plant Physiology* **138**, 2124-2133.

Eom JS, Chen LQ, Sosso D, Julius BT, Lin IW, Qu XQ, Braun DM, Frommer WB. 2015. SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. *Curr Opin Plant Biol* **25**, 53-62.

Evert RF, Eschrich W, W. H. 1978. Leaf Structure in Relation to Solute Transport and Phloem Loading in Zea mays L. *Planta* **138**, 279-294.

Farrar JF. 1993. Carbon partitioning. *Photosynthesis and Production in a Changing Environment*: Springer, 232-246.

Farrar JF, Jones DL. 2000. The control of carbon acquisition by roots. *New phytologist* **147**, 43-53.

Fatichi S, Leuzinger S, Koerner C. 2014. Moving beyond photosynthesis: from carbon source to sink‐driven vegetation modeling. *New phytologist* **201**, 1086-1095.

Fischer K, Weber A. 2002. Transport of carbon in non-green plastids. *Trends in Plant Science* **7**, 345-351.

Flexas J, Bota J, Galmés J, Medrano H, Ribas-Carbó M. 2006a. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiologia Plantarum* **127**, 343-352.

Flexas J, Ribas-Carbo M, Bota J, Galmes J, Henkle M, Martinez-Canellas S, Medrano H. 2006b. Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO2 concentration. *New Phytol* **172**, 73-82.

Fliege R, Flügge U-I, Werdan K, Heldt HW. 1978. SPECIFIC TRANSPORT OF INORGANIC PHOSPHATE, 3-PHOSPHOGLYCERATE AND TRIOSEPHOSPHATES ACROSS THE INNER MEMBRANE OF THE ENVELOPE IN SPINACH CHLOROPLASTS. *Biochimica et Biophysica Acta* **502**, 232-247.

Flügge U-I, Fisher K, Gross A, Sebald W, Lottspeich F, Eckerskorn C. 1989. The triose phosphate-3-phosphoglycerate -phosphate translocator from spinach chloroplasts: nucleotide sequence of a full-length cDNA clone and import of the in vitro synthesized precursor protein into chloroplasts. *The EMBO Journal* **8**, 39-46.

Freixes S, Thibaud M-C, Tardieu F, Muller B. 2002. Root elongation and branching is related to local hexose concentration in Arabidopsis thaliana seedlings. *Plant, Cell and Environment* **25**, 1357-1366.

Gan S, Amasino RM. 1995. Inhibition of Leaf Senescence by Autoregulated Production of Cytokinin. *Science* **270**, 1986-1988.

Gao Z, Maurousset L, Lemoine R, Yoo S-D, Van Nocker S, Loescher W. 2003. Cloning, Expression, and Characterization of Sorbitol Transporters from Developing Sour Cherry Fruit and Leaf Sink Tissues. *Plant Physiology* **131**, 1566-1575.

Geiger D. 2011. Plant Sucrose Transporters from a Biophysical Point of View. *Molecular Plant* **4**, 395-406.

Geiger DR, Sovonick SA, Shock TL, Fellows RJ. 1974. Role of Free Space in Translocation in Sugar Beet. *Plant Physiology* **54**, 892-898.

Giaquinta RT. 1979. Phloem Loading of Sucrose. *Plant Physiology* **63**, 744-748.

Gibeaut DM, Hulett J, Cramer GR, Seemann JR. 1997. Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using simple, law-maintenance Hydroponic method and favorable environmental conditions. *Plant Physiology* **115**, 317-319.

Gibon Y, Pyl ET, Sulpice R, Lunn JE, Hohne M, Gunther M, Stitt M. 2009. Adjustment of growth, starch turnover, protein content and central metabolism to a decrease of the carbon supply when Arabidopsis is grown in very short photoperiods. *Plant Cell Environ* **32**, 859-874.

Gibon Y, Usadel B, Blaesing OE, Kamlage B, Hoehne M, Trethewey R, Stitt M. 2006. Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal cycles in Arabidopsis rosettes. *Genome biology* **7**, R76.

Gifford RM, Thorne JH, Hitz WD, Giaquinta RT. 1984. Crop productivity and photoassimilate partitioning. *Science* **225**, 801-808.

Gong X, Liu M, Zhang L, Ruan Y, Ding R, Ji Y, Zhang N, Zhang S, Farmer J, Wang C. 2015. Arabidopsis AtSUC2 and AtSUC4, encoding sucrose transporters, are required for abiotic stress tolerance in an ABA-dependent pathway. *Physiol Plant* **153**, 119-136.

Gottwald JR, Krysan PJ, Young JC, Evert RF, Sussman MR. 2000a. Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 13979-13984.

Gottwald JR, Krysan PJ, Young JC, Evert RF, Sussman MR. 2000b. Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13979-13984.

Gould N, Thorpe MR, Pritchard J, Christeller JT, Williams LE, Roeb G, Schurr U, Minchin PE. 2012. AtSUC2 has a role for sucrose retrieval along the phloem pathway: evidence from carbon-11 tracer studies. *Plant Sci* **188-189**, 97-101.

Gowing DJG, Davies WJ, Jones HG. 1990. A Positive Root-sourced Signal as an Indicator of Soil Drying in Apple, Malus x domestica Borkh. *Journal of Experimental Botany* **41**, 1535-1540.

Graf A, Schlereth A, Stitt M, Smith AM. 2010. Circadian control of carbohydrate availability for growth in Arabidopsis plants at night. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 9458-9463.

Graf A, Smith AM. 2011. Starch and the clock: the dark side of plant productivity. *Trends in Plant Science* **16**, 169-175.

Guan YF, Huang XY, Zhu J, Gao JF, Zhang HX, Yang ZN. 2008. RUPTURED POLLEN GRAIN1, a Member of the MtN3/saliva Gene Family, Is Crucial for Exine Pattern Formation and Cell Integrity of Microspores in Arabidopsis. *Plant Physiology* **147**, 852-863.

Hafke JB, van Amerongen JK, Kelling F, Furch ACU, Gaupels F, van Bel AJE. 2005. Thermodynamic Battle for Photosynthate Acquisition between Sieve Tubes and Adjoining Parenchyma in Transport Phloem. *Plant Physiology* **138**, 1527-1537.

Hammer GL, Dong Z, McLean G, Doherty A, Messina C, Schussler J, Zinselmeier C, Paszkiewicz S, Cooper M. 2009. Can Changes in Canopy and/or Root System Architecture Explain Historical Maize Yield Trends in the U.S. Corn Belt? *Crop Science* **49**, 299-312.

Harb A, Krishnan A, Ambavaram MMR, Pereira A. 2010. Molecular and Physiological Analysis of Drought Stress in Arabidopsis Reveals Early Responses Leading to Acclimation in Plant Growth. *Plant Physiology* **154**, 1254-1271.

Hare PD, Cress WA. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* **21**, 79-102.

Hare PD, Cress WA, Van Staden J. 1998. Dissecting the roles of osmolytes accumilation during stress. *Plant, Cell and Environment* **21**, 535-553.

Haritatos E, Ayre BG, Turgeon R. 2000. Identification of Phloem Involved in Assimilate Loading in Leaves by the Activity of the Galactinol Synthase Promoter. *Plant Physiology* **123**, 929-938.

Haydon MJ, Bell LJ, Webb AAR. 2011. Interactions between plant circadian clocks and solute transport. *Journal of Experimental Botany*, err040.

Henry A, Doucette W, Norton J, Bugbee B. 2007. Changes in crested wheatgrass root exudation caused by flood, drought, and nutrient stress. *Journal of environmental quality* **36**, 904-912.

Ho LC. 1988. Metabolism and compartimentation of imported sugars in sink organs in relation ti sink strength. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**, 355-378.

Hoekstra AY, Mekonnen MM. 2012. The water footprint of humanity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 3232-3237.

Holtta T, Mencuccini M, Nikinmaa E. 2009. Linking phloem function to structure: analysis with a coupled xylem-phloem transport model. *J Theor Biol* **259**, 325-337.

Hoth S, Niedermeier M, Feuerstein A, Hornig J, Sauer N. 2010. An ABA-responsive element in the AtSUC1 promoter is involved in the regulation of AtSUC1 expression. *Planta* **232**, 911-923.

Huang B. 2000. Role of root morphological and physiological characteristics in drought resistance of plants. *Plant–environment interactions. Marcel Dekker Inc., New York*, 39-64.

Hummel I, Pantin F, Sulpice R, Piques M, Rolland G, Dauzat M, Christophe A, Pervent M, Bouteille M, Stitt M, Gibon Y, Muller B. 2010. Arabidopsis Plants Acclimate to Water Deficit at Low Cost through Changes of Carbon Usage: An Integrated Perspective Using Growth, Metabolite, Enzyme, and Gene Expression Analysis. *Plant Physiology* **154**, 357-372.

Huttner D, Bar-Zvi D. 2003. An improved, simple, hydroponic method for growingArabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology Reporter* **21**, 59-63.

Ibraheem O, Dealtry G, Roux S, Bradley G. 2011. The effect of drought and salinity on the expressional levels of sucrose transporters in rice

(Oryza sativa Nipponbare) cultivar plants *Plant Omics Journal* **4**, 68-74.

Jackson RB, Sperry JS, Dawson TE. 2000. Root water uptake and transport: using physiological processes in global predictions. *Trends in Plant Science* **5**, 482-488.

Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks DP. 2013. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res* **41**, e188.

Kalt-Torres W, Huber SC. 1987. Diurnal Changes in Maize Leaf Photosynthesis : III. Leaf Elongation Rate in Relation to Carbohydrates and Activities of Sucrose Metabolizing Enzymes in Elongating Leaf Tissue. *Plant Physiology* **83**, 294-298.

Kaufmann MR, Eckard AN. 1971. Evaluation of water stress control with polyethylene glycols by analysis of guttation. *Plant Physiology* **47**, 453-456.

Kawaguchi R, Williams AJ, Bray EA, Bailey-Serres J. 2003. Water-deficit-induced translational control in Nicotiana tabacum. *Plant Cell Environ* **26**, 221-229.

Kay R, Chan AMY, Daly M, McPherson J. 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* **236**, 1299-1302.

Kempers R, Ammerlaan A, van Bel AJE. 1998. Symplasmic Constriction and Ultrastructural Features of the Sieve Element/Companion Cell Complex in the Transport

Phloem of Apoplasmically and Symplasmically Phloem-Loading Species. *Plant Physiology* **116**, 271-278.

Khan JA, Wang Q, Sjölund RD, Schulz A, Thompson GA. 2007. An early nodulin-like protein accumulates in the sieve element plasma membrane of Arabidopsis. *Plant Physiology* **143**, 1576-1589.

Kim J-Y, Mahé A, Brangeon J, Prioul J-L. 2000. A Maize Vacuolar Invertase, IVR2, Is Induced by Water Stress. Organ/Tissue Specificity and Diurnal Modulation of Expression. *Plant Physiology* **124**, 71-84.

Kiyosue T, Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1998. ERD6, a cDNA clone for an early dehydration-induced gene of Arabidopsis, encodes a putative sugar transporter. *Biochimica et Biophysica Acta* **1370**, 187-191.

Kleinboelting N, Huep G, Kloetgen A, Viehoever P, Weisshaar B. 2011. GABI-Kat SimpleSearch: new features of the Arabidopsis thaliana T-DNA mutant database. *Nucleic Acids Res*, gkr1047.

Klemens PA, Patzke K, Deitmer J, Spinner L, Le Hir R, Bellini C, Bedu M, Chardon F, Krapp A, Neuhaus HE. 2013. Overexpression of the vacuolar sugar carrier AtSWEET16 modifies germination, growth, and stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol* **163**, 1338-1352.

Klemens PA, Patzke K, Trentmann O, Poschet G, Buttner M, Schulz A, Marten I, Hedrich R, Neuhaus HE. 2014. Overexpression of a proton-coupled vacuolar glucose exporter impairs freezing tolerance and seed germination. *New Phytol* **202**, 188-197.

Klepek YS, Geiger D, Stadler R, Klebl F, Landouar-Arsivaud L, Lemoine R, Hedrich R, Sauer N. 2005. Arabidopsis POLYOL TRANSPORTER5, a New Member of the Monosaccharide Transporter-Like Superfamily, Mediates H+-Symport of Numerous Substrates, Including myo-Inositol, Glycerol, and Ribose. *The Plant Cell Online* **17**, 204-218.

Klepek YS, Volke M, Konrad KR, Wippel K, Hoth S, Hedrich R, Sauer N. 2010. Arabidopsis thaliana POLYOL/MONOSACCHARIDE TRANSPORTERS 1 and 2: fructose and xylitol/H+ symporters in pollen and young xylem cells. *Journal of Experimental Botany* **61**, 537-550.

Koch K. 2004. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 235-246.

Kolling K, Thalmann M, Muller A, Jenny C, Zeeman SC. 2015. Carbon partitioning in Arabidopsis thaliana is a dynamic process controlled by the plants metabolic status and its circadian clock. *Plant Cell Environ* **38**, 1965-1979.

Krapp A, Hofmann B, Schäfer C, Stitt M. 1993. Regulation of the expression of rbcS and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the 'sink regulation' of photosynthesis? *The Plant Journal* **3**, 817-828.

Kuchenbuch R, Jungk A. 1982. A method for determining concentration profiles at the soil-root interface by thin slicing rhizospheric soil. *Plant and Soil* **68**, 391-394.

Kühn C, Hajirezaei M-R, Fernie AR, Roessner-Tunali U, Czechowski T, Hirner B, Frommer WB. 2003. The Sucrose Transporter StSUT1 Localizes to Sieve Elements in Potato Tuber Phloem and Influences Tuber Physiology and Development. *Plant Physiology* **131**, 102-113.

Lalonde S, Tegeder M, Throne-Holst M, Frommer WB, Patrick JW. 2003. Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant, Cell and Environment* **26**, 37-56.

Lalonde S, Wipf D, Frommer WB. 2004. Transport Mechanisms for Organic Forms of Carbon and Nitrogen between Source and Sink. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 341-372.

Lambers H, Atkin OK, Millenaar FF. 1996. Respiratory patterns in roots in relation to their functioning. *Plant Roots. The Hidden Half*, 323-362.

Lawlor DW. 2013. Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. *Journal of Experimental Botany* **64**, 83-108.

Le Hir R, Spinner L, Klemens PAW, Chakraborti D, de Marco F, Vilaine F, Wolff N, Lemoine R, Porcheron B, Géry C, Téoulé E, Chabout S, Mouille G, Neuhaus E, Dinant S, Bellini C. 2015. Disruption of the sugar transporters AtSWEET11 and AtSWEET12 affects vascular development and freezing tolerance in Arabidopsis. *Molecular Plant*.

Lee-Ho E, Walton LJ, Reid DM, Yeung EC, Kurepin LV. 2007. Effects of elevated carbon dioxide and sucrose concentrations onArabidopsis thalianaroot architecture and anatomy. *Canadian Journal of Botany* **85**, 324-330.

Legg BJ, Day W, Lawlor DW, Parkinson KJ. 1979. The effects of drought on barley growth: models and measurements showing the relative importance of leaf area and photosynthetic rate. *The Journal of Agricultural Science* **92**, 703-716.

Leggewie G, Kolbe A, Lemoine R, Roessner U, Lytovchenko A, Zuther E, Kehr J, Frommer WB, Riesmeier JW, Willmitzer L, Fernie AR. 2003. Overexpression of the sucrose transporter SoSUT1 in potato results in alterations in leaf carbon partitioning and in tuber metabolism but has little impact on tuber morphology. *Planta* **217**, 158-167.

Lemoine R. 2000. Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochimica et Biophysica Acta* **1465**, 246-262.

Lemoine R, Camera SL, Atanassova R, Dédaldéchamp F, Allario T, Pourtau N, Bonnemain J-L, Laloi M, Coutos-Thévenot P, Maurousset L, Faucher M, Girousse C, Lemonnier P, Parrilla J, Durand M. 2013. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science* **4**.

Lemoine R, KÜHn C, Thiele N, Delrot S, Frommer WB. 1996. Antisense inhibition of the sucrose transporter in potato: effects on amount and activity. *Plant Cell Environ* **19**, 1124-1131.

Lemonnier P, Gaillard C, Veillet F, Verbeke J, Lemoine R, Coutos-Thevenot P, La Camera S. 2014. Expression of Arabidopsis sugar transport protein STP13 differentially affects glucose transport activity and basal resistance to Botrytis cinerea. *Plant Mol Biol* **85**, 473-484.

Li TH, Li SH, Wang J, Yu KS. 2003. Effects of Water Stress at Different Deficit Intensities on Transport and Distribution of 14 C-Assimilates in Micropropagated Apple Plants. *European Journal of Horticultural Science* **68**, 227-233.

Lim PO, Kim HJ, Gil Nam H. 2007. Leaf senescence. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**, 115-136.

Lin IW, Sosso D, Chen L-Q, Gase K, Kim S-G, Kessler D, Klinkenberg PM, Gorder MK, Hou B-H, Qu X-Q, Carter CJ, Baldwin IT, Frommer WB. 2014. Nectar secretion requires sucrose phosphate synthases and the sugar transporter SWEET9. *Nature* **508**, 546-549.

Liu F, Stützel H. 2004. Biomass partitioning, specific leaf area, and water use efficiency of vegetable amaranth (Amaranthus spp.) in response to drought stress. *Scientia Horticulturae* **102**, 15-27.

Livingston DP, Henson CA. 1998. Apoplastic Sugars, Fructans, Fructan Exohydrolase, and Invertase in Winter Oat: Responses to Second-Phase Cold Hardening. *Plant Physiology* **116**, 403-408.

Lohaus G, Hussmann M, Pennewiss K, Schneider H, Zhu J-J, Sattelmacher B. 2000. Solute balance of a maize (Zea mays L.) source leaf as affected by salt treatment with special emphasis on phloem retranslocation and ion leaching. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1721-1732.

Lohman KN, Gan S, John MC, Amasino RM. 1994. Molecular analysis of natural leaf senescence in Arabidopsis thaliana. *Physiologia Plantarum* **92**, 322-328.

Ludewig F, Flügge U-I. 2013. Role of metabolite transporters in source-sink carbon allocation. *Frontiers in Plant Science* **4**.

Ludewig F, Sonnewald U. 2000. High CO2-mediated down-regulation of photosynthetic gene transcripts is caused by accelerated leaf senescence rather than sugar accumulation. *FEBS Letters* **479**, 19-24.

Ludwig A, Jürgen S, Sauer N. 2000. Plant Sucrose H+ symporters mediate the transport of vitamin H. *The Plant Journal* **24**, 503-509.

Luijten M, Heidstra R. 2009. Arabidopsis Root Development. *Annual Plant Reviews Volume 37: Root Development*: Wiley-Blackwell, 1-38.

Mainson D. 2013. Etude du transport des sucres dans les racines d'Arabidopsis thaliana au cours de son cycle de développement et en réponse à un stress osmotique, Université de Poitiers.

Marcelis LFM, Heuvelink E, Goudriaan J. 1998. Modelling biomass production and yield of horticultural crops: a review. *Scientia Horticulturae* **74**, 83-111.

Maroco JP, Pereira JS, Manuela Chaves M. 2000. Growth, photosynthesis and water-use efficiency of two C4Sahelian grasses subjected to water deficits. *Journal of Arid Environments* **45**, 119-137.

Martinoia E, Massonneau A, Frangne N. 2000. Transport Processes of Solutes across the Vacuolar Membrane of Higher Plants. *Plant Cell Physiology* **41**, 1175-1186.

Mathieu L, Lobet G, Tocquin P, Périlleux C. 2015. "Rhizoponics": a novel hydroponic rhizotron for root system analyses on mature Arabidopsis thaliana plants. *Plant methods* **11**, 3.

Maurel C, Verdoucq L, Luu D-T, Santoni V. 2008. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 595-624.

McDowell NG. 2011. Mechanisms linking drought, hydraulics, carbon metabolism, and vegetation mortality. *Plant Physiol* **155**, 1051-1059.

Medici A, Laloi M, Atanassova R. 2014. Profiling of sugar transporter genes in grapevine coping with water deficit. *FEBS Lett* **588**, 3989-3997.

Metcalf CJ, Mitchell-Olds T. 2009. Life history in a model system: opening the black box with Arabidopsis thaliana. *Ecol Lett* **12**, 593-600.

Mewis I, Khan MAM, Glawischnig E, Schreiner M, Ulrichs C. 2012. Water Stress and Aphid Feeding Differentially Influence Metabolite Composition in Arabidopsis thaliana (L.). *PLoS ONE* **7**, e48661.

Meyer S, Lauterbach C, Niedermeier M, Barth I, Sjolund DR, Sauer N. 2004. Wounding Enhances Expression of AtSUC3, a Sucrose Transporter from Arabidopsis Sieve Elements and Sink Tissues. *Plant Physiology* **134**, 684-693.

Meyer S, Melzer M, Truernit E, Hümmer C, Besenbeck R, Stadler R, Sauer N. 2000. AtSUC3, a gene encoding a new Arabidopsis sucrose transporter, is expressed in cells adjacent to the vascular tissue and in a carpel cell layer. *The Plant Journal* **24**, 869-882.

Michelet B, Boutry M. 1995. The Plasma Membrane H+-ATPase. *Plant Physiology* **108**, 1-6.

Minchin PEH, Ryan KG, Thorpe MR. 1984. Further Evidence of Apoplastic Unloading into the Stem of Bean: Identification of the Phloem Buffering Pool. *Journal of Experimental Botany* **35**, 1744-1753.

Minchin PEH, Thorpe MR. 1987. Mesurement of unloading and reloading of photoassimilate within the stem of bean. *Journal of Experimental Botany* **38**, 211-220.

Moore JP, Vicré-Gibouin M, Farrant JM, Driouich A. 2008. Adaptations of higher plant cell walls to water loss: drought vs desiccation. *Physiologia Plantarum* **134**, 237-245.

Morgan JM. 1984. OSMOREGULATION AND WATER STRESS IN HIGHER PLANTS. *Annual Review of Plant Physiology* **35**, 299-319.

Muller B, Pantin F, Genard M, Turc O, Freixes S, Piques M, Gibon Y. 2011. Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1715-1729.

Münch E. 1930. Die Stoffbewegungen in der Pflanze. *Jena: Fischer*.

Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* **25**, 239-250.

Nguyen C. 2003. Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie* **23**, 375-396.

Nicolas ME, Lambers H, Simpson RJ, Dalling MJ. 1985. Effect of Drought on Metabolism and Partitioning of Carbon in Two Wheat Varieties Differing in Drought-tolerance. *Annals of Botany* **55**, 727-742.

Noiraud N, Maurousset L, Lemoine R. 2001. Transport of polyols in higher plants. *Plant physiology and Biochemistry* **39**, 717-728.

Norén H, Svensson P, Andersson B. 2004. A convenient and versatile hydroponic cultivation system for Arabidopsis thaliana. *Physiologia Plantarum* **121**, 343-348.

Nørholm MHH, Nour-Eldin HH, Brodersen P, Mundy J, Halkier BA. 2006. Expression of the Arabidopsis high-affinity hexose transporter STP13 correlates with programmed cell death. *FEBS Letters* **580**, 2381-2387.

Oertli JJ. 1985. The response of Plant Cells to Different Forms of Moisture stress. *Journal of Plant Physiology* **121**, 295-300.

Oparka KJ, Duckett CM, Prior DAM, Fisher DB. 1994. Real-time imaging of phloem unloading in the root tip of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **6**, 759-766.

Oparka KJ, Prior DAM, Wright KM. 1995. Symplastic communication between primary and developing lateral roots of Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany* **46**, 187-197.

Paez-Garcia A, Motes C, Scheible W-R, Chen R, Blancaflor E, Monteros M. 2015. Root Traits and Phenotyping Strategies for Plant Improvement. *Plants* **4**, 334-355.

Patrick JW. 1997. PHLOEM UNLOADING: Sieve Element Unloading and Post-Sieve Element Transport. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 191-222.

Paul MJ, Foyer CH. 2001. Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1383-1400.

Péret B, De Rybel B, Casimiro I, Benková E, Swarup R, Laplaze L, Beeckman T, Bennett MJ. 2009. Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends in Plant Science* **14**, 399-408.

Petricka JJ, Winter CM, Benfey PN. 2012. Control of Arabidopsis Root Development. *Annual Review of Plant Biology* **63**, 563-590.

Plaut Z, Reinhold L. 1965. The Effect of Water Stress On [14c]Sucrose Transport in Bean Plants. *Australian Journal of Biological Sciences* **18**, 1143-1156.

Pommerrenig B, Popko J, Heilmann M, Schulmeister S, Dietel K, Schmitt B, Stadler R, Feussner I, Sauer N. 2013. SUCROSE TRANSPORTER 5 supplies Arabidopsis embryos with biotin and affects triacylglycerol accumulation. *The Plant Journal* **73**, 392-404.

Poschet G, Hannich B, Raab S, Jungkunz I, Klemens PAW, Krueger S, Neuhaus E, Büttner M. 2011. A Novel Arabidopsis Vacuolar Glucose Exporter is involved in cellular Sugar Homeostasis and affects Composition of Seed Storage Compounds. *Plant Physiology*.

Poulson ME, Boeger MRT, Donahue RA. 2006. Response of photosynthesis to high light and drought for Arabidopsis thaliana grown under a UV-B enhanced light regime. *Photosynthesis Research* **90**, 79-90.

Pourtau N, Jennings R, Pelzer E, Pallas J, Wingler A. 2006. Effect of sugar-induced senescence on gene expression

and implications for the regulation of senescence in Arabidopsis. *Planta* **224**, 556-568.

Pritchard J, Winch S, Gould N. 2000. Phloem water relations and root growth. *Functional Plant Biology* **27**, 539-548.

Quick WP, Chaves MM, Wendler R, David M, Rodrigues ML, Passaharinho JA, Pereira JS, Adcock MD, Leegood RC, Stitt M. 1992. The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. *Plant Cell Environ* **15**, 25-35.

Quirino B, Normanly J, Amasino R. 1999. Diverse range of gene activity during Arabidopsis thaliana leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. *Plant Molecular Biology* **40**, 267-278.

Quirino B, Reiter W-D, Amasino RD. 2001. One of two tandem Arabidopsis genes homologous to monosaccharide transporters is senescence-associated. *Plant Molecular Biology* **46**, 447-457.

Ramirez V, Coego A, Lopez A, Agorio A, Flors V, Vera P. 2009. Drought tolerance in Arabidopsis is controlled by the OCP3 disease resistance regulator. *Plant J* **58**, 578-591.

Regnault T, Davière J-M, Wild M, Sakvarelidze-Achard L, Heintz D, Carrera Bergua E, Lopez Diaz I, Gong F, Hedden P, Achard P. 2015. The gibberellin precursor GA12 acts as a long-distance growth signal in Arabidopsis. *Nature Plants* **1**, 15073.

Reid CPP, Mexal JG. 1977. Water stress effects on root exudation by lodgepole pine. *Soil Biology and Biochemistry* **9**, 417-421.

Reinders A, Panshyshyn JA, Ward JM. 2005. Analysis of Transport Activity of Arabidopsis Sugar Alcohol Permease Homolog AtPLT5. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 1594-1602.

Reinders A, Sivitz AB, Ward JM. 2012. Evolution of plant sucrose uptake transporters. *Front Plant Sci* **3**, 22.

Rennie EA, Turgeon R. 2009. A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 14162-14167.

Rouhi V, Samson R, Lemeur R, Damme PV. 2007. Photosynthetic gas exchange characteristics in three different almond species during drought stress and subsequent recovery. *Environmental and Experimental Botany* **59**, 117-129.

Roycewicz P, Malamy JE. 2012. Dissecting the effects of nitrate, sucrose and osmotic potential on Arabidopsis root and shoot system growth in laboratory assays. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **367**, 1489-1500.

Ruan YL. 2014. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annu Rev Plant Biol* **65**, 33-67.

Ruehr NK, Offermann CA, Gessler A, Winkler JB, Ferrio JP, Buchmann N, Barnard RL. 2009. Drought effects on allocation of recent carbon: from beech leaves to soil CO2 efflux. *New Phytol* **184**, 950-961.

Saab IN, Sharp RE. 1989. Non-hydraulic signals from maize roots in drying soil: inhibition of leaf elongation but not stomatal conductance. *Planta* **179**, 466-474.

Sanaullah M, Chabbi A, Rumpel C, Kuzyakov Y. 2012. Carbon allocation in grassland communities under drought stress followed by 14C pulse labeling. *Soil Biology and Biochemistry* **55**, 132-139.

Satbhai SB, Ristova D, Busch W. 2015. Underground tuning: quantitative regulation of root growth. *J Exp Bot* **66**, 1099-1112.

Sauer N. 2007. Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Letters* **581**, 2309-2317.

Sauer N, Ludwig A, Knoblauch A, Rothe P, Gahrtz M, Klebl F. 2004. AtSUC8 and AtSUC9 encode functional sucrose transporters, but the closely related AtSUC6 and AtSUC7 genes encode aberrant proteins in different Arabidopsis ecotypes. *The Plant Journal* **40**, 120-130.

Sauer N, Stolz J. 1994. SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from Arabidopsis thaliana; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *The Plant Journal* **6**, 67-77.

Schneider S, Hulpke S, Schulz A, Yaron I, Imlau A, Schmitt B, Batz B, Wolf S, Hedrich R, Sauer N. 2012. Vacuoles release sucrose via tonoplast-localised SUC4-type transporters. *Plant Biology* **14**, 325-336.

Schneider S, Schneidereit A, Konrad KR, Hajirezaei M-R, Gramann M, Hedrich R, Sauer N. 2006. Arabidopsis INOSITOL TRANSPORTER4 Mediates High-Affinity H+ Symport of Myoinositol across the Plasma Membrane. *Plant Physiology* **141**, 565-577.

Schulz A, Beyhl D, Marten I, Wormit A, Neuhaus E, Poschet G, Büttner M, Schneider S, Sauer N, Hedrich R. 2011. Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2. *The Plant Journal* **68**, 129-136.

Scott P. 2000. Resurrection Plants and the Secrets of Eternal Leaf. *Annals of Botany* **85**, 159-166.

Seo PJ, Park JM, Kang SK, Kim SG, Park CM. 2011. An Arabidopsis senescence-associated protein SAG29 regulates cell viability under high salinity. *Planta* **233**, 189-200.

Sevanto S. 2014. Phloem transport and drought. *J Exp Bot* **65**, 1751-1759.

Shao H-B, Chu L-Y, Jaleel CA, Zhao C-X. 2008. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus Biologies* **331**, 215-225.

Sharma S, Verslues PE. 2010. Mechanisms independent of abscisic acid (ABA) or proline feedback have a predominant role in transcriptional regulation of proline metabolism during low water potential and stress recovery. *Plant Cell Environ* **33**, 1838-1851.

Sharp RE, Hsiao TC, Silk WK. 1990. Growth of the Maize Primary Root at Low Water Potentials: II. Role of Growth and Deposition of Hexose and Potassium in Osmotic Adjustment. *Plant Physiology* **93**, 1337-1346.

Sharp RE, Poroyko V, Hejlek LG, Spollen WG, Springer GK, Bohnert HJ, Nguyen HT. 2004. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2343-2351.

Sheen J. 1990. Metabolic repression of transcription in higher plants. *The Plant Cell* **2**, 1027-1038.

Sherson SM, Hemmann G, Wallace G, Forbes S, Germain V, Stadler R, Bechtold N, Sauer N, Smith SM. 2000. Monosaccharide/proton symporter AtSTP1 plays a major role in uptake and response of Arabidopsis seeds and seedlings to sugars. *The Plant Journal* **24**, 849-857.

Siedlecka A, Krupa Z. 2002. Simple method of Arabidopsis thaliana cultivation in liquid nutrient medium. *Acta Physiologiae Plantarum* **24**, 163-166.

Sivitz AB, Reinders A, Johnson ME, Krentz AD, Grof CPL, Perroux JM, Ward JM. 2007. Arabidopsis Sucrose Transporter AtSUC9. High-Affinity Transport Activity, Intragenic Control of Expression, and Early Flowering Mutant Phenotype. *Plant Physiology* **143**, 188-198.

Sivitz AB, Reinders A, Ward JM. 2008. Arabidopsis Sucrose Transporter AtSUC1 Is Important for Pollen Germination and Sucrose-Induced Anthocyanin Accumulation. *Plant Physiology* **147**, 92-100.

Slewinski TL. 2011. Diverse Functional Roles of Monosaccharide Transporters and their Homologs in Vascular Plants: A Physiological Perspective. *Molecular Plant* **4**, 641-662.

Smeets K, Ruytinx J, Van Belleghem F, Semane B, Lin D, Vangronsveld J, Cuypers A. 2008. Critical evaluation and statistical validation of a hydroponic culture system for Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol Biochem* **46**, 212-218.

Smith AM, Stitt M. 2007. Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell Environ* **30**, 1126-1149.

Solfanelli C, Poggi A, Loreti E, Alpi A, Perata P. 2006. Sucrose-Specific Induction of the Anthocyanin Biosynthetic Pathway in Arabidopsis. *Plant Physiology* **140**, 637-646.

Sperdouli I, Moustakas M. 2012. Interaction of proline, sugars, and anthocyanins during photosynthetic acclimation of Arabidopsis thaliana to drought stress. *Journal of Plant Physiology* **169**, 577-585.

Srivastava AC, Dasgupta K, Ajieren E, Costilla G, McGarry RC, Ayre BG. 2009. Arabidopsis plants harbouring a mutation in AtSUC2, encoding the predominant sucrose/proton symporter necessary for efficient phloem transport, are able to complete their life cycle and produce viable seed. *Annals of Botany* **104**, 1121-1128.

Srivastava AC, Ganesan S, Ismail IO, Ayre BG. 2008. Functional Characterization of the Arabidopsis AtSUC2 Sucrose/H+ Symporter by Tissue-Specific Complementation Reveals an Essential Role in Phloem Loading But Not in Long-Distance Transport. *Plant Physiology* **148**, 200-211.

Stadler R, Büttner M, Ache P, Hedrich R, Ivashikina N, Melzer M, Sherson SM, Smith SM, Sauer N. 2003. Diurnal and Light-Regulated Expression of AtSTP1 in Guard Cells of Arabidopsis. *Plant Physiology* **133**, 528-537.

Stadler R, Lauterbach C, Sauer N. 2005a. Cell-to-Cell Movement of Green Fluorescent Protein Reveals Post-Phloem Transport in the Outer Integument and Identifies Symplastic Domains in Arabidopsis Seeds and Embryos. *Plant Physiology* **139**, 701-712.

Stadler R, Sauer N. 1996. The Arabidopsis thaliana AtSUC2 Gene is Specifically Expressed in Companion Cells. *Botanica Acta* **109**, 299-306.

Stadler R, Truernit E, Gahrtz M, Sauer N. 1999. The AtSUC1 sucrose carrier may represent the osmotic driving force anther dehiscence and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **19**, 269-278.

Stadler R, Wright KM, Lauterbach C, Amon G, Gahrtz M, Feuerstein A, Oparka KJ, Sauer N. 2005b. Expression of GFP-fusions in Arabidopsis companion cells reveals non-specific protein trafficking into sieve elements and identifies a novel post-phloem domain in roots. *Plant J* **41**, 319-331.

Stessman D, Miller A, Spalding M, Rodermel S. 2002. Regulation of photosynthesis during Arabidopsis leaf development in continuous light. *Photosynthesis Research* **72**, 27-37.

Stitt M. 1991. Rising CO2 levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant Cell Environ* **14**, 741-762.

Stitt M. 1999. Nitrate regulation of metabolism and growth. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 178-186.

Stitt M, Lunn J, Usadel B. 2010. Arabidopsis and primary photosynthetic metabolism - more than the icing on the cake. *The Plant Journal* **61**, 1067-1091.

Stitt M, Zeeman SC. 2012. Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. *Curr Opin Plant Biol* **15**, 282-292.

Streb S, Zeeman SC. 2012. Starch metabolism in Arabidopsis. *Arabidopsis Book* **10**, e0160.

Sulpice R, Pyl E-T, Ishihara H, Trenkamp S, Steinfath M, Witucka-Wall H, Gibon Y, Usadel B, Poree F, Piques MC. 2009. Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 10348-10353.

Sun M-X, Huang X-Y, Yang J, Guan Y-F, Yang Z-N. 2013. Arabidopsis RPG1 is important for primexine deposition and functions redundantly with RPG2 for plant fertility at the late reproductive stage. *Plant Reproduction* **26**, 83-91.

Svenningsson H, Sundin P, Liljenberg C. 1990. Lipids, carbohydrates and amino acids exuded from the axenic roots of rape seedlings exposed to water-deficit stress. *Plant Cell Environ* **13**, 155-162.

Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2002. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* **29**, 417-426.

Takahashi N, Yamazaki Y, Kobayashi A, Higashitani A, Takahashi H. 2003. Hydrotropism interacts with gravitropism by degrading amyloplasts in seedling roots of Arabidopsis and radish. *Plant Physiol* **132**, 805-810.

Tardieu F, Davies WJ. 1993. Integration of hydraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and water status of droughted plants. *Plant Cell Environ* **16**, 341-349.

Tardieu F, Granier C, Muller B. 1999. Modelling leaf expansion in a ¯uctuating environment: are changes in specific leaf area a consequence of changes in expansion rate ? *New phytologist* **143**, 33-43.

Tardieu F, Granier C, Muller B. 2011. Water deficit and growth. Co-ordinating processes without an orchestrator? *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 283-289.

Tardieu F, Reymond M, Hamard P, Granier C, Muller B. 2000. Spatial distributions of expansion rate, cell division rate and cell size in maize leaves: a synthesis of the effects of soil water status, evaporative demand and temperature. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1505-1514.

Tian X, Doerner P. 2013. Root resource foraging: does it matter? *Frontiers in Plant Science* **4**, 303.

Toda T, Koyama H, Hara T. 1999. A Simple Hydroponic Culture Method for the Development of a Highly Viable Root System in Arabidopsis thaliana. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **63**, 210-212.

Troughton A. 1956. Studies on the growth of young grass plants with special reference to the relationship between the shoot and root systems. *Grass and Forage Science* **11**, 56-65.

Truernit E. 2001. The importance of sucrose transporters. *Current Biology* **11**, R169-R171.

Truernit E, Sauer N. 1995a. The promoter of the *Arabidopsis thaliana SUC2* sucrose-H + symporter gene directs expression of p-glucuronidase to the phloem: Evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta* **196**, 564-570.

Truernit E, Sauer N. 1995b. The promoter of the Arabidopsis thaliana SUC2 sucrose-H + symporter gene directs expression of p-glucuronidase to the phloem: Evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta* **196**, 567-570.

Truernit E, Schmid J, Epple P, Illig J, Sauer N. 1996. The Sink-Specific and Stress-Regulated Arabidopsis SPP4 Gene: Enhanced Expression of a Gene Encoding a Monosaccharide Transporter by Wounding, Elicitors, and Pathogen Challenge. *The Plant Cell* **8**, 2169-2182.

van Bel AJE. 2003. The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, Cell and Environment* **26**, 125-149.

van der Weele CM, Spollen WG, Sharp RE, Baskin TI. 2000. Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied byn control of water potentiel in nutrient-agar media. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1555-1562.

Van Oosten J-J, Besford RT. 1994. Sugar Feeding Mimics Effect of Acclimation to High CO2- Rapid Down Regulation of RuBisCO Small Subunit Transcripts but not of the Large Subunit Transcripts. *Journal of Plant Physiology* **143**, 306-312.

Verbelen JP, De Cnodder T, Le J, Vissenberg K, Baluska F. 2006. The Root Apex of Arabidopsis thaliana Consists of Four Distinct Zones of Growth Activities. *Plant Signaling & Behavior* **1**, 296-304.

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

Voetberg GS, Sharp RE. 1991. Growth of the Maize Primary Root at Low Water Potentials: III. Role of Increased Proline Deposition in Osmotic Adjustment. *Plant Physiology* **96**, 1125-1130.

Walker TS, Bais HP, Grotewold E, Vivanco JM. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiology* **132**, 44-51.

Walter A, Schurr U. 2005. Dynamics of Leaf and Root Growth: Endogenous Control versus Environmental Impact. *Annals of Botany* **95**, 891-900.

Wardlaw IF. 1969. The effect of water stress on translocation in relation to photosynthesis and growth. *Australian Journal of Biological Sciences* **22**, 1-16.

Wardlaw IF. 1990. The control of carbon partitioning in plants. *New phytologist* **116**, 341-381.

Watanabe S, Kojima K, Ide Y, Sasaki S. 2000. Effects of saline and osmotic stress on proline and sugar accumulation in Populus euphratica in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **63**, 199-206.

Weber A, Servaites JC, Geiger DR, Kofler H, Hille D, Gröner F, Hebbeker U, Flügge U-I. 2000. Identification, Purification, and Molecular Cloning of a Putative Plastidic Glucose Translocator. *The Plant Cell* **12**, 787-801.

Weise SE, Weber APM, Sharkey TD. 2004. Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. *Planta* **218**, 474-482.

Wenzel W, Wieshammer G, Fitz W, Puschenreiter M. 2001. Novel rhizobox design to assess rhizosphere characteristics at high spatial resolution. *Plant and Soil* **237**, 37-45.

Weraduwage SM, Chen J, Anozie FC, Morales A, Weise SE, Sharkey TD. 2015. The relationship between leaf area growth and biomass accumulation in Arabidopsis thaliana. *Front Plant Sci* **6**, 167.

Westgate ME, Boyer JS. 1985. Osmotic adjustment and the inhibition of leaf, root, stem and silk growth at low water potentials in maize. *Planta* **164**, 540-549.

Wiese A, Christ MM, Virnich O, Schurr U, Walter A. 2007. Spatio‐temporal leaf growth patterns of Arabidopsis thaliana and evidence for sugar control of the diel leaf growth cycle. *New phytologist* **174**, 752-761.

Wilhite DA. 2005. *Drought and water crises: science, technology, and management issues*: CRC Press.

Wingenter K, Schulz A, Wormit A, Wic S, Trentmann O, Hoermiller, II, Heyer AG, Marten I, Hedrich R, Neuhaus HE. 2010. Increased activity of the vacuolar monosaccharide transporter TMT1 alters cellular sugar partitioning, sugar signaling, and seed yield in Arabidopsis. *Plant Physiol* **154**, 665-677.

Wingler A, Marès M, Pourtau N. 2004. Spatial patterns and metabolic regulation of photosynthetic parameters during leaf senescence. *New Phytologist* **161**, 781-789.

Wingler A, Roitsch T. 2008. Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses. *Plant Biol (Stuttg)* **10 Suppl 1**, 50-62.

Wippel K, Sauer N. 2011. Arabidopsis SUC1 loads the phloem in suc2 mutants when expressed from the SUC2 promoter. *Journal of Experimental Botany* **63**, 669-679.

Wormit A, Trentmann O, Feifer I, Lohr C, Tjaden J, Meyer S, Schmidt U, Martinoia E, Neuhaus HE. 2006. Molecular Identification and Physiological Characterization of a Novel Monosaccharide Transporter from Arabidopsis Involved in Vacuolar Sugar Transport. *The Plant Cell Online* **18**, 3476-3490.

Wright KM, Oparka KJ. 1997. Metabolic inhibitors induce symplastic movement of solutes from the transport phloem of Arabidopsis roots. *Journal of Experimental Botany* **48**, 1807-1814.

Xiong L, Wang RG, Mao G, Koczan JM. 2006a. Identification of Drought Tolerance Determinants by Genetic Analysis of Root Response to Drought Stress and Abscisic Acid. *Plant Physiology* **142**, 1065-1074.

Xiong L, Wang RG, Mao G, Koczan JM. 2006b. Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic Acid. *Plant Physiol* **142**, 1065-1074.

Yamada K, Kanai M, Osakabe Y, Ohiraki H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2011. Monosaccharide Absorption Activity of Arabidopsis Roots Depends on Expression Profiles of Transporter Genes under High Salinity Conditions. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 43577-43586.

Yamada K, Osakabe Y, Mizoi J, Nakashima K, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2010. Functional Analysis of an Arabidopsis thaliana Abiotic Stress-inducible Facilitated Diffusion Transporter for Monosaccharides. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 1138-1146.

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1994. A Novel cis-Acting Element in an Arabidopsis Gene is lnvolved in Responsiveness to Drought, Low-Temperature, or

High-Salt Stress *The Plant Cell* **6**, 251-264.

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2006. Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance to Dehydration and Cold Stresses. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 781-803.

Yang Z-B, Eticha D, Führs H, Heintz D, Ayoub D, Van Dorsselaer A, Schlingmann B, Rao IM, Braun H-P, Horst WJ. 2013. Proteomic and phosphoproteomic analysis of polyethylene glycol-induced osmotic stress in root tips of common bean (Phaseolus vulgaris L.). *Journal of Experimental Botany* **64**, 5569-5586.

Yazdanbakhsh N, Sulpice R, Graf A, Stitt M, Fisahn J. 2011. Circadian control of root elongation and C partitioning in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Environ* **34**, 877-894.

Youssef RA, Chino M. 1988. Development of a new rhizobox system to study the nutrient status in the rhizosphere. *Soil Science and Plant Nutrition* **34**, 461-465.

Zhan A, Schneider H, Lynch JP. 2015. Reduced Lateral Root Branching Density Improves Drought Tolerance in Maize. *Plant Physiol* **168**, 1603-1615.

Zhang J, Davies WJ. 1989. Abscisic acid produced in dehydrating roots may enable the plant to measure the water status of the soil. *Plant Cell Environ* **12**, 73-81.

Zhang J, Schurr U, Davies WJ. 1987. Control of Stomatal Behaviour by Abscisic Acid which Apparently Originates in the Roots. *Journal of Experimental Botany* **38**, 1174-1181.

Zhang LY, Peng YB, Pelleschi-Travier S, Fan Y, Lu Y-F, Lu Y-M, Gao X-P, Shen Y-Y, Delrot S, Zhang D-P. 2004. Evidence for Apoplasmic Phloem Unloading in Developing Apple Fruit. *Plant Physiology* **135**, 574-586.

XI. Annexes

Annexe I

- **Longueur de la racine principale et des racines latérales**

Pour déterminer la longueur totale du système racinaire (racine principale + ensemble des racines latérales), les racines ont été entièrement dessinées manuellement sur ordinateur à partir des images des systèmes racinaires radiomarqués *via* le logiciel « Gimp ».

L'image d'un système racinaire d'une résolution de 25 µm par pixel est importée dans « Gimp ». Un calque transparent par racine est alors généré :

- Calque
- Nouveau calque
  - Conserver les dimensions, et cliquer sur Transparence
- Valider
  - Recommencer autant de fois l'opération qu'il y a de systèmes racinaires à dessiner

Il faut aussi générer un calque noir qui sera nécessaire quand les racines seront entièrement dessinées :

- Calque
- Nouveau calque
  - Conserver les dimensions, et cliquer sur Couleur de premier plan
- Valider

Pour plus de confort, il faut faire apparaître plusieurs fenêtres. Ainsi pour la boîte à outils, il faut faire la manipulation suivante :

- Fenêtre
- Boîte à outils

Pour le gestionnaire de calques il faut faire la manipulation suivante :

- Fenêtre
- Fenêtres ancrables
- Calques

Pour la fenêtre option des outils permettant de sélectionner les types de brosse et leur taille :

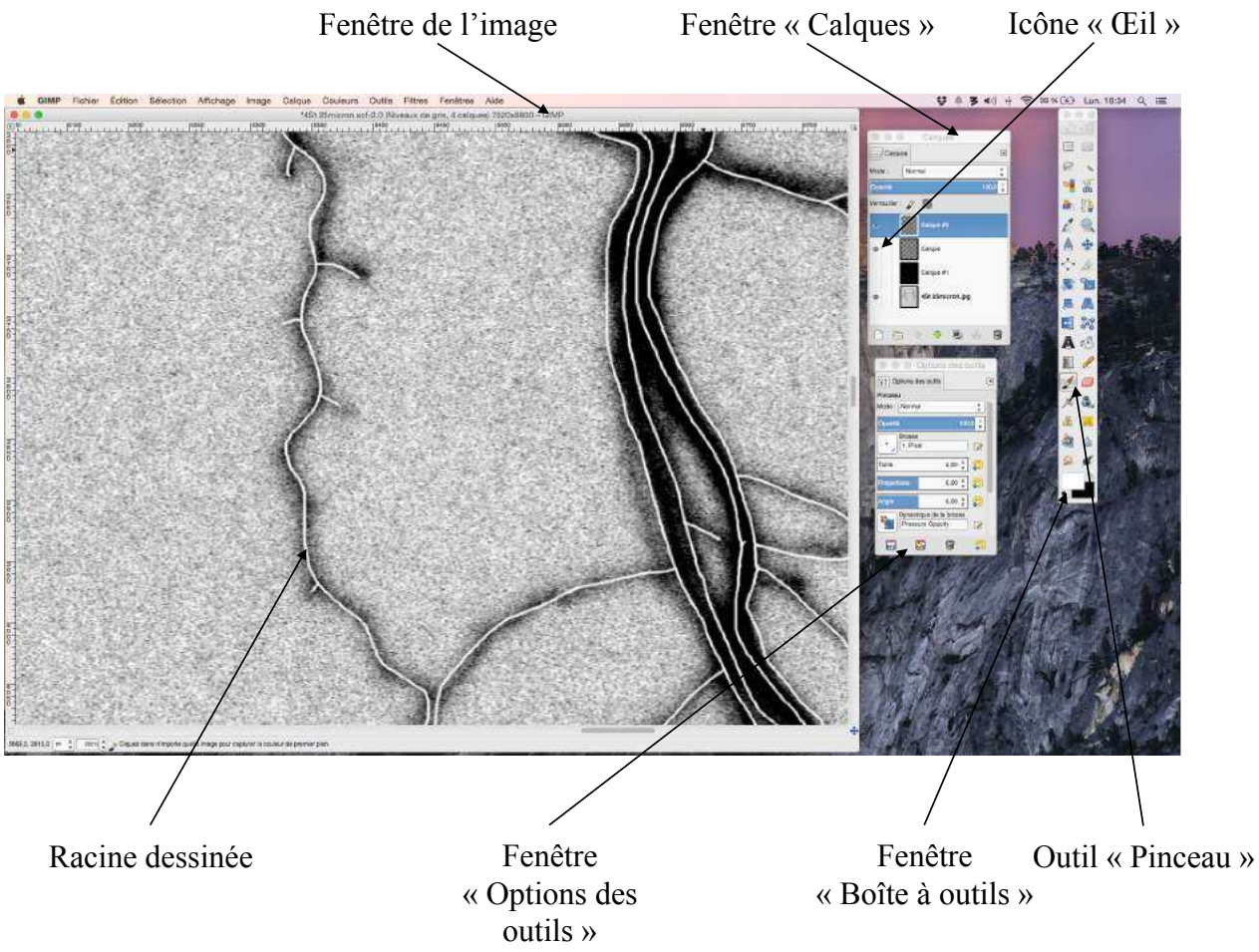


Figure SI.1 *Capture d'écran représentant les différentes fenêtres du logiciel « Gimp » après avoir exécuté les différents réglages pour dessiner les racines.*

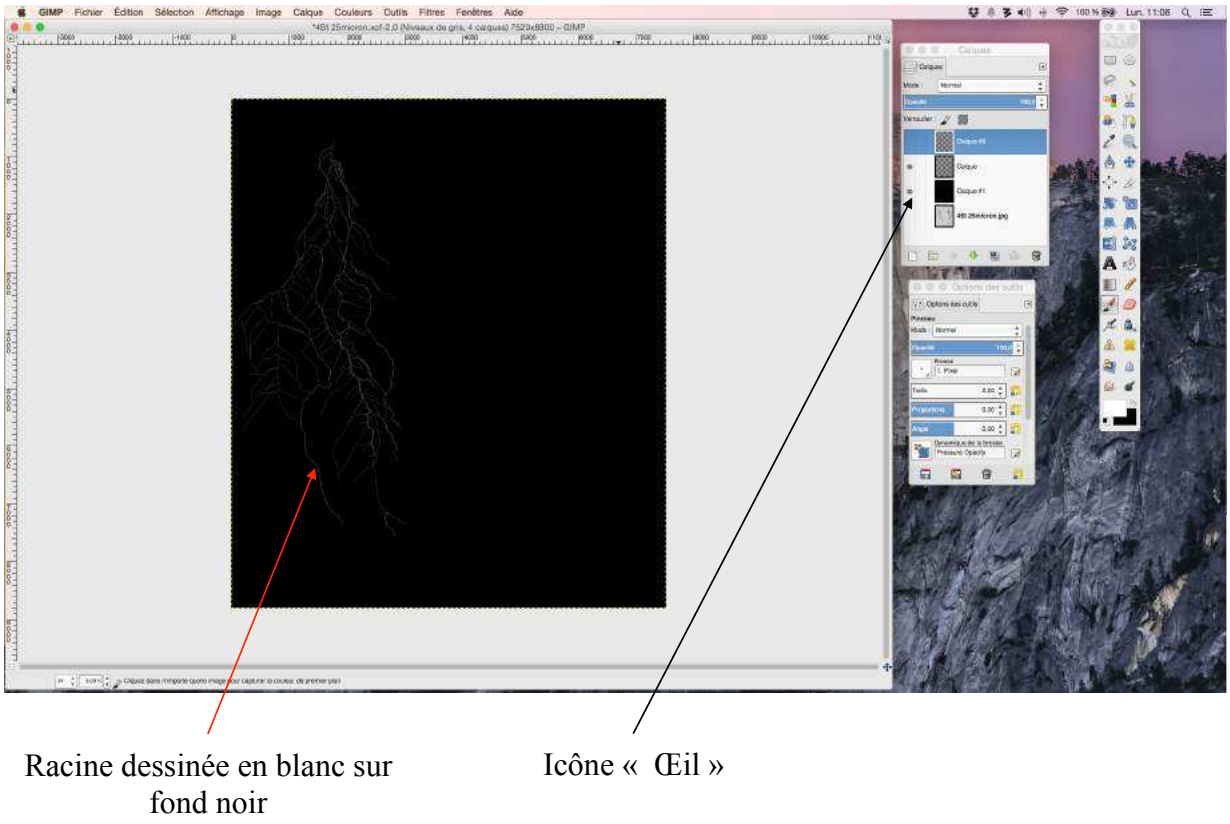


Figure SI.2 *Capture d'écran représentant la racine dessinée numériquement dans le logiciel « Gimp ».*

- Fenêtre
- Fenêtres ancrables
- Options de l'outil

Dans la fenêtre « calques », organiser les calques de façon à avoir du bas vers le haut :

- L'image du système racinaire
- Le calque noir
- Le ou les calques transparents

Les calques peuvent être déplacés soit en les faisant glisser soit en utilisant les deux flèches vertes en bas de la fenêtre. Puis toujours dans la même fenêtre, cliquer sur l'icône « Œil » pour l'image des racines et les deux calques transparents (1ère colonne). Cela permet de rendre visible les calques.

Dans la boîte à outils, sélectionner l'outil pinceau et la couleur blanche. Puis dans la fenêtre option des outils, sélectionner :

- La brosse « 1. Pixel » (1ère ligne, 2ème colonne)
- La taille « 2.00 »

Pour commencer à dessiner les racines, sélectionner le calque sur lequel il faut dessiner dans la fenêtre « Calques » en cliquant sur celui-ci. Ce dernier devient bleu une fois sélectionné. Une capture d'écran réalisée à la fin de la procédure est présentée en **figure SI.1**. Les racines sont ensuite dessinées sur le calque propre à chaque système racinaire. Le dessin des racines est relativement long, il faut compter environ 2 à 4 h pour un système racinaire. Cependant le travail peut être interrompu et repris à tout moment en le sauvegardant au format « xcf ». Quand le travail est fini, une image par système racinaire est exportée au format « JPEG ». L'image doit intégrer le dessin de la racine en blanc sur un fond noir. Pour ce faire, il faut cliquer sur l'icône « Œil » du calque noir et du calque de la racine voulue dans la fenêtre calque. La racine numériquement dessinée apparait alors en blanc sur un fond noir (**Figure SI.2**).L'image est ensuite exportée au format JPEG :

- Fichier
- Exporter sous
  - Sélectionner l'extension JPEG dans le volet déroulant en bas à droite de la fenêtre, ainsi que dans le volet déroulant en bas à gauche.
  - Sélectionner l'emplacement de destination
- Exporter

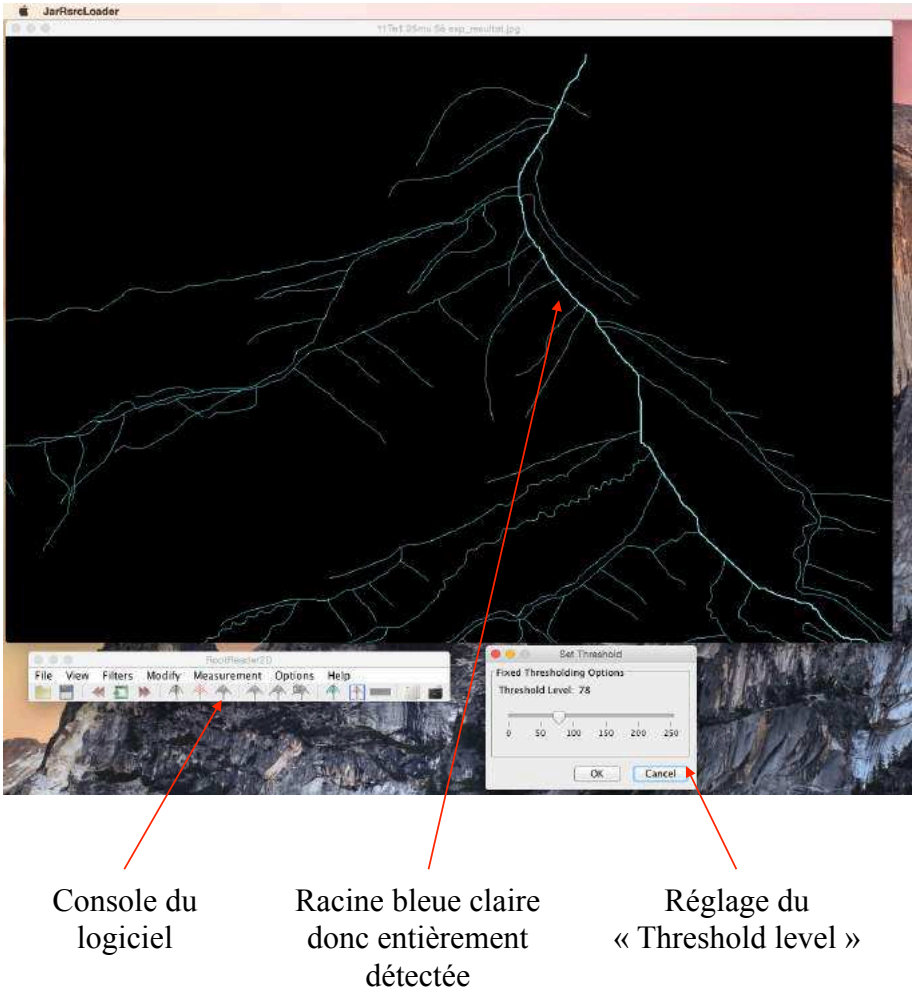


Figure SI.3 *Capture d'écran des fenêtres du logiciel RootReader2D après réglage du « Threshold level ».*



B C D A E

Figure SI.4 *Présentation de la console du logiciel RootReader2D*
A, Bouton Sélection de la zone d'intérêt
B, Bouton Threshold
C, Bouton Squelettiser
D, Bouton Construction des segments
E, Bouton Mesurer

        - Sélectionner 100 en qualité
    - Exporter

L'image générée possède une définition d'image relativement importante (>50 Mpx). Pour la suite du processus il faut diminuer la résolution des images. La diminution des images est réduite de 50% *via* le logiciel « Xn Convert ».

La taille de la racine principale et des racines latérales a été estimée en utilisant le logiciel« RootReader2D » (Clark *et al.*, 2013)(http://www.plantmineralnutrition.net/rr2d.php). L'image est tout d'abord ouverte dans le logiciel :

- File
- Open
    - Sélectionner l'image
- Ouvrir

Puis il faut réaliser quelques réglages. Il faut tout d'abord indiquer au logiciel que la racine est blanche sur fond noir :

- Options
- Image processing
- Bright roots on a dark brackground

Ensuite il faut régler le « Threshold level », paramètre permettant au logiciel de distinguer la racine de l'arrière plan.

- Measurement
- Set Threshold
    - Définir une valeur comprise entre 50 et 100 permettant de distinguer l'intégrabilité du système racinaire alors visible en bleu clair par la suite (**Figure SI.3**)
- OK

Enfin il faut calibrer l'échelle :

- Measurement
- Set scale
    - Mettre 200 pi/cm
- OK

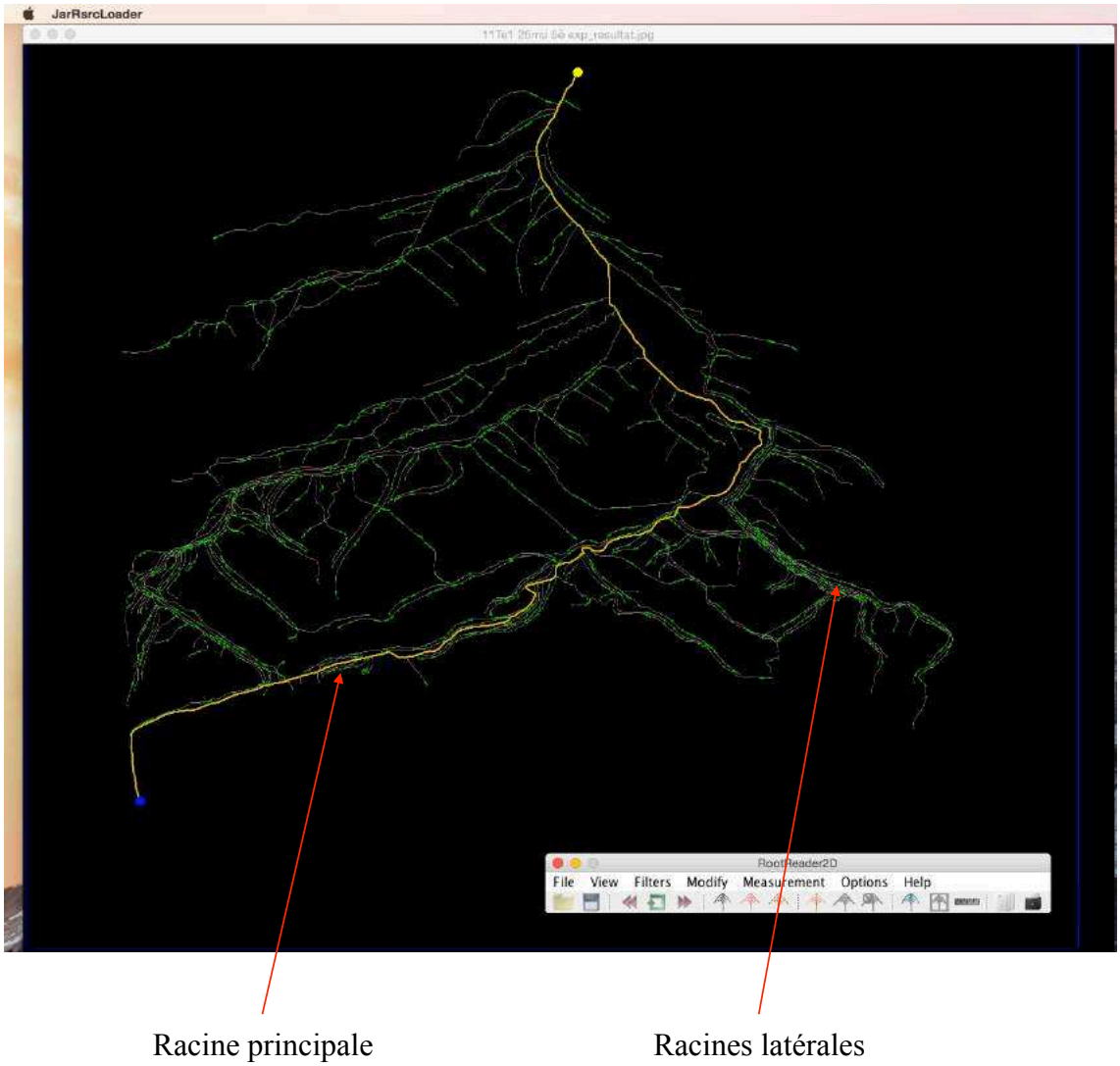


Figure SI.5 *Capture d'écran de la fenêtre du logiciel RootReader2D après avoir distingué la racine principale des racines latérales*.

Une fois les réglages effectués, l'analyse peut commencer il faut tout d'abord sélectionner la région d'intérêt (**Figure SI.4,** bouton A). Il faut ensuite activer le « Threshold » (**Figure SI.4,** bouton B), squelettiser le système racinaire (**Figure SI.4,** bouton C), construire les segments (**Figure SI.4,** bouton D). Ensuite, cliquer sur le début de la racine principale, puis sur la pointe de la racine principale. Un point jaune et un point bleu apparaissent de part et d'autre de la racine, et ces deux points sont reliés par un segment jaune représentant la racine principale (**Figure SI.5**). Il ne reste qu'à mesurer le système racinaire (**Figure SI.4,** bouton E). Les données apparaissent dans une fenêtre, il faudra ensuite les coller dans un classeur Excel.

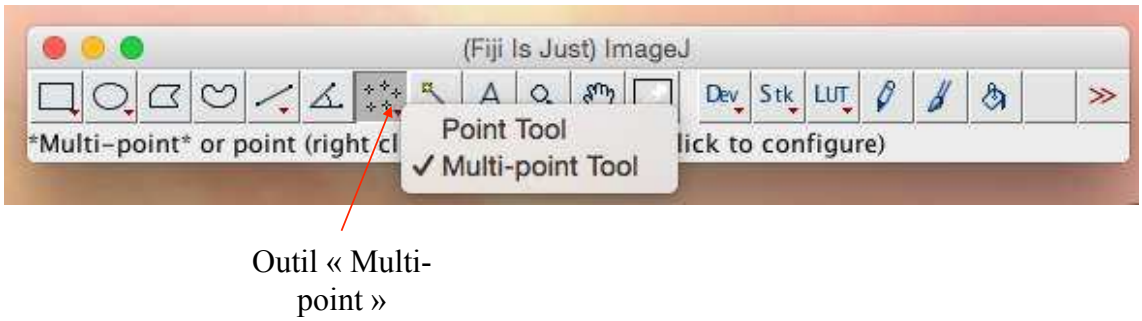


Figure SII.1 *Capture d'écran de la console principale du logiciel ImageJ*
Il faut faire un clique droit sur le bouton « Multi-point tool » pour sélectionner ce réglage.

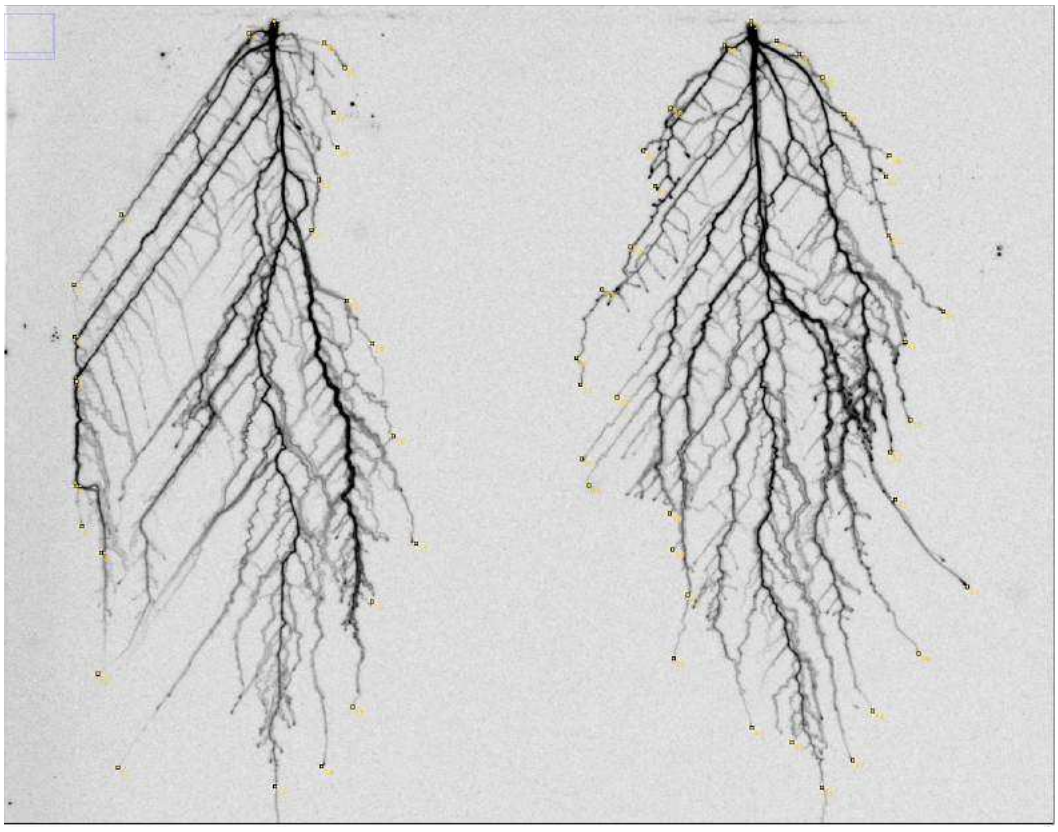


Figure SII.2 *Exemple de disposition des points pour la construction de la forme « brute » du réseau racinaire.*
Les points de coordonnées (*x* ; *y*) sont indiqués en jaune.

Annexe II

- **Forme du système racinaire**

Pour commencer il faut réduire de moitié la résolution des images des systèmes racinaires radiomarqués avec « Xn Convert ». Des images de trop grande résolution ralentissent ImageJ. Puis ouvrir l'image de résolution réduite dans ImageJ :

- File
- Open
  - Sélectionner l'image désirée
- Open

Ensuite, faire apparaitre la fenêtre de résultat :

- Analyze
- Measure
  - La fenêtre apparaît alors

Il faut maintenant sélectionner l'outil « Multi-point », pour ce faire cliquer droit sur l'icône « multipoint » de la console et sélectionner « Multi-point tool » (**Figure SII.1**). Il suffit maintenant de disposer les points tout le long de la racine comme illustré en **figure SII.2**. Les coordonnées des points s'affichent dans la fenêtre « Results ». Copier les données dans un classeur Excel. La forme « brute » est ensuite générée avec le logiciel « Grapher », inclus dans les utilitaires de Mac OS X (**Figure SII.3**). « Grapher » permet d'obtenir des images des graphiques (= formes) de bien meilleure résolution que dans Excel. A partir des images générées au format JPEG dans « Grapher », les coordonnées sont extraites avec un palier régulier en *y* (en profondeur) de 0.5 cm soit tous les 100 pixels en utilisant le logiciel « PlotDigitilizer ». Ce programme permet d'extraire les données directement depuis une courbe d'un graphique de fonction non définie, ce qu'il n'est pas possible de faire dans Excel. En premier lieu, il faut ouvrir la forme « brute » obtenue avec « Grapher » :

- Fichier
- Ouvrir
  - Sélectionner l'image
- Ouvrir

Il faut maintenant calibrer le logiciel, c'est à dire définir l'échelle des axes *x* et *y* :

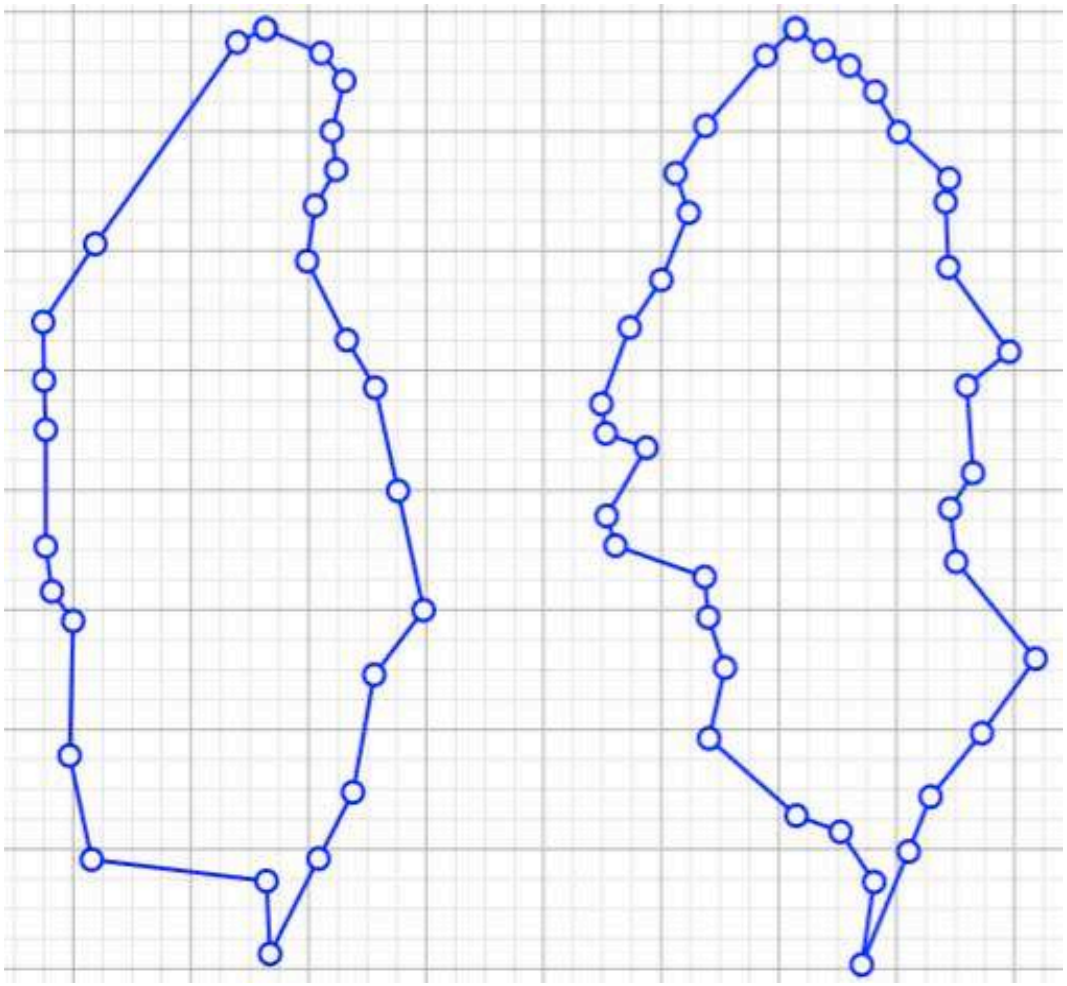


Figure SII.3 *Forme « brute » du système racinaire*.
Les intervalles entre les points en *y* ne sont pas réguliers d'où la nécessité de générer une forme du système racinaire « nette » avec un intervalle régulier en *y*.

- Calibrer
  - Suivre les instructions indiquées en bas à droite pour la calibration
  - Après calibration l'axe des abscisses apparaît en rouge et l'axe des ordonnées en bleu (**Figure SII.4**)

Quant les deux axes sont calibrés, la numérisation peut commencer, cliquer sur le départ de la racine, une croix jaune apparaît alors. Continuer le processus tous les 100 pixels (indiqués par des lignes grises) en suivant la racine jusqu'à retourner au point de départ de la racine. Enfin cliquer sur Numériser, un tableau apparaît avec les valeurs, il faut alors les coller dans un classeur Excel. Un exemple est montré en **figure SII.5**. Une fois les données collées dans Excel, il faut les normaliser de manière à ce que le point de départ de la racine soit de coordonnées (0 ; 0). De plus il faut convertir les pixels en cm (100 pixels = 0.5 cm). On obtient alors la forme « nette » du système racinaire étudié (**Figure SII.6**).

Une fois toutes les données récupérées et normalisées, les valeurs des coordonnées x avec la même coordonnée y (la même profondeur) ont été moyennées de part et d'autre de la racine pour générer une forme moyenne du système racinaire considéré. Un exemple est présenté en **figure SII.7**.

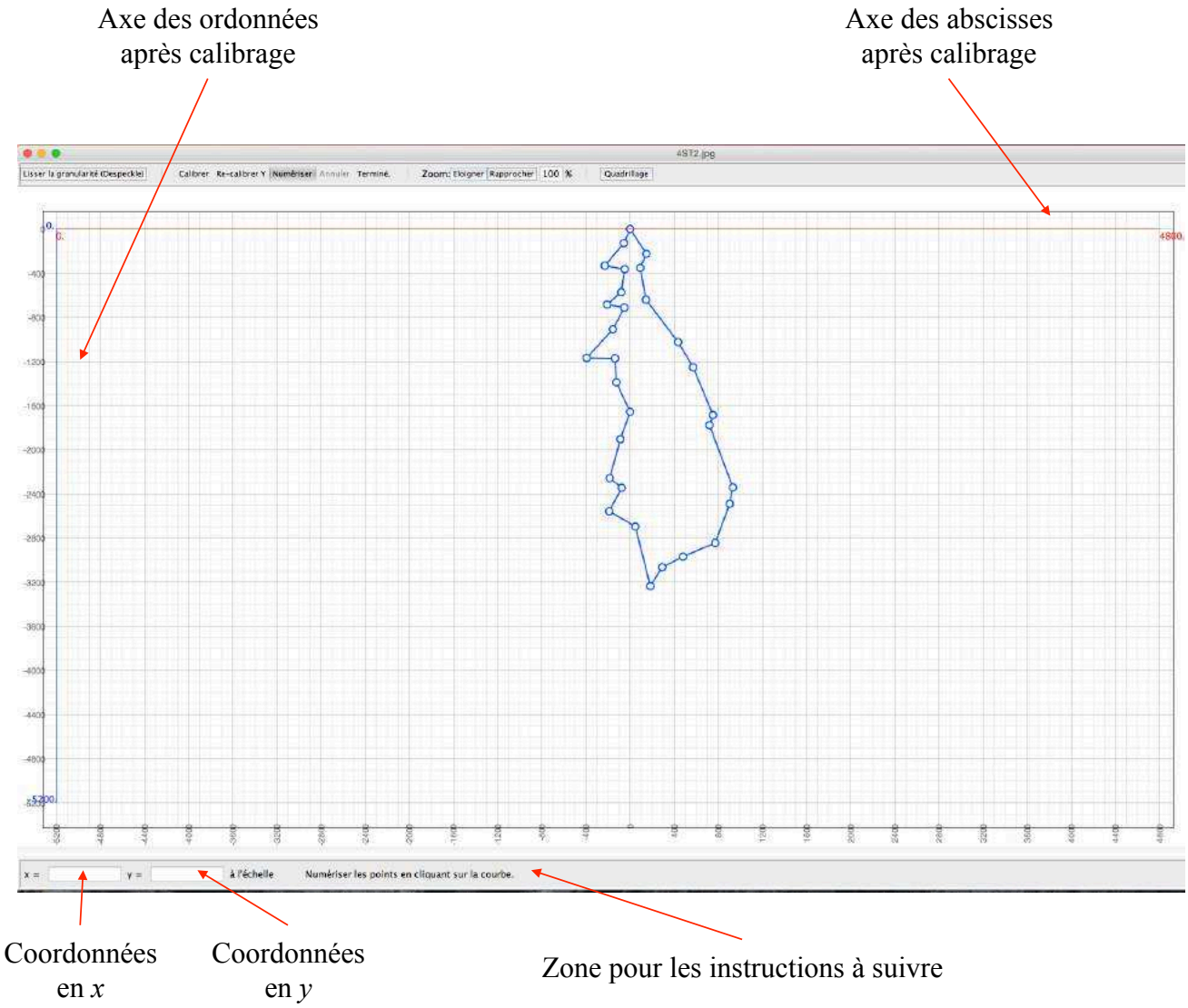


Figure SII.4 *Capture d'écran de la fenêtre du logiciel PlotDigitilizer après calibrage des axes des abscisses et des ordonnées.*

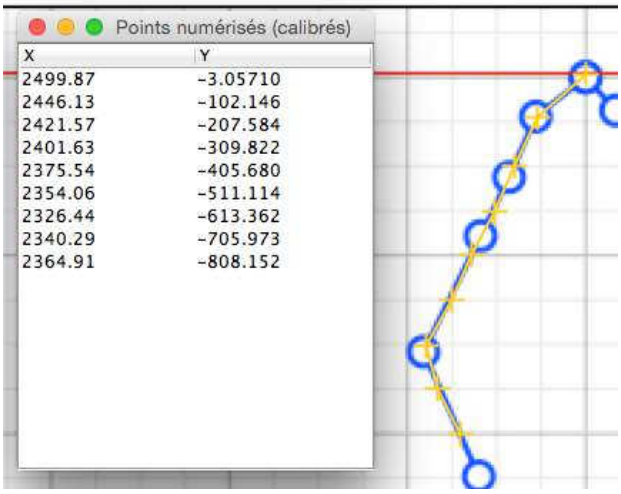


Figure SII.5 *Capture d'écran de la fenêtre du logiciel PlotDigitilizer après extraction des coordonnées des points souhaités.*

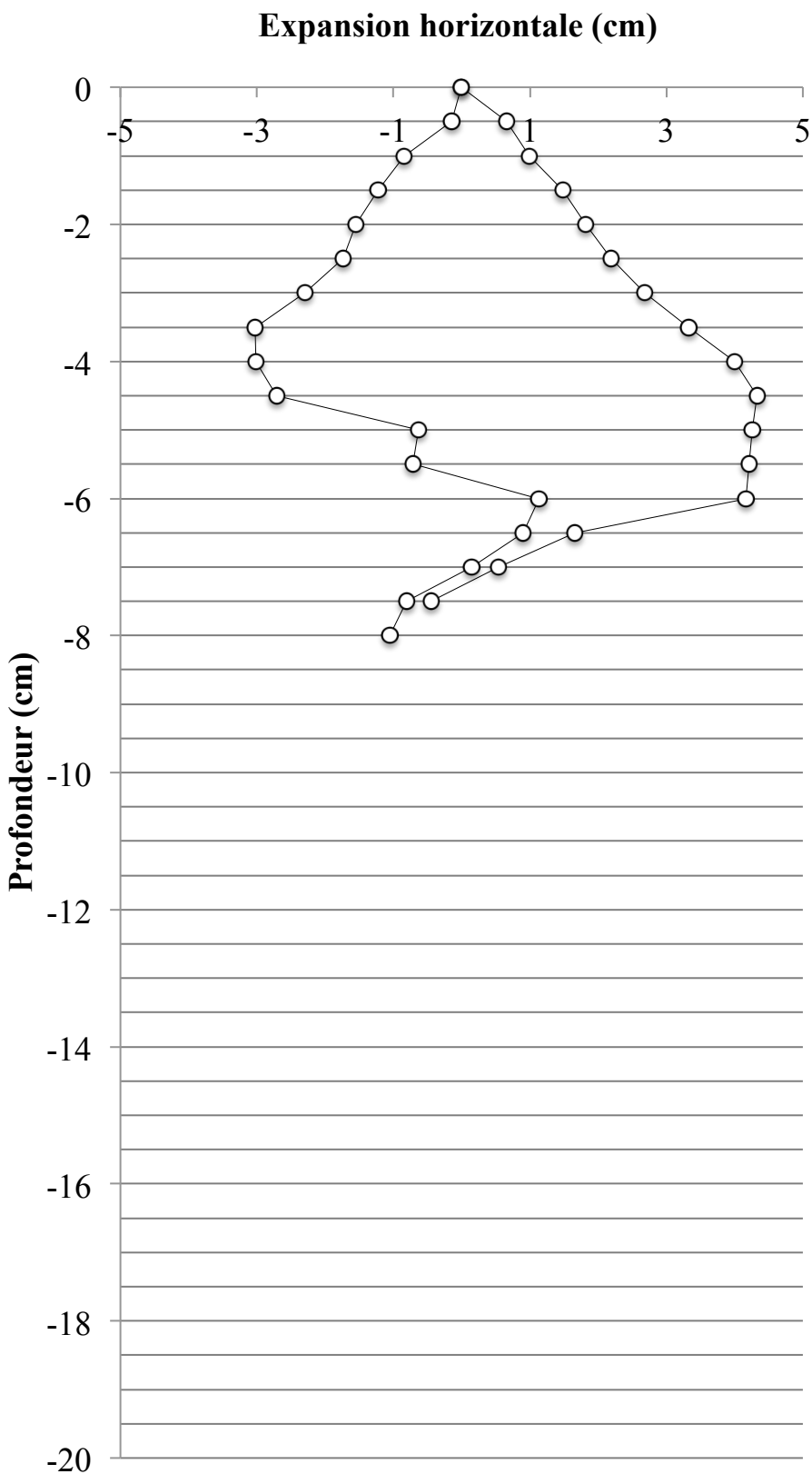


Figure SII.6 *Exemple d'une forme « nette » du système racinaire*.
Les intervalles entre les points en *y* sont maintenant réguliers (0,5 cm).

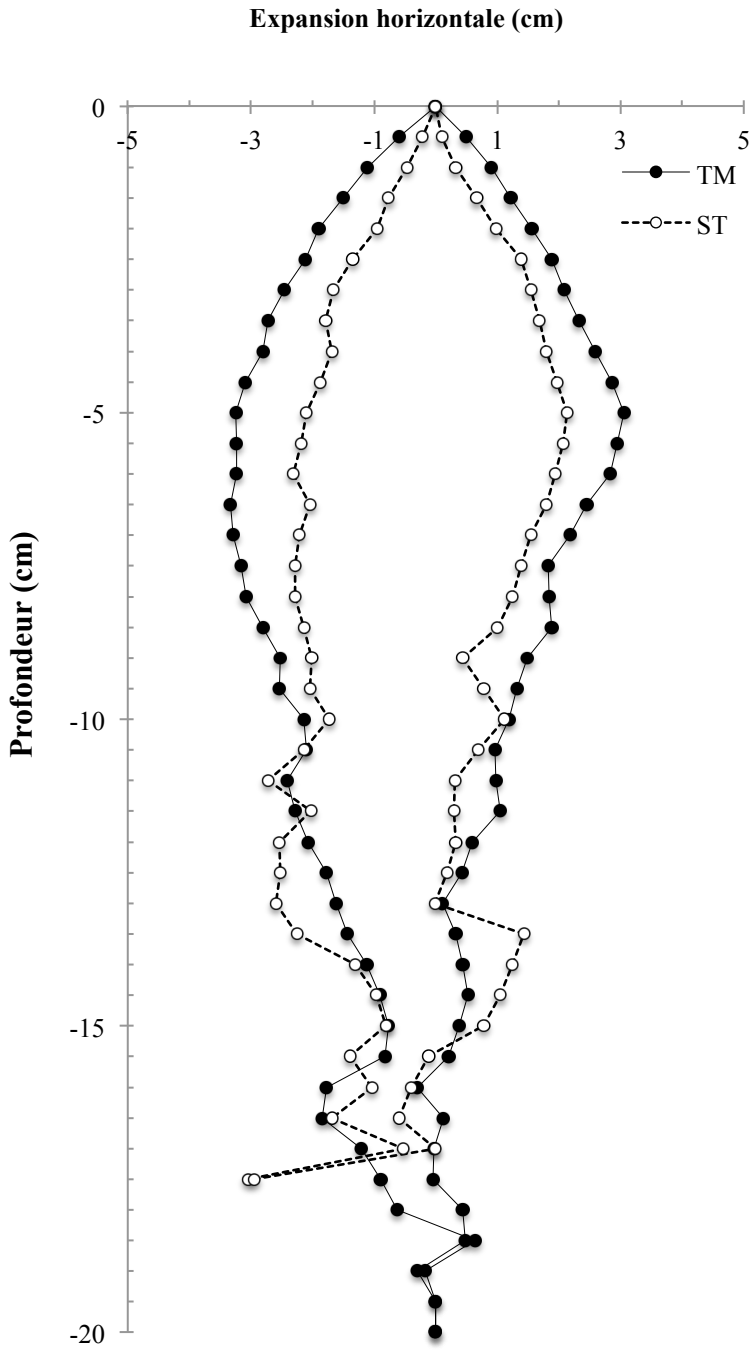
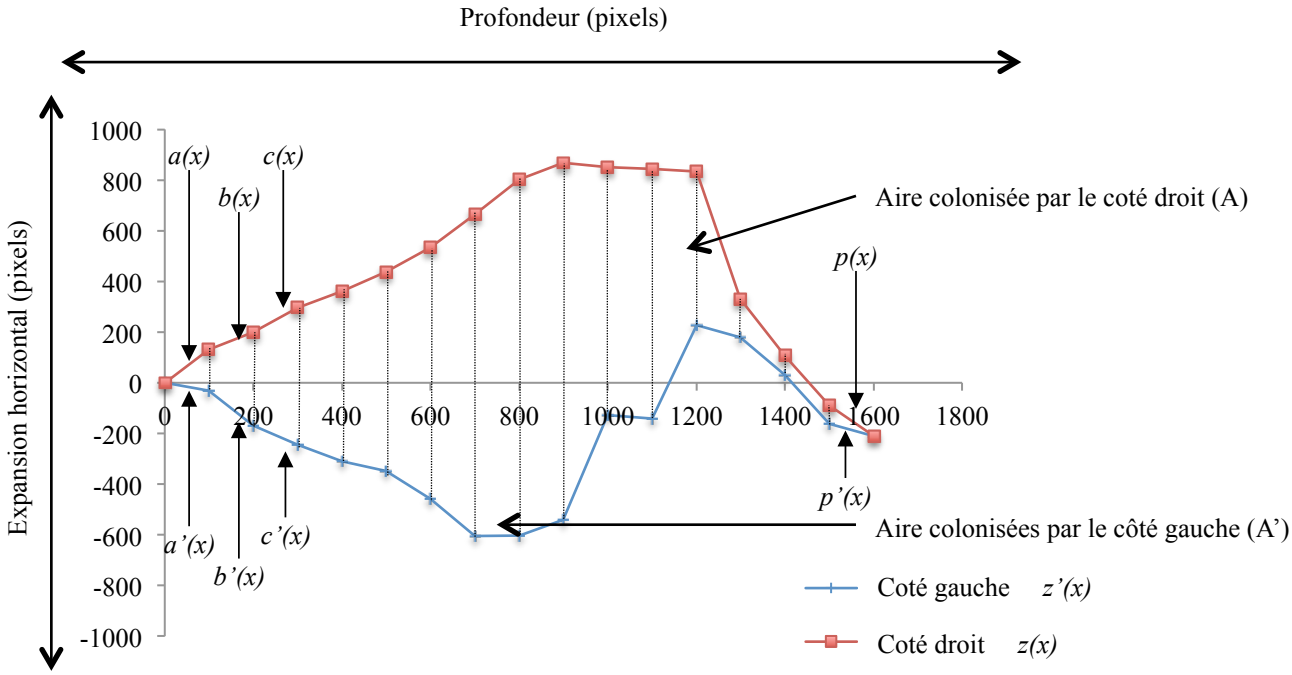


Figure SII.7 *Forme moyenne « nette » du système racinaire des plantes témoins (Tm) et stressées (St)*
Les intervalles entre les points en *y* sont réguliers (0,5 cm).



$$\text{Aire colonisée par la racine} = A + A' = \int_0^{1600} z(x)\,dx - \int_0^{1600} z'(x)\,dx = \left(\int_0^{100} a(x)\,dx + \int_{100}^{200} b(x)\,dx + \int_{200}^{300} c(x) + \ldots + \int_{1500}^{1600} p(x)\,dx\right) - \left(\int_0^{100} a'(x)\,dx + \int_{100}^{200} b'(x)\,dx + \int_{200}^{300} c'(x) + \ldots + \int_{1500}^{1600} p'(x)\,dx\right)$$

$$= \left(\left(A(100) - A(0)\right) + \left(B(200) - B(100)\right) + \left(C(300) - C(200)\right) + \ldots + \left(P(1600) - P(1500)\right)\right) - \left(\left(A'(100) - A'(0)\right) + \left(B'(200) - B'(100)\right) + \left(C'(300) - C'(200)\right) + \ldots + \left(P'(1600) - P'(1500)\right)\right)$$

Figure SIII.1 *Méthode pour déterminer l'aire colonisée par le système racinaire*
a(x), *b(x)*, *c(x)* jusqu'à *p(x)* et *a'(x)*, *b'(x)*, *c'(x)* jusqu'à *p'(x)* sont des équations de la forme *ax +b*. Leur primitive est donc de la forme ½ ax^2+bx. Pour déterminer l'aire totale, l'équation de chaque droite entre deux points séparés de 100 pixels doit être déterminée. Le calcul intégral présenté permettra ensuite de déterminer l'aire colonisée par la racine.

Annexe III

- **Aire colonisée par le système racinaire**

L'aire de chaque système racinaire est calculée à partir de la forme nette de ce dernier. Chaque système racinaire est défini avec une résolution en profondeur de 0.5 cm (100 pixels). Ainsi deux points se suivant en profondeur forme une droite dont l'équation est de la forme $ax+b$. A partir des coordonnées des points reliant cette droite, cette équation peut être déterminée ainsi :

- Soit 1 et 2 ; deux points de coordonnées respectives $(x_1 ; y_1)$ et $(x_2 ; y_2)$ relié par une droite d'équation $ax+b$. On a alors :
  - $a = (y_2-y_1)/(x_2-x_1)$ et $b= y_2-(a.x_2)$

L'aire est calculée en effectuant l'intégrale de part et d'autre de la racine avec un pas de 0,5 cm (100 pixels). Pour faire simple, cela revient premièrement à calculer l'aire entre la droite d'équation $ax+b$ considérée et l'axe des abscisses tous les 100 pixels. L'aire totale du système racinaire correspond ensuite à la somme de toutes les aires. La méthode utilisée est présentée en **figure SIII.1.**

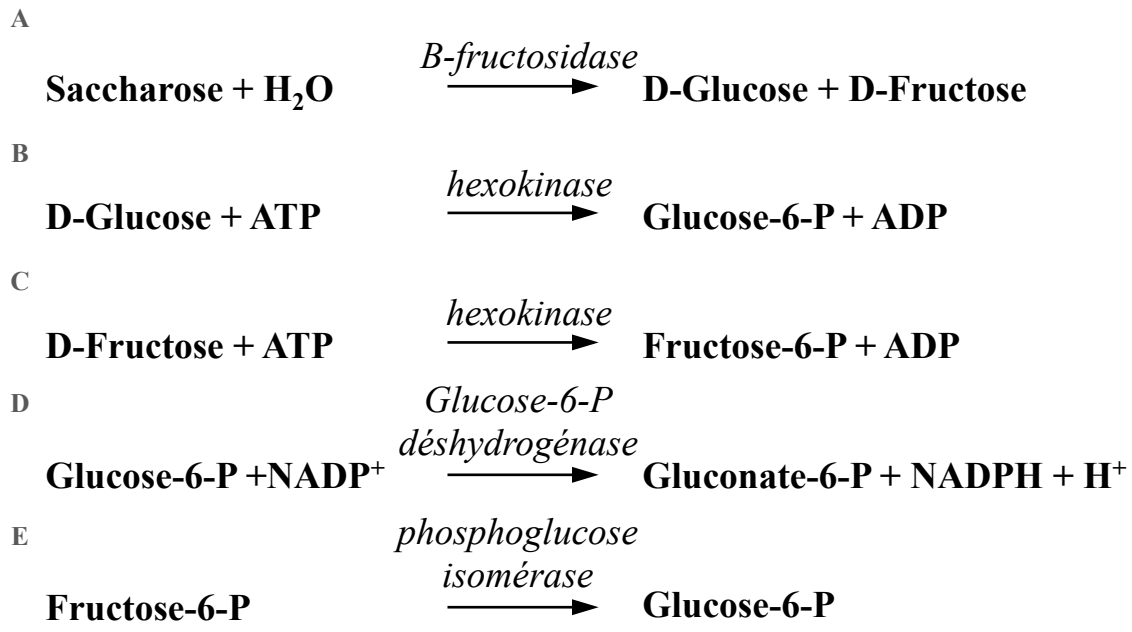


Figure SIV.1 *Méthode de dosage enzymatique des sucres solubles : saccharose, glucose et fructose.*

Tableau SIV.1 *Protocole de dosage enzymatique des sucres solubles*

	Réaction saccharose (Partie I)		Réaction glucose fructose (Partie II)	
	Blanc	**Ech.**	Blanc	**Ech.**
β-fructosidase (4000 u.mL^{-1}) (µL)	50	**50**	-	**-**
Ech. (µL)	-	**25**	-	**25**
Eau (µL)	25	**-**	75	**50**
Vortex - Incubation 5'				
Eau (µL)	665			
Tampon (µL)	35			
NADP+ ATP (µL)	35			
Vortexer- Incubation 3' Lecture DO 340 nm **(A1)**				
Hexokinase/G6PDH (420/210 u.mL^{-1}) (µL)	7			
Vortexer - Incubation 15 min- Lecture DO 340 nm **(A2)**				
PGI (1000 u.mL^{-1}) (µL)	-		7	
Vortex- Incubation 3' Lecture DO 340 nm **(A3)**				

Annexe IV

Le « Sucrose/Fructose/D-Glucose Assay Kit » (Megazyme) est un kit de dosage enzymatique des sucres solubles (saccharose, glucose, fructose). Le dosage est réalisé en semi micro cuvettes UV. Il est séparé en deux parties exécutées en même temps :

- Une partie concernant le dosage du saccharose (Partie I)
- Une partie concernant le dosage du glucose et du fructose (Partie II)

Lors de la partie I, le sucrose est converti en glucose et fructose par la β-fructosidase (**Figure SIV.1, A**). Glucose et fructose sont ensuite phosphorylés par l'hexokinase (**Figure SIV, B et C**). Le glucose-6-P est alors converti en gluconate-6-P par la glucose-6-P déshydrogénase en présence de $NADP^+$. Cette réaction libère une molécule de NADPH pour une molécule de glucose (**Figure SIV.1, D**). C'est le NADPH qui est alors dosé avec un spectrophotomètre (λ=340 nm). Dans la partie I, c'est le glucose endogène en plus du glucose généré par la dégradation du saccharose qui est quantifié.

Lors de la partie II, glucose et fructose sont phosphorylés par l'hexokinase (**Figure SIV, B et C**). Le glucose-6-P est alors converti en gluconate-6-P par la glucose-6-P déshydrogénase en présence de $NADP^+$. Cette réaction libère une molécule de NADPH pour une molécule de glucose (**Figure SIV.1, D**). C'est le NADPH qui est alors dosé avec un spectrophotomètre (λ=340 nm). C'est ici le glucose endogène qui est alors quantifié. Puis le fructose-6-P est converti en glucose-6-P par la phosphoglucose isomérase (**Figure SIV.1, E**). Ce glucose-6-P est alors converti en gluconate-6-P par la glucose-6-P déshydrogénase en présence de $NADP^+$. Cette réaction libère une molécule de NADPH pour une molécule de glucose et par conséquent par molécule de fructose (**Figure SIV.1, D)**. Le NADPH est alors dosé avec un spectrophotomètre (λ=340 nm) pour déterminer la teneur en fructose.

La quantité de glucose provenant spécifiquement du saccharose est déterminée en effectuant la différence entre le dosage du glucose de la partie I (endogène + saccharose) et le dosage du glucose de la partie II (endogène).

Le dosage est effectué sur 25 µL d'extrait de sucres solubles. Le protocole est présenté en **tableau SIV.1**. La méthode de calcul pour obtenir la quantité de sucres (µg) extraits est expliquée en **figure SIV.2**. Il suffit de diviser la quantité (µg) par la masse molaire ($g.mol^{-1}$) puis par la quantité de matière sèche utilisée pour l'extraction (g) pour obtenir la teneur en sucres de l'échantillon ($\mu mol.g^{-1}$).

	Saccharose-Partie I			Glucose-Fructose-Partie II		
	A1	A2	-	A1	A2	A3
Echantillon	DO_{SAC1}	DO_{SAC2}	-	DO_{GF1}	DO_{GF2}	DO_{GF3}

Les DO des blanc sont prises en compte dans les « valeurs » présentées.

$$\Delta_{SAC} = DO_{SAC2} - DO_{SAC1} \qquad \Delta_{GF2} = DO_{GF2} - DO_{GF1}$$

$$\Delta_{GF3} = DO_{GF3} - DO_{GF2}$$

$$Coef._{Sac} = (V_{tot\ cuve} * M_{Sac} * V_{Extrait}) / (\varepsilon_{NADPH} * V_{Ech}) = (0{,}817 * 342{,}3 * V_{Extrait}) / (6300 * 0{,}025)$$

$$Coef._{Glu} = (V_{tot\ cuve} * M_{Glu} * V_{Extrait}) / (\varepsilon_{NADPH} * V_{Ech}) = (0{,}817 * 180{,}16 * V_{Extrait}) / (6300 * 0{,}025)$$

$$Coef._{Fru} = (V_{tot\ cuve} * M_{Fru} * V_{Extrait}) / (\varepsilon_{NADPH} * V_{Ech}) = (0{,}824 * 180{,}16 * V_{Extrait}) / (6300 * 0{,}025)$$

Unités:
$V_{tot\ cuve}$ en mL
M en $g.mol^{-1}$
$V_{Extrait}$ en µL
ε_{NADPH} en $L.mol^{-1}.(cm^{-1})$
V_{ech} en mL

$$Saccharose\ extrait\ (\mu g) = Coef._{Sac} * (\Delta_{SAC} - \Delta_{GF2})$$

$$Glucose\ extrait\ (\mu g) = Coef._{Glu} * (\Delta_{GF2})$$

$$Fructose\ extrait\ (\mu g) = Coef._{Glu} * (\Delta_{GF3})$$

Figure SIV.2 *Méthode de calcul de la quantité de sucres solubles d'un échantillon.*

Annexe V

- **Digestion de l'amidon**

Le dosage de l'amidon est effectué sur les culots restant à l'issue de l'extraction des sucres solubles selon le protocole MCE (Méthanol Chloroforme Eau). Les culots sont généralement conservés dans l'alcool à 80° à -20°C. Aussi, avant de commencer la digestion de l'amidon il convient d'évaporer cet alcool en utilisant le concentrateur.

Le protocole ici présenté est donné pour la digestion d'un culot d'amidon dans un tube de 2 mL provenant d'environ 10 mg de poudre lyophilisée. Les manipulations décrites prochainement sont à effectuer sur les culots évaporées.

Ajouter 40µL d'alcool à 80° pour mouiller le culot et l'amidon présent, et bien vortexer.

Ajouter 580µL de tampon MOPS (pH7, 11,5g de sel MOPS, 0,74g de chlorure de calcium pour 1L, ajuster le pH avec de l'HCl 1M) et 20 µL d' amylase (3000 $u.mL^{-1}$, Megazyme). Faire un mix ici est préférable. Bien vortexer.

Laisser incuber 12' à 95°C, en vortexant toutes les 4'. Mettre du cellophane autour des tubes afin qu'ils ne s'ouvrent pas dans le bain marie.

Laisser reposer les tubes 5 à 10 min.

Ajouter 780 µL de tampon acétate de sodium 200mM pH 4,5 (11,6 mL d'acide acétique glacial pour un 1L, ajuster le pH à 4,5 avec une solution de NaOH 1M) et 20µL d'amylo-glucosidase (3260 $u.mL^{-1}$, Megazyme). Faire un mix ici est préférable. Bien vortexer.

Laisser incuber pendant 30' à 50°C en vortexant toutes les 5 min.

- **Dosage du glucose**

Le dosage du glucose est effectué sur 50 µL de l'extrait digéré avec un kit de dosage enzymatique (D-Glucose Assay Kit, Megazyme). Le dosage est réalisé en semi micro cuvettes UV.

Ajouter 50 µL de l'échantillon à doser puis 25 µL d'eau. (Pour le blanc mettre le produit de digestion d'un échantillon sans culot d'amidon).

Ajouter 735µL d'un mix comprenant (665 µL d'eau, 35 µL de $NADP^{+}$/ATP, et 35 µL de tampon).

Vortexer et attendre 10’ à 15’. Mesurer la DO à 340 nm (A1).

Ajouter 7µL d’hexokinase/G-6-P-DH. Vortexer. Attendre 15’ à 20’. Mesurer la DO à 340 nm (A2).

La quantité d’amidon présente dans l’échantillon digérée s’exprime alors ainsi :

$$\Delta DO = (A2 - A1)_{ech} - (A2 - A1)_{blanc}$$

$$Coef._{Glu} = (V_{tot\ cuve} * M_{Glu} * V_{Extrait}) / (\varepsilon_{NADPH} * V_{Ech}) = (0{,}817 * 180{,}16 * 1440) / (6300 * 0{,}050)$$

$$Ratio_{\text{ Amidon/Glucose}} = M_{Eq.Glucose} / M_{Glu} = (162 / 180{,}16)$$

Unités:

$V_{tot\ cuve}$ en mL

M en $g.mol^{-1}$

$V_{Extrait}$ en µL

ε_{NADPH} en $L.mol^{-1}.(cm^{-1})$

V_{ech} en mL

Il suffit de diviser la quantité (µg) par la masse molaire ($g.mol^{-1}$) puis par la quantité de matière sèche utilisée pour l’extraction (g) pour obtenir la teneur en amidon (Equivalent glucose) de l’échantillon ($\mu mol.g^{-1}$).

$$Amidon\ extrait\ (\mu g) = Coef._{Glu} * (\Delta DO) * Ratio_{\text{ Amidon/Glucose}}$$

Annexe VI

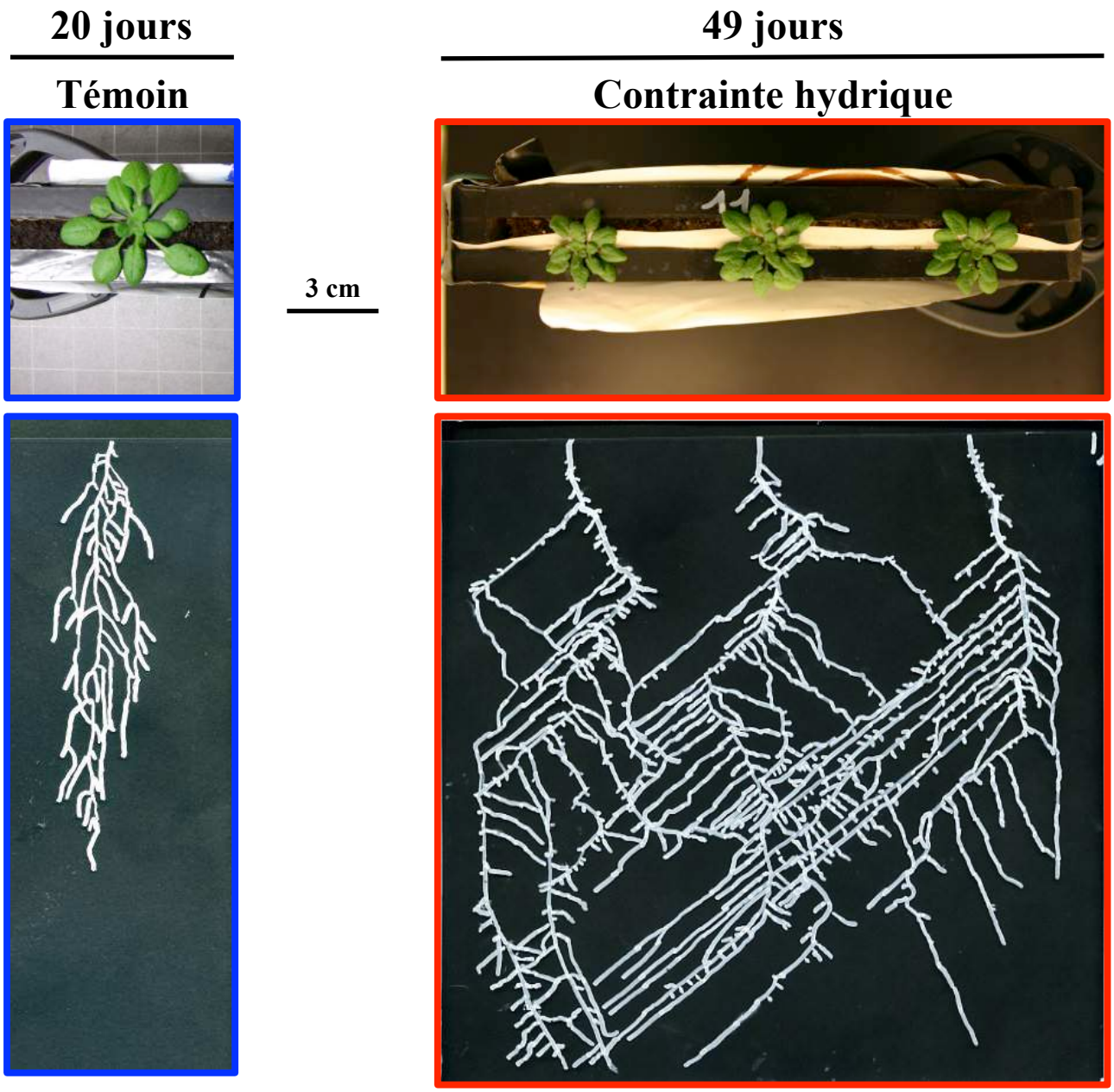


Figure SVI.1 *Comparaison de plantes témoins et de plantes soumises à la contrainte hydrique, respectivement âgées de 20 et 49 jours.*
A surface foliaire équivalente, les plantes soumises à la contrainte hydrique présentent un système racinaire plus développé que celui des plantes témoins âgées 20 jours.
Les systèmes racinaires ont été dessinés « à la main » sur des calques transparents à partir des système racinaire existants.

Annexe VII

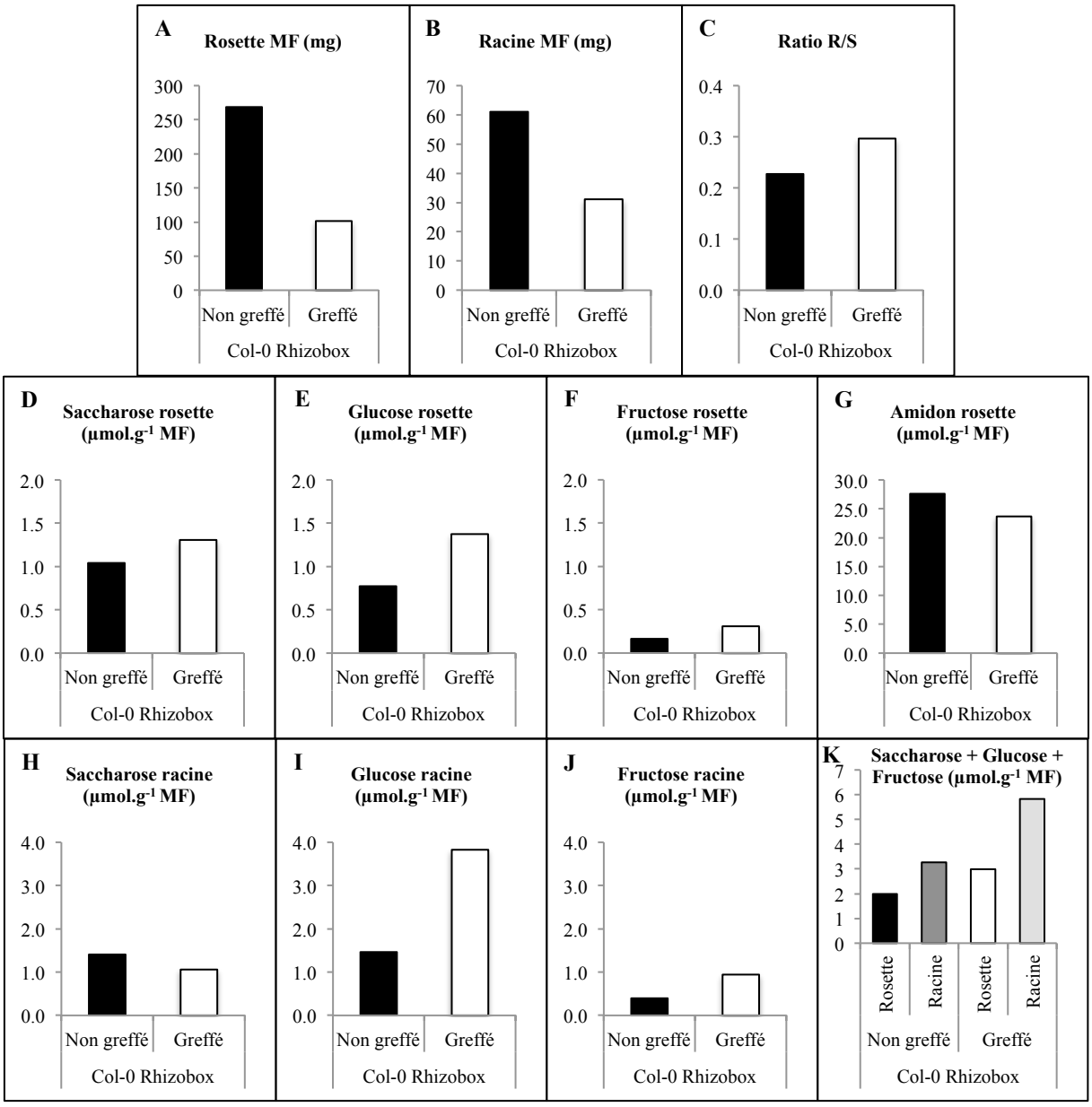


Figure SVII.1 *Comparaison des plantes Col-0, greffées et non greffées âgées de 30 jours: développement, teneurs en sucres des feuilles et des racines.*
A à C, Donnée physiologiques concernant la biomasse**. D à G**, Teneurs en sucres solubles et amidon des feuilles**. H à J**, Teneurs en sucres solubles de la racine. **K**, Sucres solubles totaux.
Les données pour les plantes non greffées proviennent des plantes Col-0 « Tm » du chapitre IV. Les teneurs en sucres issues de ce chapitre ont été converties en µmol.g^{-1} de poids frais en accord avec la teneur en eau de la rosette et de la racine. De même le ratio R/S a été calculé à partir des poids frais.
Les données pour les plantes greffées proviennent des plantes greffées Col-0/Col-0 présentées dans le chapitre VII.

Annexe VIII

Source-to-sink transport of sugar and reguation by environmental factors

Remi Lemoine[1], Sylvain La Camera[1], Rossitza Atanassova[1], Fabienne Dédaldéchamp[1], Thierry Allario[1], Nathalie Pourtau[1], Jean-Louis Bonnemain[1], Maryse Laloi[1], Pierre Coutos-Thévenot[1], Laurence Maurousset[1], Mireille Faucher[1], Christine Girousse[2], Pauline Lemonnier[1], Jonathan Parrilla[1] and Mickael Durand[1]

1 Unités Mixtes de Recherche, Ecologie et Biologie des Interactions, Université of Poitiers/Centre National de la Recherche Scientifique, Poitiers, France

2 Diversité et Ecophysiologie des Céréales, Unités Mixtes de Recherche, Clermont Ferrand, France

frontiers in
PLANT SCIENCE

REVIEW ARTICLE
published: 24 July 2013
doi: 10.3389/fpls.2013.00272

Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors

Remi Lemoine[1]*, Sylvain La Camera[1], Rossitza Atanassova[1], Fabienne Dédaldéchamp[1], Thierry Allario[1], Nathalie Pourtau[1], Jean-Louis Bonnemain[1], Maryse Laloi[1], Pierre Coutos-Thévenot[1], Laurence Maurousset[1], Mireille Faucher[1], Christine Girousse[2], Pauline Lemonnier[1], Jonathan Parrilla[1] and Mickael Durand[1]

[1] Unités Mixtes de Recherche, Ecologie et Biologie des Interactions, Université of Poitiers/Centre National de la Recherche Scientifique, Poitiers, France
[2] Diversité et Ecophysiologie des Céréales, Unités Mixtes de Recherche, Clermont Ferrand, France

Edited by:
John William Patrick, The University of Newcastle, Australia

Reviewed by:
John William Patrick, The University of Newcastle, Australia
Aart Van Bel, Justus-Liebig-University Giessen, Germany

***Correspondence:**
Remi Lemoine, Unités Mixtes de Recherche, Ecologie et Biologie des Interactions, Université of Poitiers/Centre National de la Recherche Scientifique, Bâtiment B31, 3 rue Jacques Fort, Poitiers, 86022 Cedex, France
e-mail: remi.lemoine@univ-poitiers.fr

Source-to-sink transport of sugar is one of the major determinants of plant growth and relies on the efficient and controlled distribution of sucrose (and some other sugars such as raffinose and polyols) across plant organs through the phloem. However, sugar transport through the phloem can be affected by many environmental factors that alter source/sink relationships. In this paper, we summarize current knowledge about the phloem transport mechanisms and review the effects of several abiotic (water and salt stress, mineral deficiency, CO_2, light, temperature, air, and soil pollutants) and biotic (mutualistic and pathogenic microbes, viruses, aphids, and parasitic plants) factors. Concerning abiotic constraints, alteration of the distribution of sugar among sinks is often reported, with some sinks as roots favored in case of mineral deficiency. Many of these constraints impair the transport function of the phloem but the exact mechanisms are far from being completely known. Phloem integrity can be disrupted (e.g., by callose deposition) and under certain conditions, phloem transport is affected, earlier than photosynthesis. Photosynthesis inhibition could result from the increase in sugar concentration due to phloem transport decrease. Biotic interactions (aphids, fungi, viruses...) also affect crop plant productivity. Recent breakthroughs have identified some of the sugar transporters involved in these interactions on the host and pathogen sides. The different data are discussed in relation to the phloem transport pathways. When possible, the link with current knowledge on the pathways at the molecular level will be highlighted.

Keywords: Phloem, sugar transport, source/sink, abiotic factors, biotic factors

SUGAR TRANSPORT IN THE PHLOEM

Among the sugars synthesized in a plant, only a few are transported in the phloem over a long-distance, whatever the species and the type of phloem loading considered. In all cases, sucrose is the main form of carbon found in the phloem. In addition to sucrose, polyols (mainly sorbitol and mannitol) and oligosaccharides of the raffinose family can also be found. In some species, both polyols and raffinose are found in the phloem (Rennie and Turgeon, 2009). Hexose transport in the phloem has also been reported for a limited number of species (van Bel and Hess, 2008) but these results were recently challenged (Liu et al., 2012). Raffinose and other members of the raffinose family oligosaccharides are indirectly involved in the building up of sugar concentrations in the phloem by polymer trapping (Rennie and Turgeon, 2009). Conversely, polyols tend to behave exactly like sucrose as far as transport is concerned and thus, in apoplastic loaders, there are specific polyol transporters (Noiraud et al., 2001b). Unless stated otherwise, sucrose is the main sugar we deal with in the following sections.

According to many studies, up to 80% of photosynthetic fixed carbon can be exported by mature leaves. The amount of sucrose available for export from source leaves depends on several parameters: photosynthetic activity (carbon fixation), partitioning between starch synthesis in the chloroplast and triose-phosphates exported from the chloroplast for sucrose synthesis, and transient storage of sucrose in the vacuole (**Figure 1**). If one of these factors is altered, the amount of sucrose available for export is affected and therefore source/sink relationships can be altered. The pathways for sucrose loading in the conducting cells of the phloem have been documented mostly in the case of active phloem loading in herbaceous species (**Figure 1**). Active phloem loading results in a higher solute concentration in the sieve element-companion cell complex (SE/CC complex) than in the surrounding tissues. The mechanism of active phloem loading from the apoplastic space involves sucrose and polyol transporters that have been identified in numerous species (Noiraud et al., 2001b; Lalonde et al., 2004; Sauer, 2007; Reinders et al., 2012). These transporters can concentrate sugars in the SE/CC complex by dissipating the proton gradient established by an H^+/ATPase located in the same cells. The release of sucrose in the apoplast in the vicinity of the SE/CC complex may be controlled by the recently discovered SWEET facilitators (Chen et al., 2012; **Figure 1**). The second mechanism for active phloem loading is polymer trapping, whereby sucrose is converted to raffinose or larger molecules through addition of galactose to sucrose in

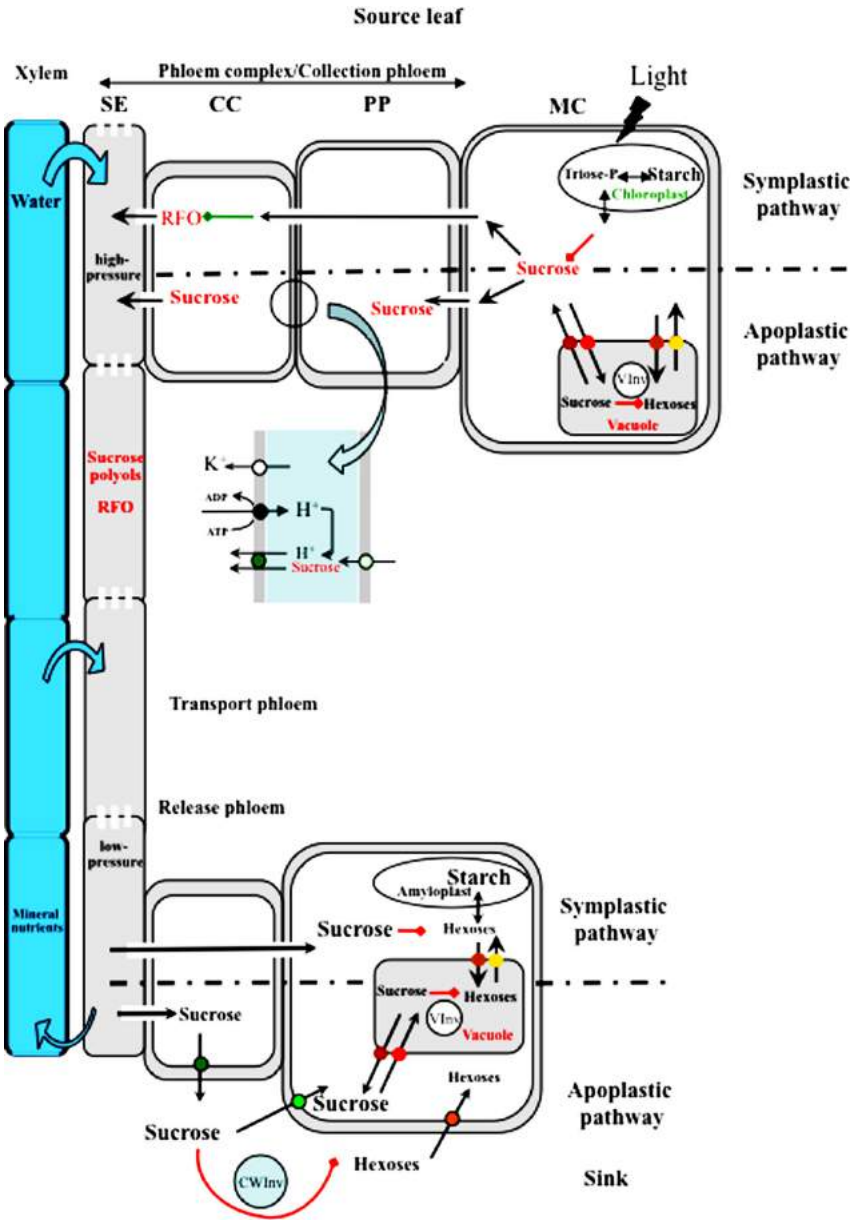


FIGURE 1 | Comparison of source-to-sink sugar transport in symplastic and apoplastic active phloem loaders. Sucrose available for export from mesophyll cells (MC) results from a balance between storage in the vacuoles and sequestration as starch in the chloroplasts. Sucrose can reach the sieve tubes through plasmodesmata that allow for its diffusion from cell to cell in species like cucurbits. Sucrose is converted to larger molecules (RFOs) by the sequential addition of galactosyl residues in modified companion cells (CC) called intermediary cells. The larger molecules cannot move back to phloem parenchyma cells (PP) and are transferred and accumulated in sieve tubes. In apoplast-loading species, sucrose reaches phloem parenchyma cells through plasmodesmata. Sucrose is loaded and accumulates in the phloem by passing through the apoplast between the PP and the CC. The major players are presented in the enlargement of that area. Sucrose enters the apoplast through facilitators of the SWEET family (pale green circle) and is accumulated in the companion cell by a proton/sucrose co-transporter of the SUT1/SUC2 type (green circle). The energy necessary for the co-transport is provided by an H+/pumping ATPase (black circle) which establishes a proton gradient and a trans-membrane potential regulated by potassium channels of the AKT2/3 type (white circle). In Solanaceous species, SUT1 transporters are localized at the plasma membrane of sieve elements (not shown). Polyols can also be transported into the phloem, with specific transporters located in the plasma membrane of CC (not shown). A high hydrostatic pressure is generated in the sieve tubes of the collection phloem and water from the xylem is attracted. Sucrose, RFOs and polyols are transported in the sieve tubes to the sink organs in the transport phloem. All along the path, they can be leaked from and reloaded into the phloem *via* the same mechanism (not shown). Sucrose is unloaded into the release phloem where the hydrostatic pressure is supposed to be lower. Sucrose can be unloaded through a symplastic pathway or through an apoplastic pathway. In the latter case, sucrose is unloaded into the apoplast through specific carriers which can be of the SUT1/SUC2 type (green circle; Carpaneto et al., 2005). Sucrose is then taken up by sink-specific sucrose carriers of the same SUT1/SUC2 (light green circle) or converted to hexoses by a cell-wall invertase (CWInv). Hexoses are then taken up by specific carriers at the plasma membrane (orange circle) or at the tonoplast level (yellow and brown circles). Sucrose in sink cells can be metabolized (growing sinks) or stored as starch in amyloplasts, or imported into the vacuoles (red circles) and further converted to hexoses by a vacuolar invertase (VInv).

intermediary cells (Rennie and Turgeon, 2009). In that case, sugars move from cell to cell through a symplastic pathway (**Figure 1**). Active phloem loading may not be universal as there are many indications of passive loading at least in tree species (Rennie and Turgeon, 2009; Turgeon, 2010b). This is achieved by maintaining high solute concentrations in the mesophyll cells of such species.

These different pathways concern the loading of sucrose in the so-called collection phloem (Van Bel, 2003) which represents the initial step of long-distance transport. Transport along the path between source and sink occurs in the transport phloem and sucrose is delivered to sink organs by the release phloem (Van Bel, 2003). The most widely accepted concept to explain solute transport in the phloem is mass-flow, as initially proposed by Münch and followers, whereby the hydrostatic pressure difference in the phloem between source (high pressure) and sink (low pressure) accounts for sap movement (**Figure 1**). At many stages along the pathway, specific transporters are involved in the cell-to-cell movement of sucrose or in the intracellular compartmentation between the cytoplasm and organelles; they thus represent major regulators of sugar fluxes. It should be noted that sucrose transporters (SUTs) have been localized and characterized in the three phloem sections. Sucrose can act as a signal and regulate many genes involved in growth and development (Koch, 2004; Muller et al., 2011).

During longitudinal transport, sucrose can be leaked and retrieved but also used by sink cells along the path (axial sinks; Minchin and Thorpe, 1987). In some species, stems or petioles can be turned into storage organs (e.g., celery; Noiraud et al., 2001a) and this function is even more pronounced in tree trunks (Hou, 1985). In such conditions, storage is transient as resources will later be used to support growth along with plant development. These organs successively act as sinks and sources (Juchaux-Cachau et al., 2007). Concerning their ability to retrieve sucrose from the apoplast, the respective membrane potential levels between SEs and phloem parenchyma cells are decisive (Hafke et al., 2005). SUTs are involved in sucrose movement in the transport phloem, even in tree species where loading is symplastic in the collection phloem (Turgeon, 2010b).

In the release phloem, sugars can exit the phloem through either a symplastic or an apoplastic pathway, although the first steps are often symplastic (Fisher and Oparka, 1996; Patrick, 1997). However, unloading pathways depend on the particular sink involved and its development stage (**Figure 1**). In sinks like developing seeds or infected tissues, symplastic discontinuity requires an apoplastic step for the transfer of photo-assimilates. A switch from apoplastic to symplastic unloading was noted during potato tuberization (Viola et al., 2001). In fruit development, contrasting results have been found: in grape berry, Zhang et al. (2006) demonstrated a shift from symplastic to apoplastic unloading whereas in apple and cherry fruit there is evidence for an apoplastic step in sucrose and sorbitol unloading, involving transporters (Gao et al., 2003; Zhang et al., 2004).

In seeds, SUTs but also hexose transporters and cell-wall invertases are responsible for sugar movement but their respective roles differ depending on the development stage (Weber et al., 1997; Weschke et al., 2003). These pathways have been extensively studied in legume seeds, together with the corresponding regulation of sucrose unloading (Zhang et al., 2007).

SOURCE-SINK RELATIONSHIPS IN PLANT AND SUGAR ALLOCATION (SINK STRENGTH)

Sink organs depend on the delivery of sucrose (or other forms of carbohydrates) by the phloem for their growth and development. A plant may be regarded as a series of sources and sinks with an overall carbon fixation capacity and several sinks "competing" for the available photo-assimilates. This creates a priority system among sinks. Roots and young leaves are major sinks during the early developmental stages, whereas tubers, fruit and seeds become major sinks during the reproductive stages (Wardlaw, 1990). The distribution of resources among sinks is also a key factor of plant productivity based on the harvest index (HI). The HI is the ratio of harvested dry weight over plant dry weight (or above-ground shoot dry weight): therefore a high HI indicates that a large amount of photo-assimilates has been diverted to the sinks harvested by humans (Gifford et al., 1984).

In order for plants to reach a balanced development and optimize their reproductive fitness, priority for access to photo-assimilates needs to be established between sinks. Changes in carbon partitioning and switches between the apoplastic and symplastic pathways occur throughout development or as a response to the environment (Roitsch, 1999; Godt and Roitsch, 2006). Concerning the apoplastic pathway, hexose transport resulting from cell-wall invertase/hexose transporter activity has been suggested to predominate in the sink tissues that undergo cell division and elongation, while sucrose transport predominates in the sink tissues that switch to storage mode (Weschke et al., 2000, 2003).

Priority among sinks has been related to the so-called "sink strength" (Ho, 1988) or sink dominance. According to Wardlaw (1990), the underlying basis of sink strength (assuming a pressure flow mechanism for translocation) is an ability to effectively lower the concentration of photo-assimilates in the SEs of the sinks and thus establish a favorable hydrostatic pressure gradient between the source and the sink. In that respect, the role of cell-wall invertases has frequently been highlighted in sink organs as they increase sucrose unloading by converting sucrose to hexoses. Transport of photo-assimilates depends on source supply and sink demand. The role of the phloem sap sugar content in the coupling between sink demand and source activity is still a matter of debate (Minchin et al., 2002). However, high sucrose contents in leaves could have an inhibitory effect on SUT activity and thus inhibit sucrose loading into the phloem. This point was evidenced by feeding sucrose to the transpiration stream of cut sugar-beet leaves (Chiou and Bush, 1998). The authors hypothesized that high sucrose concentrations in the vascular tissue, resulting from decreased sink demand, down-regulated transporter activity. This could lead to decreased phloem loading and increased sugar levels in mesophyll cells, and in turn down-regulated photosynthesis. The opposite regulation is thought to occur in the case of increased sink demand (Chiou and Bush, 1998). This link between sugar export in leaves and sink demand has been re-examined by Ainsworth and Bush (2011) and phloem sucrose transport has been identified as a possible target for improving plant productivity.

Phloem transport capacity may not be a limiting factor, as shown in several reports. In transgenic sugarcane, expressing a sucrose isomerase led to the accumulation of sucralose in addition to sucrose in stalk vacuoles. The sugar concentration was therefore doubled in the juice harvested from stalks (Wu and Birch, 2007). In such plants, photosynthesis and sucrose transport were greatly increased, indicating a release of sink limitation. The overexpression of an *Arabidopsis* tonoplastic glucose transporter (*TMT1*) led to increased glucose contents in the vacuoles of mesophyll cells and to higher seed yield. In these plants, higher expression levels of *AtSUC2*, the transporter that loads sucrose into the phloem in *Arabidopsis*, have been noted (Wingenter et al., 2010). However, TMT1 can also drive sucrose entry into the vacuole (Schulz et al., 2011) and therefore the former interpretation may have to be reconsidered. In rice, when the expression of a SUTs involved in sucrose efflux from the vacuole (OsSUT2) was suppressed, seed production as well as root growth were reduced, indicating that sucrose transport to sinks was impaired (Eom et al., 2011) and confirming the former results obtained in *Arabidopsis*. Altogether these different data suggest a link between the sugar concentration in the cytoplasm of mesophyll cells and the export of sucrose, and indicates source-limitation in wild-type plants.

Taking the former elements into account, source-to-sink sucrose transport can be affected by environmental factors at least at three different levels (**Figure 1**):

(i) the source (e.g., by an effect on photosynthesis or phloem loading), resulting in less sucrose available for export,
(ii) the sink (e.g., increased demand for root growth, pathogens developing on plant organs), leading to a new balance between sinks that can be detrimental to yield,
(iii) the path between source and sink (by e.g., cold treatment, aphids, viruses) leading to impaired sucrose delivery.

Plants undergo large changes in their environment throughout their life and have developed many strategies to respond to these changes. The following sections will try to summarize some of the effects of environmental factors on sucrose transport from source to sink organs.

EFFECTS OF ABIOTIC FACTORS

Among the many environmental factors that can affect plant growth, the present review concentrates on two types: environmental cues and some air and soil pollutants.

EFFECTS OF ENVIRONMENTAL CUES

Effects of water deficit

Water deficit is a major abiotic factor affecting crop development and yield. Drought imposes unfavorable conditions on the leaves (source) and roots (sink) of a plant. However, as pointed out by Turgeon (2010a), the high osmotic potential in the phloem can be a positive parameter for attracting water to the sieve tubes and maintaining phloem sap flow in drought conditions.

Under mild water deficit, shoot growth is restricted while root growth continues and, consequently, plant architecture is modified. In dicots, e.g., pea and grape, the number of branches and the number of leaves on branches are particularly sensitive to soil water deficit (Lecoeur et al., 1995; Lebon et al., 2006). In monocots such as grasses, the number of young emerging organs is reduced under drought (Courtois et al., 2000). As a result of this water-stress avoidance strategy, global photosynthetic productivity may decrease and thus impact the carbon flow to different sink organs.

Most research on the effect of water deficit on sugar metabolism and phloem loading has been led using sucrose-translocating species and demonstrates that in leaves, carbohydrate levels are altered by drought. Sucrose and hexose amounts increase, while starch levels decrease (Pelleschi et al., 1997), suggesting the induction of starch hydrolysis and sucrose synthesis. In cotton, water-stress-induced accumulation of sucrose in the source leaves has been hypothesized as providing an energy supply to maintain cell survival in high-respiration environments (Burke, 2007). Furthermore, sucrose and hexose accumulation is considered to play a major role in osmotic adjustment to maintain metabolic activity in source leaves. However, sugars may also accumulate in leaves because of a decreased demand as a consequence of growth limitation (Hummel et al., 2010).

The effects of water deficit on species that translocate raffinose family oligosaccharides (RFOs) were also investigated since RFOs are involved in desiccation tolerance in seeds (Koster and Leopold, 1988) and in low-temperature acclimation of leaves (Bachmann and Keller, 1995). A hypothetical model depicting the effects of water-deficit stress on the carbon flow between RFOs and *O*-methyl-inositol (OMI) has been proposed in *Coleus*, a drought-tolerant plant. Under stress, reduced RFO levels were observed and, conversely, increased OMI synthesis was noted. The two metabolic pathways share myo-inositol, a ubiquitous plant cyclitol, as an intermediate. In *Coleus*, the activity of galactinol synthase, an enzyme that catalyses the first step of RFO biosynthesis from UDP-galactose, was found down-regulated by water deficit, thus contributing to lower levels of transportable RFOs (Pattanagul and Madore, 1999).

In source leaves, transcript abundance of several genes encoding enzymes involved in gluconeogenesis such as fructose-biphosphate aldolase (Cramer et al., 2007), in the phosphorylation of soluble sugars such as hexokinase (Whittaker et al., 2001), and in RFO biosynthesis such as galactinol synthase (Taji et al., 2002) increased in response to dehydration stress. Transgenic *Arabidopsis* plants that overexpressed galactinol synthase produced elevated amounts of galactinol and raffinose, which may function as osmoprotectants and contribute to water-deficit stress tolerance (Taji et al., 2002). Such an apparent discrepancy between RFO-transporting plants such as *Coleus* and sucrose-transporting ones, such as *Arabidopsis*, may reflect differential responses of distinct species to water stress.

Water deficit induces changes in the concentrations of the main organic nutrients that move inside the sieve tubes, i.e., sugars and amino acids. Analysis of alfalfa phloem sap, collected by stylectomy, indicated a significant increase in sucrose contents and total amino acid concentrations as the leaf water potential decreased from −0.4 to −2.0 MPa. The change in total amino acid concentration was due to larger amounts of Val, Leu, Ile, Glu, Asp, Thr, and especially Pro (Girousse et al., 1996). Similarly, water stress induced increased sucrose and Pro levels in phloem sap collected from cut petioles of *Arabidopsis* leaves by the EDTA method (Mewis et al., 2012).

In sink organs, examples of the negative effects of drought on sink growth have been reported in potato tubers, where osmotic stress promoted sucrose biosynthesis instead of starch biosynthesis *via* the induction of sucrose-phosphate synthase (SPS) and the inhibition of ADP glucose pyrophosphorylase (AGPase; Geigenberger et al., 1997). The degradation of some storage carbohydrates such as starch and fructans in stems has been correlated to starch accumulation in grains (Yang et al., 2004). Likewise, drought led to a fivefold decrease in cytosolic invertase activity in the seeds of *Lupinus albus* (Pinheiro et al., 2005), together with an increase in the activity of vacuolar and cytosolic invertases in leaves, suggesting that the amounts of sucrose available for transport to the seeds are reduced under drought (Kim et al., 2000; Pinheiro et al., 2001; Trouverie et al., 2004). As a conclusion, several observations bring evidence for negative effects of dehydration on the sink/source ratio that are detrimental to crop production in terms of biomass redistribution (Cuellar-Ortiz et al., 2008).

Data about the involvement of SUTs in drought and salinity tolerance remain limited. Group IV SUTs have been identified as tonoplast-localized SUT/H+ symporters able to regulate sucrose movement from the vacuole to the cytosol. In rice photosynthetic leaves, the SUT OsSUT2 was up-regulated during drought and salinity treatments (Ibraheem et al., 2011). Using *PtaSUT4*-RNAi-suppressed poplars, (Frost et al., 2012) demonstrated the effects of altered sucrose compartmentation on photosynthesis efficiency and accumulation of water-stress-related RFOs in source leaves. The authors suggest that export and long-distance sucrose transport may be at least partly controlled by SUT-mediated sucrose sequestration within the vacuole.

The effects of water deficit have also been studied at different development stages. Drought stress can induce senescence and enhance reserve mobilization (Chandlee, 2001). In other terms, senescence and reserve mobilization are integral components of plant development and basic strategies in stress mitigation (Cowan et al., 2005). Studies using tomato plants over-expressing *Arabidopsis* hexokinase showed that increased hexokinase levels in plants induced higher sugar contents, which reduced photosynthetic activity and consequently accelerated senescence in leaves (Dai et al., 1999). Sugar levels can influence leaf progress through senescence as direct causal signals, but also as substrates for carbon mobilization and reallocation to allow plants to alleviate the effects of drought stress (Wingler et al., 1998; Rizhsky et al., 2004; Cramer et al., 2007).

In rice, drought-induced leaf senescence promotes allocation of assimilates to developing grains, shortens grain filling, and increases the grain filling rate (Yang et al., 2002). In soybean, water depletion decreases seed size primarily because of a shortening of the filling period rather than an inhibition of the seed growth rate (Westgate et al., 1989). Since seed growth depends on the supply of assimilates from the maternal plant (source activity), as well as on the demand for assimilates within the embryonic tissues (sink activity), both maternal and embryonic factors contribute to the maintenance of seed growth under water deficit. Thus, the latter authors hypothesized that a rapid depletion of sucrose in and around the embryo would point to a source limitation, whereas a reduction in sucrose uptake would imply a sink limitation. Even though severe water deficit completely inhibits photosynthesis and decreases the sucrose concentration in the cotyledon apoplast by approximately 50%, seeds continue to accumulate dry matter at or near the control rate. Reserve carbohydrates are thus mobilized from all source organs (leaves, stems, and pericarp tissue), and this enhances the apoplastic and/or symplastic supply to support seed filling; water-deficient plants display an increased rate of sucrose uptake relative to their well-watered controls (Westgate et al., 1989), consistent with source limitation.

As an example of fruit development, the ripening grape berry represents a well-characterized example of a very strong sugar sink. Grape yield is reduced under drought, while total sugar content in the surviving berries increases (Huglin, 1986). The early development of grape berry appears as the most drought-sensitive stage, but in spite of negative effects on berry growth, drought does not affect sugar accumulation, confirming that sink strength within individual berries is set by sink activity, not by berry size, as reviewed by Agasse et al. (2009). A shift from a symplastic- to an apoplastic-unloading pathway has been demonstrated. It occurs at the onset of ripening, and is accompanied by a concomitant increase of the expression and activity of cell-wall invertases, leading to a massive import of hexoses (Zhang et al., 2006).

Altogether these data indicate that sensitivity to water deficit is particularly acute during reproductive development because photo-assimilate allocation to newly established sinks such as flowers, seeds, and fruit, can be compromised by competition with roots under drought stress. In order to apply this knowledge to crop improvement, more detailed understanding of drought sensitivity at that crucial stage for productivity is needed. In that respect, it is no surprise that selection for drought resistance should result in the choice of traits affected by modifications in the sink/source relationship in response to drought, such as the accumulation of biomass in reproductive organs (Schnyder, 1993).

Effects of mineral deficiency

Plants acquire mineral nutrients for their growth and development through the roots. Plasticity of the root system architecture is therefore a key adaptation feature that allows plants to cope with a changing environment. As pointed out by Hermans et al. (2006), plants generally respond to a shortage in mineral nutrition by allocating more resources to the organs involved in mineral acquisition, and this results in a larger root surface. Therefore any depletion in mineral supply can have dramatic effects on resource allocation in plants. Marschner et al. (1996) proposed that nutrient deficiency can affect photo-assimilate partitioning either directly *via* phloem loading and transport or indirectly by depressing sink demand.

As a consequence of plant growth reduction or inhibition by mineral deficiency, sugar concentrations increase in plants and in phloem sap (Peuke, 2010). The question remains as to whether the phloem sugar concentration is a stress response and/or a stress signal (Peuke, 2010).

Response to nitrate limitation. Deficiency in nitrogen leads to an accumulation of carbohydrates in leaves and to a higher level of carbon allocated to the root (**Figure 2**) that increases the root/shoot ratio (Marschner et al., 1996; Scheible et al., 1997; Remans et al., 2006). Scheible et al. (1997) reported that the

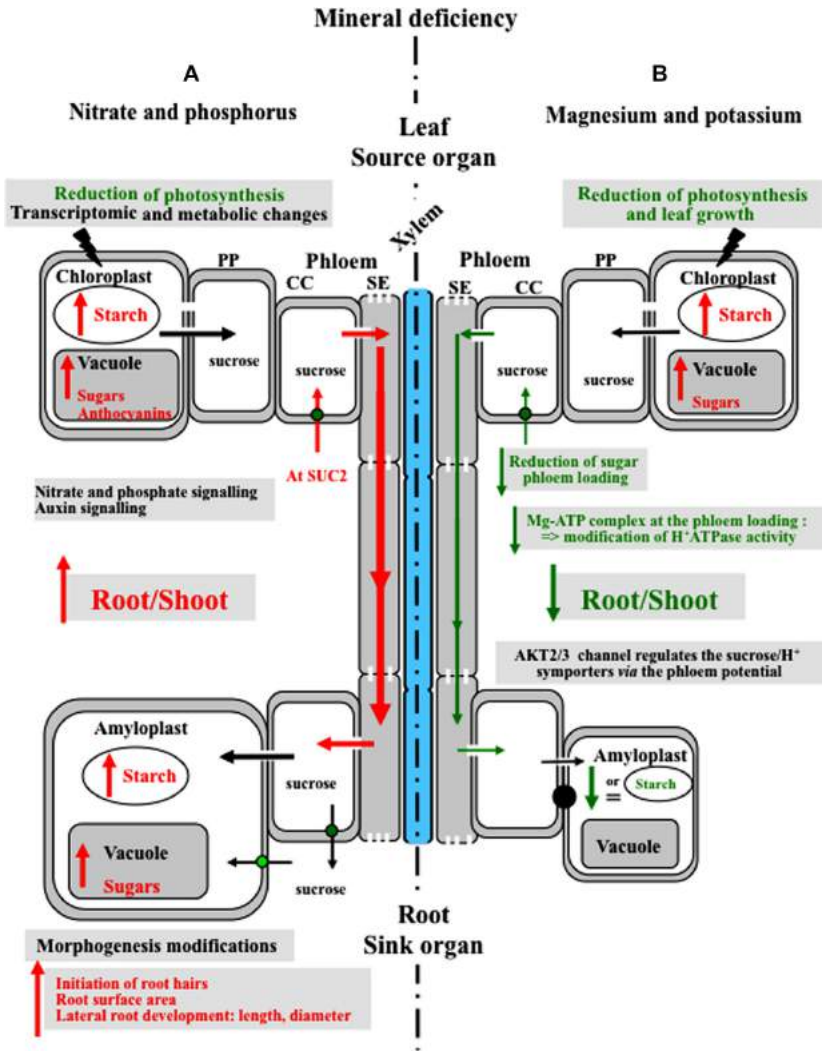


FIGURE 2 | Model of the plant's responses to mineral nutrient deficiency. (A) Response to nitrate and phosphorus deficiency: deficiency in nitrogen and phosphorus leads to reduced photosynthesis, accumulation of sugars in source leaves, increased carbon allocation to the roots and a higher root/shoot ratio. Moreover, phosphorus limitation induces an adaptation of the root system architecture: root hairs initiate and elongate, which increases the root surface area. AtSUC2 (green circle) is a component of the sugar-signaling pathway in the response to phosphorus starvation. **(B)** Response to magnesium and potassium deficiency: Mg deficiency increases the concentration of soluble sugars and starch in leaves and reduces leaf growth. Mg deficiency impacts sugar metabolism, as well as sucrose export to the roots. Mg deficiency reduces the Mg-ATP availability and the activity of H^+-ATPase, thus reducing the driving force for sucrose phloem loading. AKT2/3 potassium channels affect sugar loading and long-distance transport by regulating the H^+/sucrose transporter. Conversely, K^+-limitation rarely results in starch accumulation. MC, mesophyll cell; CC, companion cell; PP, parenchyma phloem; MC, mesophyll cell.

root growth rate is correlated with the root sugar content, and nitrate accumulation in the shoot acts as a signal to regulate root/shoot allocation in tobacco. Sugars accumulated in the leaves of N-deficient plants lead to reduced photosynthesis probably due to feedback metabolite regulation (Martin et al., 2002; **Figure 2**). Nitrogen deficiency reduces photosynthesis by a decrease in RubisCO amount and activity and also a decrease in electron transfer (Paul and Driscoll, 1997; Antal et al., 2010). Hermans et al. (2006) gave some clues as to how N deficiency alters carbohydrate metabolism in the shoot and increases the root/shoot biomass ratio. *Arabidopsis* microarray data suggest that genes related to primary metabolism and carbohydrate metabolism such as starch metabolism, glycolysis, and disaccharide metabolism are significantly over-represented among the differentially regulated genes in the shoots of N-deficient plants (Hermans et al., 2006). All these data show that nitrogen affects the distribution of sugars across plant organs.

Response to phosphorus limitation. Phosphorus is the second most limiting mineral nutrient for crop production after nitrogen. Lack of phosphorus in leaf mesophyll cells has a direct effect on photosynthesis through Pi availability in the chloroplast and leads to reduced carbon assimilation (**Figure 2**). Nevertheless, sucrose translocation into the phloem is maintained and

sometimes increased at least during the early phases of phosphorus starvation (up to 6 days; Hermans et al., 2006).

Like N deficiency, phosphorus limitation induces increased photo-assimilate allocation to the roots and an adaptation of the root system architecture. Root hairs initiate and elongate in response to phosphate starvation, increasing the root surface area (Hammond and White, 2008).

The importance of phloem sucrose transport in P-deficiency signaling has been clearly demonstrated by Liu et al. (2005). In white lupin roots, two genes responsible for phosphate acquisition (*LaPTI*, a phosphate transporter and *LaSAP1*, a secreted acid phosphatase) are rapidly induced by phosphate starvation. When phosphate-starved plants were treated by phloem girdling to prevent shoot-to-root sucrose transport, no induction of either *LaPT1* or *LaSAP1* was noted. In such conditions, delivery to the roots of ^{14}C-sucrose applied onto leaflets was reduced by 95% in stem-girdled plants. Sucrose transport from shoot to root was therefore necessary for phosphate starvation signaling.

In a search for *Arabidopsis* plants affected in secreted acid phosphatase activity, Zakhleniuk et al. (2001) identified *pho3*, a mutant that displays a number of features usually associated with Pi-deficient plants (low Pi, sugar, anthocyanin and starch accumulation in leaves). Moreover, *pho3* mutants were unable to respond further to low Pi (Zakhleniuk et al., 2001; Lloyd and Zakhleniuk, 2004). The mutation was subsequently located in the At*SUC2* gene (Lloyd and Zakhleniuk, 2004) and a link was thus clearly established between sucrose availability for long-distance transport and the response to P starvation. This was confirmed by the over-expression of AtSUC2 in *Arabidopsis* plants that displayed higher sensitivity to P starvation (Lei et al., 2011; **Figure 2**). Altogether, these data clearly demonstrate that sucrose transport to the root is a necessary signal for the response to phosphate starvation, although recent data identified miRNAs translocated into the phloem as key players in the regulation of mineral nutrition (Kehr, 2013).

Response to magnesium and potassium deficiency. Metabolic processes and reactions that are influenced by Mg include chlorophyll formation, photosynthetic carbon dioxide fixation, photo-assimilate phloem loading and partitioning (Cakmak and Yazici, 2010). Accumulation of carbohydrates in leaves is a common phenomenon in Mg-deficient plants (**Figure 2**). Mg deficiency reduces leaf growth more than root growth (**Figure 2**) and impacts on sucrose export to the roots (Hermans et al., 2004; Hermans et al., 2005; Ding, 2011). Mg deficiency is thought to affect phloem sucrose loading by decreasing Mg-ATP availability. Consequently, H^+-ATPase activity could be inhibited, reducing the driving force for active sucrose phloem loading (Marschner et al., 1996; see **Figure 1**). Moreover, in response to Mg deficiency, the expression of *BvSUT1,* a gene encoding a companion cell sucrose/H^+ symporter, was induced in the uppermost expanded leaves, but without further enhancement of sucrose loading into the phloem (Hermans et al., 2005).

K^+ is the major cation in the phloem. Therefore, changes in its amounts can have dramatic effects on phloem functions. The high sugar concentration measured in the leaves of K-deficient plants does not promote any increase in root sugar content or growth. Deeken et al. (2002) demonstrated that AKT2/3 potassium channel affected sugar loading and long-distance transport by regulating sucrose/H^+ symporter activity through the pmf (see **Figure 1**). As a consequence, in the *akt2/3* mutants, the amount of sucrose in the phloem sap was drastically reduced. Unlike N deficiency, K^+ limitation rarely results in starch accumulation.

In conclusion, enhanced carbohydrate transport to the roots has been demonstrated for N and Pi limitation, but not for K or Mg deficiency (Peuke et al., 1994; Hermans et al., 2006; **Figure 2**) and the underlying mechanisms have been partly unraveled.

EFFECTS OF NaCl

Salt stress, due in many places to irrigation with poor quality water, is considered as a major factor limiting plant growth and productivity. Salt stress shares many features with drought stress because in both cases, the primary effect is a lower soil water potential around the roots. Sodium toxicity, due to transport inside the plant *via* the transpiration stream, adds to that initial stress.

Potassium channels are implied in the recirculation of Na^+ inside the plant (Berthomieu et al., 2003). Na^+ can be loaded into the leaf phloem to be directed to roots for excretion, therefore reducing the amount of Na^+ in leaves (Berthomieu et al., 2003), although that flux may be marginal compared to the xylem flux (Davenport et al., 2007).

Little is known about the effects of salt stress on sucrose translocation into the phloem. Salt stress has an inhibitory effect on photosynthesis (Suwa et al., 2008) and in many cases it leads to growth impairment, more important in leaves than in roots (Lohaus et al., 2000). In maize, phloem sucrose concentrations were not altered by salt stress, whereas amino-acid and Na^+ contents of the sieve tube sap increased. The higher amount of amino acids delivered to the roots could partly explain the increased root/shoot ratio (Lohaus et al., 2000). However, in tomato, salt stress can have a direct inhibitory effect on phloem sucrose loading and translocation, leading to a deficit in sucrose partitioning to the roots (Suwa et al., 2008).

Resistance to salt stress is frequently associated with polyol-synthesizing plants as polyols are thought to act both as osmotically active and anti-oxydant molecules. When such plants are subjected to salt stress, their polyol content increases in different organs. Polyols are considered as major molecules for plants to cope with stress (Stoop et al., 1996). In polyol-transporting plants, increased polyol synthesis occurs together with an increased expression of genes encoding polyol transporters located in the phloem in Plantago (Pommerrenig et al., 2007), celery (Landouar-Arsivaud et al., 2011) and olive (Conde et al., 2011), suggesting that long-distance polyol transport is also enhanced in response to salt stress. Increased delivery of polyols to roots could have a positive effect on metabolism and water potential of roots.

EFFECTS OF LIGHT

Light has a direct effect on phloem loading through photosynthesis *via* the synthesis of sucrose and by providing energy. However, light also has an effect on the anatomy of the loading zone itself (Amiard et al., 2005, 2007). Depending on the loading mode (apoplastic or symplastic), the response to transfer from low light to high light (and therefore acclimation to increased photosynthesis) was different: in apoplastic species such

as pea, cell-wall invaginations in the companion cells around the SE increased (Amiard et al., 2005). This indicated an increased exchange surface that allowed for higher sucrose phloem loading. On the contrary, in symplastic loaders such as pumpkin, plasmodesmatal frequencies did not increase, leading to starch accumulation in leaves (Amiard et al., 2005). The capacity of apoplastic loaders to increase the surface for membrane-mediated sucrose transfer around the conducting cells was further investigated (Amiard et al., 2007). Besides its role in nutrient exchange, cell-wall enlargement was proposed as protecting phloem cells against pathogens and insects.

EFFECTS OF LOW TEMPERATURES

Low temperatures can affect phloem sugar transport in different ways, involving distinct cell types (intermediary cells, parenchyma transfer cells, SEs).Considering that species with a symplastic minor-vein configuration dominate in tropical regions and that species with an apoplastic configuration dominate in temperate zones, temperature is considered as a major parameter of the phloem-loading mode in plants. Symplastic loaders are considered as more cold-sensitive than apoplastic loaders (Gamalei, 1991; Van Bel and Gamalei, 1992). Gamalei et al. (1994) proposed that in herbaceous species and deciduous trees, the collapse of intermediary cells at low temperatures, which leads to decreased photo-assimilate loading, could explain the sensitivity of symplasmic phloem loading to cold. However, these ultrastructural changes have not been observed in broadleaf-evergreen species *(Ajuga reptans*, *Aucuba japonica*, and *Hedera helix*) with a symplastic phloem-loading mode. The winter leaves of these plants have a higher exudation rate at low temperatures and no starch accumulation is observed in their chloroplasts. Therefore, the removal of excessive photo-assimilates from source leaves under low temperature may be necessary to maintain their functional and structural integrity and can thus be regarded as a result of cold acclimation (Hoffmann-Thoma et al., 2001). Later physiological studies (Schrier et al., 2000) revealed no differences between symplastic and apoplastic species in their response to cold. This led to the hypothesis that the phloem-loading mode was related to growth architecture rather than habitat, and was confirmed by a study by Davidson et al. (2011).

In monocot and dicot plant species, tocopherol (vitamin E) deficiency impairs photoassimilate export from source leaves *via* enhanced callose deposition in the vascular tissues (Hofius et al., 2004). The same effect has also been described for phloem loading under low temperature (Maeda et al., 2006). The *Arabidopsis vitamin E2 (vte2*) mutants, which lack α-tocopherol (the major tocopherol in leaves), exhibit dramatic phenotypes under low temperature. When they are transferred to non-freezing low-temperatures (+7.5°C), *vte2* mutants grow more slowly than wild-type plants, and accumulate significantly higher levels of anthocyanins. Accumulation of sucrose and other soluble sugars is much higher in *vte2* than in the wild-type after 60 h of low temperature treatment, although the photosynthesis and carbon fixation rates do not differ between the two genotypes. $^{14}CO_2$-labeling experiments demonstrate that low-temperature-treated *vte2* plants translocate significantly less ^{14}C-labeled photo-assimilates from leaves to roots. In *vte2* mutants, changes in cell structure occur exclusively within the phloem parenchyma "transfer" cells, which exhibit irregular thickenings of cell-wall callose deposits. This process leads to a callose boundary between the phloem parenchyma "transfer" cells and the SE/CC complex. Therefore, tocopherol prevents abnormal callose deposition in phloem parenchyma cell walls and thus maintains photoassimilate transport at low temperature. In *Arabidopsis* plants acclimated to low temperature (+5°C), up-regulation of SUTs SUC1 and SUC2 expression represents another mechanism for maintaining sucrose transport to sinks (mainly young leaves; Lundmark et al., 2006).

In dicots, when short sections of stems or petioles are progressively exposed to cool temperatures (thermal jackets), phloem transport stops transiently through the cooled region (Faucher et al., 1982). This stoppage is local and transient as phloem transport can start again even if tissues are maintained at low temperatures (Peuke et al., 2006). Furthermore, the cooling rate determines stoppage duration. In fact, the effect of cooling depends on experimental conditions and SE structure. Conversely, in monocots, i.e., species that lack structural P-proteins (Dinant et al., 2003), assimilate translocation is not (maize) or moderately (wheat) affected by progressive cooling down to +1°C applied to leaves (Faucher and Bonnemain, 1981; Faucher et al., 1982). In maize, limited phloem transport still occurs after a progressive cooling down to −3°C, and ^{14}C-assimilate allocation in the whole plant remains practically unchanged between +1°C and +40°C.

Further studies support the implication of sieve-element structural proteins in the cooling response (Lang and Minchin, 1986). The fact that lanthanum, a calcium channel blocker, can prevent the phloem response to cooling (Pickard and Minchin, 1990), strongly suggests that the response requires an increase in free Ca^{2+} in the SEs. This increase only occurs if the cooling process is rapid (White, 2009). Recent data indicate that forisomes (a class of P-proteins restricted to Fabacae), which control the immediate Ca^{2+}-dependent occlusion of sieve tubes induced by injuries (Furch et al., 2007; Will et al., 2007), are also involved in the rapid transport blocking by cooling (Thorpe et al., 2010).

EFFECTS OF CO_2

The rise in carbon dioxide (CO_2) in the atmosphere is suspected to be the main cause for global warming. Indeed, atmospheric CO_2 concentration increased from around 315 ppm in 1959 to an average 390 ppm nowadays, and predictions give a CO_2 concentration ranging between 540 and 970 ppm at the end of the century. This elevated atmospheric CO_2 has a direct effect on plant photosynthesis: at the present atmospheric CO_2 concentration, the photosynthetic reaction is limited by the low affinity of the active site of RuBisCO for CO_2 in C3 plants (Drake et al., 1997; Woodward, 2002). An increase in CO_2 should therefore enhance photosynthetic rates, carbohydrate production, and have a positive effect on phloem transport and growth. In fact, most of the plants grown in high CO_2 effectively exhibit increased carbohydrate accumulation in leaves with biomass partitioning between source and sink organs differing according to species (Makino and Mae, 1999). Root/shoot ratios increase in herbaceous plants grown in high CO_2 whereas they decrease in trees and remain stable in cereals (Farrar and Williams, 1991).

Classically, two high-CO_2 acclimation steps are described, i.e., short-term and long-term acclimation (Drake et al., 1997; Cheng et al., 1998). Biomass formation is initially enhanced in the first days of exposure but this boosted growth is not sustained for a long time. The short-term response to high CO_2 is an acclimation process whereby net photosynthesis, net carbon assimilation and growth are enhanced (Drake et al., 1997; Bae and Sicher, 2004). Excess sucrose is only partly exported to sink organs *via* the phloem and the resulting carbohydrate accumulation in leaves decreases the photosynthesis rate. A decreased RuBisCO content marks the beginning of long-term acclimation (Cheng et al., 1998; Bae and Sicher, 2004).

A comparison of sugar and starch contents in *Ricinus communis* leaves in plants grown at 350 or 700 ppm CO_2 showed that leaves accumulated starch at 700 ppm. Starch accumulated because more sucrose was synthesized than consumed or exported to sink organs *via* the phloem (Grimmer et al., 1999). Phloem carbon export was induced by high CO_2 at night. In the daytime, carbon export was independent of CO_2 conditions, whereas at night the export rate dropped by 50% under normal CO_2 but remained unchanged at high CO_2. In fact, *R. communis* plants seemed to display sink limitation in the daytime and source limitation at night, and source limitation tended to be suppressed at high CO_2 (Grimmer and Komor, 1999). In short, more sucrose was exported to sink organs at high CO_2. The role of increased sucrose transport as a result of increased CO_2 was also shown in *Arabidopsis thaliana* grown under 900 ppm CO_2: the plants exhibited enhanced root growth, with increased root length, root diameter and root number, and a modified branching pattern (Lee-Ho et al., 2007). The same root changes were noted on plants grown at 360 ppm CO_2 and supplied with exogenous sucrose, confirming the role of sucrose transported from the source.

In *Opuntia ficus-indica*, a CAM plant, no decrease in photosynthesis was detected in long-term exposure at high CO_2. After three months of CO_2 enrichment, cladodes displayed an increase in glucose, starch, and malate contents, but no change in their sucrose content was measured (Wang and Nobel, 1996). The sucrose content in mother cladodes was stable because it was exported to daughter cladodes by an enhanced phloem transport that resulted in a 73% increase in daughter cladode biomass after 3 months of exposure to high CO_2 (Wang and Nobel, 1996). However, data analysis from different plant species grown under high CO_2 shows that phloem loading cannot alone account for variations in shoot carbohydrate partitioning. Increased CO_2 can also have negative effects on plants. Due to an imbalance in nitrate assimilation caused by high CO_2, protein accumulation in wheat grains is low despite an unchanged yield (Pleijel and Uddling, 2012). However, this is not the case for woody plants, like pine trees, which preserve seed quality while increasing seed production (Way et al., 2010).

EFFECTS OF SOME SOIL AND AIR POLLUTANTS

Effects of cadmium

Some pollutants like heavy metals, cadmium (Cd), lead (Pb), or mercury (Hg) and the metalloid arsenic (As) are present in soils all over the world. Concerning Cd mobility within the phloem and its impact on sugar transport, little information is available, due to technical hurdles regarding phloem sampling (Mendoza-Cozatl et al., 2011). However, a low-affinity Cd transporter, *OsLCT1*, involved in phloem loading and accumulation in seeds, was identified in rice (Uraguchi et al., 2011), but no study related to sugar transport was carried out. Another experiment was led on willows used for Cd phyto-extraction. In those trees, sieve tubes and companion cells degenerated in proportion to increasing Cd concentrations supplied at the root level (Vollenweider et al., 2006). Long-distance transport was therefore impaired and a reduction in leaf size and biomass was observed (Cosio et al., 2006). Phloem degeneration was also noticed on maize grown on a Cd-contaminated soil (Cunha et al., 2008). Moreover, in willows, phloem regeneration was hindered due to reduced cambial activity (Vollenweider et al., 2006).

Effects of ozone

Tropospheric ozone is the most widespread air pollutant in many areas of the industrialized world and the overall ozone concentration has increased over the past decades as a result of anthropogenic activities (Krupa and Manning, 1988; Volz and Kley, 1988). Ozone mainly originates from photochemical reactions of volatile organic compounds with nitrogen oxides (NOx) released from anthropogenic and natural sources (Stockwell et al., 1997). Ozone causes a series of negative effects on vegetation such as decreased photosynthesis and growth, enhanced premature senescence and reduced crop yield (Pell and Dann, 1991; Sandermann, 1996). O_3 alters chloroplast membranes and decreases photosynthesis by reducing RuBisCO activity and concentration (Grams et al., 1999), which suggests that its main target is the photosynthetic apparatus (Kangasjärvi et al., 1994). Thus the availability of photo-assimilates for sink organs is decreased (Fiscus et al., 2005; Grantz et al., 2006).

Grantz and Yang (2000) tried to understand whether the impact of O_3 on reduced carbon allocation in plants was due to source limitation or inhibition of translocation. The results indicate that ozone has direct effects on phloem transport with consequent inhibition of translocation to roots, as previously suggested by Mortensen and Engvild (1995). These data are consistent with a primary effect on phloem loading and secondary feedback inhibition of photosynthesis (Grantz, 2003; Grantz et al., 2006).To gain information on this phenomenon, a meta-analysis of all the data available about the impacts of O_3 on root/shoot allocation and growth was performed by comparing RGR (relative growth rate of the whole plant) values and the allometric coefficient k ($k = RGR_{root}/RGR_{shoot}$). The results show that both parameters were significantly reduced by ozone but k showed more variability than RGR. This could indicate that root allocation is disturbed by O_3 but photo-assimilate availability is not. This result is consistent with an inhibition of photo-assimilate translocation rather than with a limitation of the photosynthetic process (Grantz et al., 2006).

Carbon translocation from source leaves of Pima cotton has been directly studied by monitoring ^{14}C-labeled photo-assimilates during a sudden exposure to O_3. The results indicate that the total labeled carbohydrates transported from source leaves were reduced by O_3 through effects on assimilation (up to 20%) and on export from leaves (up to 70%; Grantz, 2003; Grantz et al., 2006). Another study examined the translocation velocity of

^{14}C-labeled photo-assimilates in wheat : although the authors observed no significant difference in the translocation velocity in O_3-treated plants, the amount of carbon transported decreased (Mortensen and Engvild, 1995). In conclusion, O_3 could induce changes in carbon allocation or partitioning probably due to decreased amounts of transported carbon. All those works highlight that the major impact of ozone is the reduction of phloem loading probably linked to oxidant damage on plasmalemma or plamodesmata in mesophyll or phloem companion cells (Grantz and Farrar, 1999).

O_3 exposure could also have an indirect effect on plants by blocking phloem translocation *via* the induction of callose deposition on phloem sieve plates (Wilkinson et al., 2012). In potato, accumulation of callose in the phloem and starch in the parenchyma cells of source leaves was observed after ozone exposure. O_3 also decreased tuber weight, supporting the hypothesis of impaired phloem functioning (Asensi-Fabado et al., 2010). A better understanding of the effects of O_3 on carbohydrate translocation could come through the study of apoplastic and symplastic phloem-loading species to confirm the oxidant impact of O_3 on membranes (Grantz and Yang, 2000).

Effects of sulfur dioxide

Sulfur dioxide (SO_2) was a major air pollutant during the second half of the 20th century and was considered as the main cause of forest decline in central Europe (Kurczyńska et al., 1997). SO_2 is highly soluble in water: a concentration of 0.035 ppm SO_2 in the air can produce up to 35 ppm SO_2 in aqueous solution (Puckett et al., 1973). The pollutant can accumulate in leaf tissues and cause disturbances in physiological mechanisms such as photosynthesis, respiration, transpiration (Saxe and Murali, 1989). In bean leaves (Minchin and Gould, 1986) and castor bean cotyledons (Lorenc-Plucinska and Ziegler, 1987), photo-assimilate translocation is also affected due to inhibited phloem loading, independently of reduced photosynthesis. In broad bean, H^+/ATPase and SUTs have been identified as possible targets, both in leaf discs (Maurousset et al., 1992b) and plasma membrane vesicles (Maurousset et al., 1992a). More recently, an anatomical study showed that SO_2 led to a decreased number of phloem cells, but it was difficult to discriminate between general reduction of cambial activity and disturbances in the division of phloem mother cells (Kurczyńska et al., 1997).

EFFECTS OF BIOTIC STRESS

During their development, plants have to deal with the presence of microbes, like fungi, viruses, bacteria and also herbivores and sometimes other plants that act as parasites. Those organisms, whatever their type, develop at the expense of the sugars produced by plants (**Figure 3**), and may therefore affect phloem transport of sugars.

MUTUALISTIC AND PATHOGENIC MICROBES

Microorganisms can be separated into two groups according to their lifestyles, mutualistic (e.g., mycorrhiza) and pathogenic (biotrophic to necrotrophic; Newton et al., 2010). Even if their modes of colonization are different, microorganisms have evolved sophisticated strategies to avoid, suppress or bypass plant defenses and to divert nutrients, especially sugars, from the host plant for their growth (**Figure 3**). For example, mutualistic microorganisms and biotrophic pathogens can grow within the plant through complex interfaces, arbuscules and haustoria respectively, through which nutrients are transferred (Voegele and Mendgen, 2011; Smith and Smith, 2012). In contrast, necrotrophic pathogens secrete toxins and produce hydrolytic enzymes that kill host cells in order to feed on macerating tissues (van Kan, 2006).

Microbes can colonize either sink or source organs. Because both mutualistic and pathogenic interactions require sugar supply from host plants to the heterotrophic colonizing agent, they interfere with the source-sink balance. In most cases, it is largely assumed that colonized source organs are subjected to a source-to-sink transition that modifies the mechanism of sugar transport and partitioning at the whole plant level (Biemelt and Sonnewald, 2006). Among pathosystems, interactions between plants and biotrophic fungi are often cited as models for the study of pathogen-related modifications of carbon partitioning. For this reason, we particularly focus here on plant-biotrophic fungus interactions and only mention a few distinctive features of other pathosystems.

Biotrophic fungi, e.g., rust, powdery mildew, establish a long-term feeding relationship with the living cells of their hosts through the formation of haustoria. These are penetrating cell-wall structures that leave the protoplast of host cells intact and create an apoplastic interface through which released host nutrients are absorbed by the fungus (Mendgen and Hahn, 2002; Panstruga, 2003). Autoradiography studies using radiolabeled substances give indirect evidence for the central role of haustoria in sugar and amino-acid transfer from host to biotrophic pathogens (Hall and Williams, 2000; Voegele and Mendgen, 2011). In infected tissues, the fungal carbon demand creates an additional major sink that competes with host sinks. Competitiveness between plant and fungal sinks has been recently examined using a combined experimental-modeling approach. The authors showed that, in wheat infected by the leaf rust fungus *Puccinia triticina,* fungal sporulation had a competitive priority for photo-assimilates over grain filling (Bancal et al., 2012).

The nature of the host carbon energy source (hexoses or sucrose) transferred through the haustoria has been a matter of debate as to the origin of the apoplastic sugars taken up (**Figure 3**). Rather than sucrose, glucose appears to be the major carbohydrate imported from the host to the parasite, e.g., powdery mildew (Sutton et al., 1999; Hall and Williams, 2000). Apoplastic sucrose is most likely hydrolysed by cell-wall invertases (cwINV) which are key players in supplying carbohydrates to sink tissues (Roitsch and Gonzalez, 2004). Many studies report increased invertase activity in response to powdery mildew or other pathogens and in different plant species (Roitsch et al., 2003; Kocal et al., 2008; Siemens et al., 2011). This increase in cwINV activity in infected tissues constitutes a major driving force in sugar unloading. For most pathosystems, especially with obligate pathogens, it is difficult to discriminate between plant or pathogen contribution to the induced cwINV activity (**Figure 3**). While several plant cwINV genes, whose expression is correlated with increased cwINV activity, have been identified (Fotopoulos et al., 2003; Hayes et al., 2010), the pathogen's needs for carbohydrates are unlikely to be

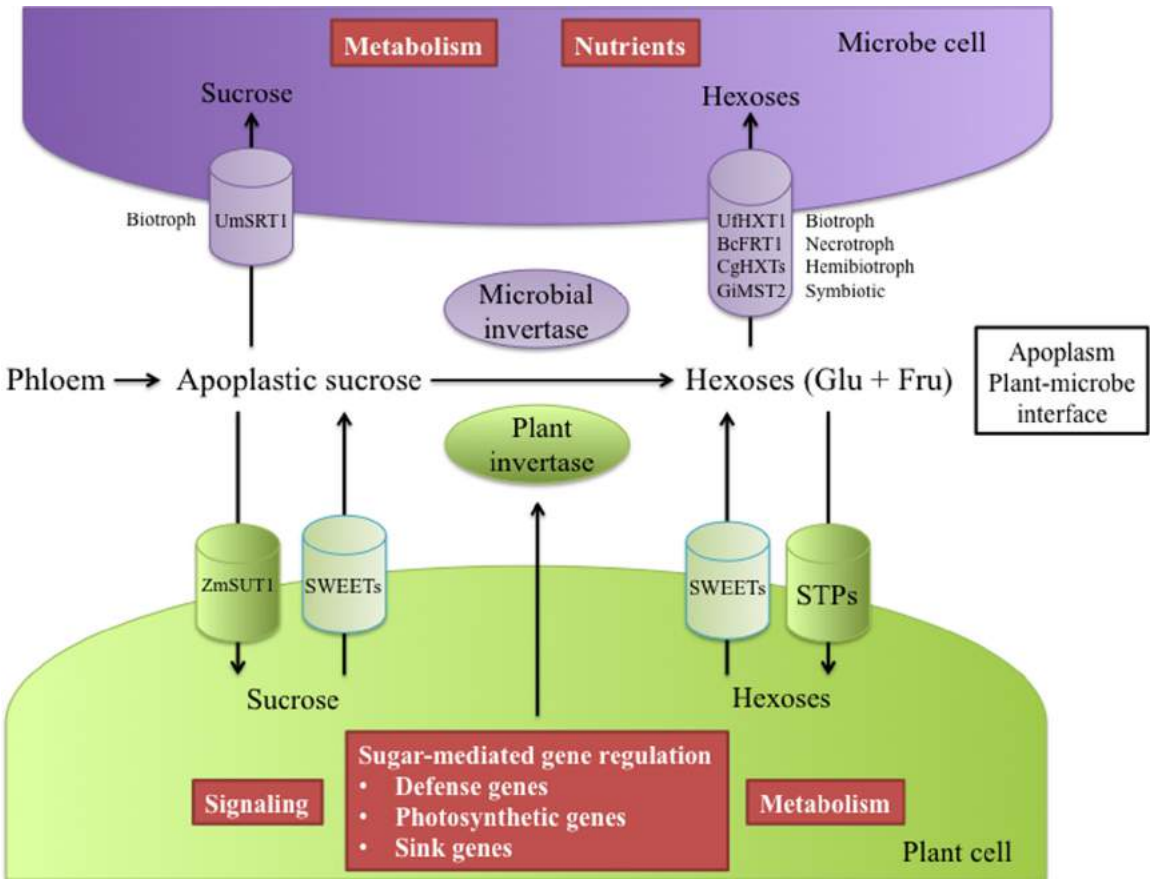


FIGURE 3 | Simplified representation of the key players involved in the competition for sugars at the plant/microbe interface. Depending on the pathosystem, plants and microbes present efficient machineries to take up or modify apoplastic sucrose. In biotrophic interactions, sucrose can be taken up by both host and fungus *via* sucrose transporters, e.g., maize ZmSUT1 and fungus *Ustilago maydis* UmSRT1, respectively. However, glucose is the main carbon source transferred from the host to the parasite and is essential for the feeding and metabolism of the parasite. Cell wall invertases from host and microbes contribute to the source of hexoses at the apoplast level. Hexose transporters allow pathogenic or mutualistic fungi to preferentially compete for glucose and/or fructose (i.e., UfHXT1, BcFRT1, CgHXTs, GiMST2). To gain access to apoplastic hexoses, plants possess a large repertoire of STPs that can support host demand. Multiple roles of hexoses in host cells have been described; among others, hexoses can be used as an energy source or as signaling molecules and regulators of pathogenesis-related, photosynthetic and sink gene expression. An indirect consequence of host sucrose and hexose acquisition is a possible starvation of microbes through a limited access to sugar at the interface. Host sugar uptake can be bypassed in some pathogenic interactions. Specific effectors (not represented in the diagram) released by some bacteria and probably fungi can manipulate host sugar effluxers (SWEETs) and further make sucrose and hexoses available for the pathogen

solely met by the enzymatic machinery of the host. So far few studies have reported fungal cwINV involved in such activities. The characterization of rust fungus *Uromyces fabae* Uf-INV1 suggests a fungal contribution to the higher cwINV activity in the biotrophic interaction with the host plant *Vicia faba* (Voegele et al., 2006). Regarding the necrotrophic parasite *Botrytis cinerea*, a contribution of the fungus to higher cwINV activity during infection of *Vitis vinifera* has been evidenced (Ruiz and Ruffner, 2002). Accordingly, both partners appear to activate their own invertases, providing strong support to the theory that infection by pathogens creates a new sink that competes with existing sinks (**Figure 3**). As a consequence, hexoses accumulate in the apoplast, and are taken up by co-regulated hexose transporters (Wright et al., 1995; Clark and Hall, 1998).

High extracellular sugar levels are somehow beneficial for both partners. On the plant side, sugars act as signaling molecules that can regulate many physiological processes, including defense mechanisms through the control of gene expression (Herbers et al., 1996; Roitsch et al., 2003; Rolland et al., 2006; **Figure 3**). For example, sugars induce pathogenesis-related genes and repress photosynthetic genes (Roitsch, 1999; Bolouri Moghaddam and Van den Ende, 2012). An indirect host defense strategy consists in starving the pathogen by limiting host sugar availability at the interface. Reports describe an increased capacity for glucose retrieval by host tissues after challenge by biotrophic as well as necrotrophic pathogens (Fotopoulos et al., 2003; Azevedo et al., 2006). Some plant monosaccharide transporters (MSTs) are involved in sugar resorption upon infection (Buttner, 2010; Slewinski, 2011). This is exemplified by the report of the up-regulation of the plant cell-wall invertase *At*β*FRUCT1* and the hexose transporter *AtSTP4* in *Erysiphe cichoracearum*-infected *Arabidopsis* leaves, which correlates with increased invertase activity and glucose resorption

(Truernit et al., 1996; Fotopoulos et al., 2003). This supports the functional coordination of STPs and cwINVs in the supply of sink tissues with hexoses (Sutton et al., 2007; **Figure 3**). Further molecular evidence of a competition for apoplastic glucose has been provided in infected broad bean by the identification and characterization of rust *Uromyces fabae* sugar transporter UfHXT1, which is localized in the haustorial plasma membrane. UfHXT1 preferentially transports glucose and fructose rather than sucrose to the fungus (Voegele et al., 2001). Substrate specificity and localization of such fungal MSTs facilitates plant hexose assimilation and thus participates in fungal sink strength (**Figure 3**).

Mutualistic or pathogenic microorganisms use a wide range of different strategies to gain access to carbohydrates from host plants, as highlighted in **Figure 3**. Mycorrhizal fungus *Glomus* high-affinity MST2 has been identified as a major player in sugar uptake with a critical function in the establishment of symbiosis (Helber et al., 2011; Doidy et al., 2012). Five hexose transporters (CgHXT1-5) have been characterized in the maize hemibiotrophic pathogen *Colletotrichum graminicola*, with large substrate specificities. CgHXT genes are differentially expressed during all infection phases, whether biotrophic or necrotrophic (Lingner et al., 2011). A high-affinity fructose transporter (BcFRT1) has been found in the necrotrophic fungus *B. cinerea*. Roles for fructose as a potent inducer of fungus germination have been suggested (Doehlemann et al., 2005).

Sucrose is the main photo-assimilate translocated from source to sinks. Upon release from the phloem in sink organs, sucrose is unloaded into the apoplast and is potentially exploitable by the fungus. In infected tissues, apoplastic sucrose uptake by fungal cells is believed to require the presence of fungal SUTs localized in the haustorial structure. The identification of SRT1, a highly specific SUT from the corn smut fungus *Ustilago maydis*, suggests that this fungus can efficiently use apoplastic sucrose (Talbot, 2010; Wahl et al., 2010). *Ustilago maydis* hyphae grow along the phloem of infected maize plants where they have access to sucrose released from the phloem. Such a transporter (i.e., SRT1) allows the pathogen to compete for sucrose with sink cell sucrose transporters (SUC/SUT) at the plant/fungus interface (Wahl et al., 2010; Doidy et al., 2012). During the maize/*Ustilago maydis* interaction, competition for extracellular sucrose between the SUTs ZmSUT1 and UmSRT1 has been described, and SRT1 turned out to be essential for fungal virulence (Wippel et al., 2010). Direct sucrose uptake is probably an integral part of the pathogen's strategy to prevent plant defense responses being triggered by hexoses (mostly glucose) released from sucrose hydrolysis (Ehness et al., 1997). The identification and characterization of other fungal SUTs is not yet achieved and constitutes an open field to better understand the competition for sugars that takes place between the plant and the fungus (Doidy et al., 2012).

Recently, key insights into how microbes acquire the ability to use the host sugar efflux machinery for nutrient supply have been gained thanks to the discovery of a new class of plasma membrane-localized sugar transporters (**Figure 3**). Plant SWEETs function as facilitators of sugar influx and efflux. SWEETs were at first identified as glucose uniporters but paralogues (i.e., AtSWEET11 and AtSWEET12) can also export sucrose (Chen et al., 2010, 2012). Several SWEET genes are specifically regulated upon pathogen attack. Different patterns of expression have been reported after challenge by either bacterial (*Pseudomonas syringae* pv tomato strains) or fungal (the necrotroph *B. cinerea* or the biotroph *Golovinomyces cichoracearum*) pathogens. Authors also described a model in which OsSWEET11 and 14 expression is specifically targeted by *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* effectors to increase sugar efflux into the apoplast (Chen et al., 2010). Both specific bacterial effectors and OsSWEET expression are required for bacterial virulence, suggesting that pathogens probably take advantage of the SWEET-induced sugar efflux mechanism to gain access to sugars in cells around the infection site in order to support their own growth. The identification of this non-conventional family of sugar transporters highlights additional complexity and opens new perspectives onto our knowledge about sugar partitioning during plant-pathogen interactions.

VIRUSES

Among plant pathogens, viruses are unique because they remain exclusively in the symplast of their host (Schoelz et al., 2011). This mode of colonization requires viruses to move from infection site to systemic tissues *via* the symplastic continuity created by cell-to-cell connections (plasmodesmata, PD) and the phloem long-distance translocation system (Lucas and Wolf, 1999; Gosalvez-Bernal et al., 2008). Viral infection involves virus-encoded movement proteins (MPs) which alter the exclusion size of PDs, suggesting that viruses can exploit the PD-mediated cell-to-cell trafficking of photo-assimilates. Carbohydrate allocation and signaling can be directly affected during virus infection. The mechanisms of these metabolic changes caused by viral infection have been assessed using transgenic expression of viral MPs; Olesinski et al., 1996; Hofius et al., 2001). Plants expressing viral MPs exhibited dilated PDs associated with significant physiological alterations such as changes in host primary metabolism, accumulation of starch and soluble sugars, decreased photosynthesis and increased respiration (Tecsi et al., 1996; Balachandran et al., 1997; Herbers et al., 2000). These changes strongly suggest that virus-infected leaves function as sinks. However, the effects of viral MPs on carbohydrate allocation can vary according to the way viruses exploit the host transport system. In some cases, it is not related to the PD size exclusion limit, but may rather be due to induced callose deposition at the PD level which consequently blocks symplastic sucrose transport (Biemelt and Sonnewald, 2006).

Virus-induced reallocation of host resources and its mechanisms seem to be virus-specific and result from interactions between specific viral and host components (Culver and Padmanabhan, 2007). For example, in Cucumber Mosaic Virus (CMV)-infected melon, modifications in phloem sap sugar composition, such as an increase in sucrose content, have been reported (Shalitin and Wolf, 2000). While cucurbits are known to be symplastic loaders, the identification of a SUT, CmSUT1, which catalyzes the active apoplastic loading of sucrose into the phloem of CMV-infected melon, provides evidence for a possible symplast/apoplast switch in sucrose loading (Gil et al., 2011).

APHIDS

Aphids, which are the vectors of numerous plant viruses (Brault et al., 2010; Dedryver et al., 2010), are "experts" at probing the

phloem and at manipulating the plant tissues to their own advantage (Miles, 1999; Will et al., 2007). Using fine stylets, they drill into tissues intercellularly, making tiny punctures, and wait a few seconds to analyze the physicochemical properties of the microenvironment around the stylet tip (Tjallingii, 2006). Experiments using artificial systems indicate that the ability of aphids to find sieve tubes is linked to their ability to sense high sucrose concentrations and pH (Hewer et al., 2010).

Aphids constitute an additional sink that can modify assimilate allocation at the whole plant level, especially at the expense of the stem apex (Hawkins et al., 1987; Girousse et al., 2003). Data from various controlled infestations of alfalfa stems by pea aphids indicate that the reduction of the stem elongation rate (SER) is only partly explained by assimilate withdrawal and suggests that extra signals associated to pea aphid probing and feeding are involved in SER reduction (Girousse et al., 2003). In addition, dramatic changes in carbon and nitrogen allocation were observed under growth-chamber conditions using severe and short-time aphid infestations. They mainly consist in nitrogen mobilization from some parts of the stem, especially the apex, to the middle part of the zone of aphid infestation (Girousse et al., 2005). Complementary approaches show that aphid colonization induces changes in the expression of genes associated with sugar and nitrogen metabolism (Voelckel et al., 2004; Divol et al., 2005; de Vos et al., 2007) and causes an increase in the mRNA levels of a MST in infested tissues (Moran and Thompson, 2001). The systemic impact of aphid infestation also concerns source tissues (Miles, 1989). For instance, a single *Aphis fabae* on one side of a leaf grows faster if an *Aphis fabae* colony is feeding on the other side (Dixon and Wratten, 1971), suggesting the importance of aphid-related sugar accumulation. Aphid (*Myzus persicae*) infestation of *Arabidopsis* leaves leads to a dramatic increase in sucrose and starch contents in source tissues despite pest feeding (Singh et al., 2011). These changes suggest a stoppage of sugar export to the plant sinks. Infestation also induces an increase in trehalose levels. This change in trehalose metabolism promotes re-allocation of carbon into starch at the expense of sucrose, the primary energy source of the pest, and plant defenses *via* the induction of the PHYTOALEXIN-DEFICIENT4 gene (Singh et al., 2011). It is noteworthy that the trehalose found in the aphid hemolymph at millimolar concentrations as an energy source is also a plant signal that contributes to controlling infestation by phloem-sucking pests such as *M. persicae* at micromolar concentrations.

PARASITIC PLANTS

Many plants like *Phelipanche* (Orobanche), *Cuscuta*, and *Striga* are able to establish parasitic relationships with a large number of crop plants, and this results in important productivity losses. Fighting against these parasitic plants is particularly complex because many treatments are also active on the host plants. Parasitic plants can be classified into two categories: hemiparasites are green, contain chlorophyll and can therefore have a photosynthetic activity. They take nutrients from the xylem sap in the wood of their host, can reduce nitrate but also use organic nitrogen found in the sap of their host. Holoparasitic plants are not photosynthetic and are thus heterotrophic for carbon and depend on their host for sugars, water, and minerals (Abbes et al., 2009a). Parasitic plants establish their connections with the host at the level of the sap-conducting tissues. Several years ago, sugar trafficking between host plant and parasite was clearly demonstrated using radiolabelled molecules. Although it is altogether agreed that the transfer of water and minerals between host and parasite xylem vessels does not require a membrane, the connections between host and parasite phloem vessels are more disputed. Initial histological studies showed that plasmodesmata were absent (Behnke et al., 1990), suggesting an apoplastic transfer of sugars and other molecules (Wolswinkel, 1974; Jeschke et al., 1994). However, using a GFP specifically expressed in companion cells (Haupt et al., 2001) or a fusion GFP-TMV (Tobacco Mosaic Virus) MP (Birschwilks et al., 2006), secondarily formed interspecific plasmodesmata were shown to be open and functional. In addition, ^{3}H-sucrose, 5,6-carboxyfluorescein and viruses were translocated from the host to the parasite, giving unequivocal evidence for a symplastic transfer of solutes (Hibberd and Jeschke, 2001; Birschwilks et al., 2006).

Different enzyme activities are involved in the parasitic mechanism. *PrSUS1*, a sucrose synthase isolated from the parasitic plant *Phelipanche ramosa*, exhibits a spatial and temporal regulation during the infection process (Péron et al., 2012). Expression is regulated by auxin from the host plant. The authors suggest that PrSUS1 is involved in cellulose synthesis during the secondary thickening of differentiating xylem elements in the tubercles (i.e., globular structures developed after parasite seed germination that carry numerous adventitious roots and whose apical bud produces a subterranean shoot) and in the adventitious roots of *P. ramosa*. Cellulose synthesis is probably crucial for the cell-wall integrity of both xylem and phloem tissues. Another enzyme activity acting as the driving force in many source/sink relationships is the invertase activity involved in the cleavage of sucrose into glucose and fructose. Transcripts of *PrSai1* that encodes a soluble acid invertase and the corresponding enzyme activity were high in growing organs during parasite fixation. In addition, germinated seeds displayed enhanced cell-wall invertase activity (PrCWI), suggesting its contribution to the sink strength of infected roots during the subsequent step of root penetration (Draie et al., 2011).

Orobanche also accumulates high amounts of polyols like mannitol, and this decreases the osmotic potential below that of the host plant (Harloff and Wegmann, 1993; Abbes et al., 2009b). This mechanism is essential for increasing the parasite's sink strength. A mannose-6-phosphate reductase (M6PR), the key enzyme of the mannitol biosynthesis pathway, was identified and cloned from *Orobanche* (Delavault et al., 2002). Expression of that gene was induced at the attachment stage and sucrose from the phloem host was rapidly converted into mannitol. Consequences are increases in host nutrient uptake and in parasite protein synthesis and vegetative growth. Accumulation of mannitol in *Orobanche* tissues is strongly enhanced following the haustorial connection. Targeting the corresponding enzyme activity could be a major strategy for fighting against these parasites (Delavault et al., 2002).

All these relationships in terms of carbon and nitrogen exchanges are very important to establish susceptibility or tolerance to *Orobanche*. Phloem exudates of a *faba* bean tolerant line were highly deficient in nitrogen compared to those of the susceptible line (Abbes et al., 2009a). In addition, after haustorial development and phloem connections were established

with the tolerant line, soluble invertase activity was very low. Taken together, these results indicate that the reduced growth of *Orobanche* on the tolerant *faba* bean line resulted from a reduced capacity to use the host-derived carbohydrates and lower sink strength.

Using radiolabelled valine and asparagine, amino acids were also shown to be transported from the host to *Cuscuta europaea* (Wolswinkel et al., 1984). More recently, Aly et al. (2011) demonstrated that several other molecules such as proteins and macromolecules could be translocated to *Phelipanche aegyptiaca* through phloem connections. These results suggest that targeting the delivery of proteins and/or nucleic acids could be very interesting in the development of parasite-resistant strategies. The use of herbicides could also be a strategy to get rid of parasitic plants. Glyphosate, a systemic herbicide, is accumulated in the parasite due to its strong sink activity, without significant damage to the host (Nadler-Hassar et al., 2004). Glyphosate usually inhibits 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), a key enzyme in the shikimate pathway. However, in parasitic plants, glyphosate also blocks the transfer of sugars and macromolecules to the parasite. Therefore its toxic effect is more due to the inhibition of phloem transport to the parasite than to the inhibition of aromatic amino acid synthesis.

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

Plant life cycle is characterized by source-sink transitions due to changes in sink strength or in the number of sink organs competing for a common pool of sugars (Roitsch, 1999). The phloem plays a major role in connecting source and sink organs and supplying sugars, mainly in the form of sucrose, to sinks. As demonstrated in this review, phloem transport of sugar is tightly regulated and is very sensitive to alterations in a plant's environment resulting in changes in carbon allocation to sinks. However, there are few reports on the effects of biotic and abiotic factors on phloem transport and dealing with all components from source to sink.

At the source level, sucrose availability for export is dependent on photosynthetic activity. Interestingly, in many cases of adverse environmental conditions when photosynthetic carbon fixation was reduced, photosynthesis was not the primary target of the stress. Phloem transport of sugars was also affected, earlier than photosynthesis, leading to an increase of sucrose concentration in leaves and a feed-back inhibition of photosynthesis and sucrose export (Ainsworth and Bush, 2011).

Recent works have pointed out sucrose concentrations in the cytosol of mesophyll cells as a key factor for the regulation of sucrose export. The characterization of tonoplastic hexose and SUTs provides new support for the role of transient sugar storage in the vacuole to control the cytoplasmic sucrose concentration (Wingenter et al., 2010).

One interesting conclusion is that the structure of phloem cells can be altered by several abiotic stresses (light, SO_2, O_3). As the ultra-structure and integrity of such cells are poorly investigated, these alterations may be more frequent than reported. Additional evidence for the plasticity of phloem companion or parenchyma cell-wall comes from several studies on the effect of light (Amiard et al., 2005, 2007). Structural changes in the cell-wall and invaginations of the plasma membrane can increase fluxes of assimilates in the case of high light. Conversely, there are several reports of callose synthesis at different levels in the SEs, in response to external biotic or abiotic stresses. This physical constraint leads also to impaired transport of sucrose to sinks.

At the sink level, environmental cues can alter priority between different sinks: for example, increase in the root to shoot ratio is induced by mineral deficiency and both sucrose and ions are signals between root and shoot. Stress-related increase in sucrose or polyol delivery to sinks (e.g; roots but also seeds) is important for sink growth, cell turgor, and water potential maintenance.

Little is known about the regulation of sugar transporters during abiotic stress at the molecular level despite their important role in the allocation of sugars in plants. This knowledge gap is due to the fact that many studies were conducted at a physiological level. Understanding the changes in transporter expression during stress is therefore a major challenge in order to predict and act on plant responses. Interesting clues on possible regulation by environmental and biotic factors were obtained by searching for putative regulatory elements in the promoters of sugar transporters in grape and *Arabidopsis* (Afoufa-Bastien et al., 2010). Recent data on biotic stress have unraveled the pathways of sugar exchange, and the corresponding molecular players have been identified (Doidy et al., 2012). Unexpectedly, sucrose can be absorbed by both host and pathogen, while it is commonly admitted that glucose resulting from the invertase activity is the main host sugar taken up by pathogens. These new findings highlight the complexity of sugar exchanges at the host/pathogen interface.

In order to understand further the distribution of carbon between sinks, future studies need to concentrate on the measurement of the phloem sap flux in relation with the expression of sugar transporters, taking advantage of new imaging techniques (Knoblauch and Oparka, 2012) combined with traditional $^{14}CO_2$ labeling. Key information should be obtained from metabolomic approaches of phloem sap composition (Fiehn, 2003). As pointed out earlier in this review and by Ainsworth and Bush (2011), there are interesting possibilities for increasing source activity and sink demand by manipulating the expression of selected transporter genes (Schroeder et al., 2013).

Concerning the acclimation of plants to some major environmental adverse conditions (drought and salt stress, pathogens), several sugars transported on long-distances such as polyols can also be targeted for improving stress resistance (Merchant and Richter, 2011). Nevertheless, the role of other sugars such as trehalose as signaling molecules will have to be taken into account. There are still considerable efforts to be made before getting a clear understanding of the role of phloem transport on source-sink relationships under stress conditions, but any progress should have beneficial effects on crop production.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Sylvie Clercy-Morel for invaluable help in editing the manuscript and the corresponding literature. PL and MD are funded by a grant from the French ministry of research and higher education and Jonathan Parrilla by a grant from the Région Poitou-Charentes.

REFERENCES

Abbes, Z., Kharrat, M., Delavault, P., Chaïbi, W., and Simier, P. (2009a). Nitrogen and carbon relationships between the parasitic weed *Orobanche foetida* and susceptible and tolerant faba bean lines. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 153–159.

Abbes, Z., Kharrat, M., Delavault, P., Chaïbi, W., and Simier, P. (2009b). Osmoregulation and nutritional relationships between *Orobanche foetida* and faba bean. *Plant Signal. Behav.* 4, 336–338.

Afoufa-Bastien, D., Medici, A., Jeauffre, J., Coutos-Thevenot, P., Lemoine, R., Atanassova, R., et al. (2010). The Vitis vinifera sugar transporter gene family: phylogenetic overview and macroarray expression profiling. *BMC Plant Biol.* 10:245. doi: 10.1186/1471-2229-10-245

Agasse, A., Vignault, C., Kappel, C., Conde, C., Gerós, H., and Delrot, S. (2009). "Sugar transport and sugar sensing in grape," in *Grapevine Molecular Physiology and Biotechnology*, ed. K.A. Roubelakis-Angelakis (Netherland: Springer), 105–139.

Ainsworth, E. A., and Bush, D. R. (2011). Carbohydrate export from the leaf: a highly regulated process and target to enhance photosynthesis and productivity. *Plant Physiol.* 155, 64–69. doi: 10.1104/pp.110.167684

Aly, R., Hamamouch, N., Abu-Nassar, J., Wolf, S., Joel, D., Eizenberg, H., et al. (2011). Movement of protein and macromolecules between host plants and the parasitic weed *Phelipanche aegyptiaca* Pers. *Plant Cell Rep.* 30, 2233–2241. doi: 10.1007/s00299-011-1128-5

Amiard, V., Demmig-Adams, B., Mueh, K. E., Turgeon, R., Combs, A. F., and Adams, W. W. III. (2007). Role of light and jasmonic acid signaling in regulating foliar phloem cell wall ingrowth development. *New Phytol.* 173, 722–731. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01954.x

Amiard, V., Mueh, K. E., Demmig-Adams, B., Ebbert, V., Turgeon, R., and Adams, W. W. III. (2005). Anatomical and photosynthetic acclimation to the light environment in species with differing mechanisms of phloem loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 12968–12973. doi: 10.1073/pnas.0503784102

Antal, T., Mattila, H., Hakala-Yatkin, M., Tyystjärvi, T., and Tyystjärvi, E. (2010). Acclimation of photosynthesis to nitrogen deficiency in *Phaseolus vulgaris*. *Planta* 232, 887–898. doi: 10.1007/s00425-010-1227-5

Asensi-Fabado, A., Garcia-Breijo, F. J., and Reig-Arminana, J. (2010). Ozone-induced reductions in belowground biomass: an anatomical approach in potato. *Plant Cell Environ.* 33, 1070–1083. doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02128.x

Azevedo, H., Conde, C., Geros, H., and Tavares, R. M. (2006). The non-host pathogen *Botrytis cinerea* enhances glucose transport in *Pinus pinaster* suspension-cultured cells. *Plant Cell Physiol.* 47, 290–298. doi: 10.1093/pcp/pci248

Bachmann, M., and Keller, F. (1995). Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L. (inter- and intracellular compartmentation). *Plant Physiol.* 109, 991–998. doi: 10.1104/pp.109.3.991

Bae, H., and Sicher, R. (2004). Changes of soluble protein expression and leaf metabolite levels in *Arabidopsis thaliana* grown in elevated atmospheric carbon dioxide. *Field Crop. Res.* 90, 61–73. doi: 10.1016/j.fcr.2004.07.005

Balachandran, S., Hurry, V. M., Kelley, S. E., Osmond, C. B., Robinson, S. A., Rohozinski, J., et al. (1997). Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis. *Physiol. Plant.* 100, 203–213. doi: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb04776.x

Bancal, M.-O., Hansart, A., Sache, I., and Bancal, P. (2012). Modelling fungal sink competitiveness with grains for assimilates in wheat infected by a biotrophic pathogen. *Ann. Bot.* 110, 113–123. doi: 10.1093/aob/mcs094

Behnke, H. D., Sjolund, R. D., and Dörr, I. (1990). "Sieve elements in haustoria of parasitic angiosperms," in *Sieve Elements*. Berlin: Springer, 239–256.

Berthomieu, P., Conejero, G., Nublat, A., Brackenbury, W. J., Lambert, C., Savio, C., et al. (2003). Functional analysis of AtHKT1 in *Arabidopsis* shows that Na(+) recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBO J.* 22, 2004–2014. doi: 10.1093/emboj/cdg207

Biemelt, S., and Sonnewald, U. (2006). Plant-microbe interactions to probe regulation of plant carbon metabolism. *J. Plant Physiol.* 163, 307–318. doi: 10.1016/j.jplph.2005.10.011

Birschwilks, M., Haupt, S., Hofius, D., and Neumann, S. (2006). Transfer of phloem-mobile substances from the host plants to the holoparasite Cuscuta sp. *J. Exp. Bot.* 57, 911–921. doi: 10.1093/jxb/erj076

Bolouri Moghaddam, M. R., and Van den Ende, W. (2012). Sugars and plant innate immunity. *J. Exp. Bot.* 63, 3989–3998. doi: 10.1093/jxb/ers129

Brault, V., Uzest, M., Monsion, B., Jacquot, E., and Blanc, S. (2010). Aphids as transport devices for plant viruses. *CR Biol.* 333, 524–538. doi: 10.1016/j.crvi.2010.04.001

Burke, J. J. (2007). Evaluation of source leaf responses to water-deficit stresses in cotton using a novel stress bioassay. *Plant Physiol.* 143, 108–121. doi: 10.1104/pp.106.087783

Buttner, M. (2010). The *Arabidopsis* sugar transporter (AtSTP) family: an update. *Plant Biol.* 12(Suppl. 1), 35–41. doi: 10.1111/j.1438-8677.2010.00383.x

Cakmak, I., and Yazici, M. (2010). Magnesium: a forgotten element in crop production. *Better Crops* 94, 23–25.

Carpaneto, A., Geiger, D., Bamberg, E., Sauer, N., Fromm, J., and Hedrich, R. (2005). Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier ZmSUT1 mediates sucrose efflux under the control of the sucrose gradient and the proton motive force. *J. Biol. Chem.* 280, 21437–21443. doi: 10.1074/jbc.M501785200

Chandlee, J. M. (2001). Current molecular understanding of the genetically programmed process of leaf senescence. *Physiol. Plant.* 113, 1–8. doi: 10.1034/j.1399-3054.2001.1130101.x

Chen, L. Q., Hou, B. H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M. L., Qu, X. Q., et al. (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* 468, 527–532. doi: 10.1038/nature09606

Chen, L. Q., Qu, X. Q., Hou, B. H., Sosso, D., Osorio, S., Fernie, A. R., et al. (2012). Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* 335, 207–211. doi: 10.1126/science.1213351

Cheng, S.-H., Moore, B. D., and Seemann, J. R. (1998). Effects of short- and long-term elevated CO2 on the expression of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes and carbohydrate accumulation in leaves of *Arabidopsis thaliana* (L.) *heynh. Plant Physiol.* 116, 715–723. doi: 10.1104/pp.116.2.715

Chiou, T.-J., and Bush, D. R. (1998). Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 4784–4788. doi: 10.1073/pnas.95.8.4784

Clark, J. I. M., and Hall, J. L. (1998). Solute transport into healthy and powdery mildew-infected leaves of pea and uptake by powdery mildew mycelium. *New Phytol.* 140, 261–269. doi: 10.1046/j.1469-8137.1998.00263.x

Conde, A., Silva, P., Agasse, A., Conde, C., and Geros, H. (2011). Mannitol transport and mannitol dehydrogenase activities are coordinated in *Olea europaea* under salt and osmotic stresses. *Plant Cell Physiol.* 52, 1766–1775. doi: 10.1093/pcp/pcr121

Cosio, C., Vollenweider, P., and Keller, C. (2006). Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.). *Environ. Exp. Bot.* 58, 64–74. doi: 10.1016/j.envexpbot.2005.06.017

Courtois, B., Mclaren, G., Sinha, P. K., Prasad, K., Yadav, R., and Shen, L. (2000). Mapping QTLs associated with drought avoidance in upland rice. *Mol. Breed.* 6, 55–66. doi: 10.1023/A:1009652326121

Cowan, A. K., Freeman, M., Bjorkman, P. O., Nicander, B., Sitbon, F., and Tillberg, E. (2005). Effects of senescence-induced alteration in cytokinin metabolism on source-sink relationships and ontogenic and stress-induced transitions in tobacco. *Planta* 221, 801–814. doi: 10.1007/s00425-005-1489-5

Cramer, G. R., Ergul, A., Grimplet, J., Tillett, R. L., Tattersall, E. A., Bohlman, M. C., et al. (2007). Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Funct. Integr. Genomics* 7, 111–134. doi: 10.1007/s10142-006-0039-y

Cuellar-Ortiz, S. M., De La Paz Arrieta-Montiel, M., Acosta-Gallegos, J., and Covarrubias, A. A. (2008). Relationship between carbohydrate partitioning and drought resistance in common bean. *Plant Cell Environ.* 31, 1399–1409. doi: 10.1111/j.1365-3040.2008.01853.x

Culver, J. N., and Padmanabhan, M. S. (2007). Virus-induced disease: altering host physiology one interaction at a time. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 221–243. doi: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094422

Cunha, K. P., Do Nascimento, C. W., Pimentel, R. M., and Ferreira, C. P. (2008). Cellular localization of cadmium and structural changes in maize plants grown on a cadmium contaminated soil with and without liming. *J. Hazard. Mater.* 160, 228–234. doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.02.118

Dai, N., Schaffer, A., Petreikov, M., Shahak, Y., Giller, Y., Ratner, K., et al. (1999). Overexpression of *Arabidopsis* hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *Plant Cell* 11, 1253–1266. doi: 10.1105/tpc.11.7.1253

Davenport, R. J., Munoz-Mayor, A., Jha, D., Essah, P. A., Rus, A., and Tester, M. (2007). The Na(+ transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na(+ from the xylem in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 30, 497–507. doi: 10.1111/j.1365-3040.2007.01637.x

Davidson, A., Keller, F., and Turgeon, R. (2011). Phloem loading, plant growth form, and climate. *Protoplasma* 248, 153–163. doi: 10.1007/s00709-010-0240-7

de Vos, M., Kim, J. H., and Jander, G. (2007). Biochemistry and molecular biology of *Arabidopsis*–aphid interactions. *Bioessays* 29, 871–883. doi: 10.1002/bies.20624

Dedryver, C. A., Le Ralec, A., and Fabre, F. (2010). The conflicting relationships between aphids and men: a review of aphid damage and control strategies. *CR Biol.* 333, 539–553. doi: 10.1016/j.crvi.2010.03.009

Deeken, R., Geiger, D., Fromm, J., Koroleva, O., Ache, P., Langenfeld-Heyser, R., et al. (2002). Loss of the AKT2/3 potassium channel affects sugar loading into the phloem of *Arabidopsis*. *Planta* 216, 334–344. doi: 10.1007/s00425-002-0895-1

Delavault, P., Simier, P., Thoiron, S., Véronési, C., Fer, A., and Thalouarn, P. (2002). Isolation of mannose 6-phosphate reductase cDNA, changes in enzyme activity and mannitol content in broomrape (*Orobanche ramosa*) parasitic on tomato roots. *Physiol. Plant.* 115, 48–55. doi: 10.1034/j.1399-3054.2002.1150105.x

Dinant, S., Clark, A. M., Zhu, Y., Vilaine, F., Palauqui, J. C., Kusiak, C., et al. (2003). Diversity of the superfamily of phloem lectins (phloem protein 2) in angiosperms. *Plant Physiol.* 131, 114–128. doi: 10.1104/pp.013086

Ding, Y. (2011). Low magnesium with high potassium supply changes sugar partitioning and root growth pattern prior to visible magnesium deficiency in leaves of rice *Oryza sativa* L. *Am. J. Plant Sci.* 02, 601–608. doi: 10.4236/ajps.2011.24071

Divol, F., Vilaine, F., Thibivilliers, S., Amselem, J., Palauqui, J. C., Kusiak, C., et al. (2005). Systemic response to aphid infestation by *Myzus persicae* in the phloem of *Apium graveolens*. *Plant Mol. Biol.* 57, 517–540. doi: 10.1007/s11103-005-0338-z

Dixon, A. F. G., and Wratten, S. D. (1971). Laboratory studies on aggregation, size and fecundity in the black bean aphid, *Aphis fabae* Scop. *Bull. Entomol. Res.* 61, 97–111. doi: 10.1017/S0007485300057485

Doehlemann, G., Molitor, F., and Hahn, M. (2005). Molecular and functional characterization of a fructose specific transporter from the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Fungal Genet. Biol.* 42, 601–610. doi: 10.1016/j.fgb.2005.03.001

Doidy, J., Grace, E., Kuhn, C., Simon-Plas, F., Casieri, L., and Wipf, D. (2012). Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. *Trends Plant Sci.* 17, 413–422. doi: 10.1016/j.tplants.2012.03.009

Draie, R., Péron, T., Pouvreau, J.-B., Véronési, C., Jégou, S., Delavault, P., et al. (2011). Invertases involved in the development of the parasitic plant *Phelipanche ramosa*: characterization of the dominant soluble acid isoform, PrSAI1. *Mol. Plant Pathol.* 12, 638–652. doi: 10.1111/j.1364-3703.2010.00702.x

Drake, B. G., Gonzàlez-Meler, M. A., and Long, S. P. (1997). More efficient plants: a consequence of rising atmospheric CO2? *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 48, 609–639. doi: 10.1146/annurev.arplant.48.1.609

Ehness, R., Ecker, M., Godt, D. E., and Roitsch, T. (1997). Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *Plant Cell* 9, 1825–1841. doi: 10.1105/tpc.9.10.1825

Eom, J. S., Cho, J. I., Reinders, A., Lee, S. W., Yoo, Y., Tuan, P. Q., et al. (2011). Impaired function of the tonoplast-localized sucrose transporter in rice, OsSUT2, limits the transport of vacuolar reserve sucrose and affects plant growth. *Plant Physiol.* 157, 109–119. doi: 10.1104/pp.111.176982

Farrar, J. F., and Williams, M. L. (1991). The effects of increased atmospheric carbon dioxide and temperature on carbon partitioning, source-sink relations and respiration. *Plant Cell Environ.* 14, 819–830. doi: 10.1111/j.1365-3040.1991.tb01445.x

Faucher, M., and Bonnemain, J. L. (1981). Action des barrières thermiques sur la circulation libérienne chez le Maïs (*Zea mays* L.). *Physiol. Veg.* 19, 379–390.

Faucher, M., Bonnemain, J. L., and Doffin, M. (1982). Effets des refroidissements localisés sur la circulation libérienne chez quelques espèces avec ou sans protéines-P et influence du mode de refroidissement. *Physiol. Veg.* 20, 395–405.

Fiehn, O. (2003). Metabolic networks of Cucurbita maxima phloem. *Phytochemistry* 62, 875–886. doi: 10.1016/S0031-9422(02)00715-X

Fiscus, E. L., Booker, F. L., and Burkey, K. O. (2005). Crop responses to ozone: uptake, modes of action, carbon assimilation and partitioning. *Plant Cell Environ.* 28, 997–1011. doi: 10.1111/j.1365-3040.2005.01349.x

Fisher, D. B., and Oparka, K. J. (1996). Post-phloem transport: principles and problems. *J. Exp. Bot.* 47, 1141–1154. doi: 10.1093/jxb/47.Special_Issue.1141

Fotopoulos, V., Gilbert, M. J., Pittman, J. K., Marvier, A. C., Buchanan, A. J., Sauer, N., et al. (2003). The monosaccharide transporter gene, AtSTP4, and the cell-wall invertase, Atβfruct1, are induced in *Arabidopsis* during infection with the fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiol.* 132, 821–829. doi: 10.1104/pp.103.021428

Frost, C. J., Nyamdari, B., Tsai, C.-J., and Harding, S. A. (2012). The tonoplast-localized sucrose transporter in Populus (PtaSUT4) regulates whole-plant water relations, responses to water stress, and photosynthesis. *PLoS ONE* 7:44467. doi: 10.1371/journal.pone.0044467

Furch, A. C. U., Hafke, J. B., Schulz, A., and Van Bel, A. J. E. (2007). Ca2(+-mediated remote control of reversible sieve tube occlusion in Vicia faba. *J. Exp. Bot.* 58, 2827–2838. doi: 10.1093/jxb/erm143

Gamalei, Y. V. (1991). Phloem loading and its development related to plant evolution from trees to herbs. *Trees* 5, 50–64. doi: 10.1007/BF00225335

Gamalei, Y. V., Van Bel, A. J. E., Pakhomova, M. V., and Sjutkina, A. V. (1994). Effects of temperature on the conformation of the endoplasmic reticulum and on starch accumulation in leaves with the symplasmic minor-vein configuration. *Planta* 194, 443–453. doi: 10.1007/BF00714455

Gao, Z., Maurousset, L., Lemoine, R., Yoo, S. D., Van Nocker, S., and Loescher, W. (2003). Cloning, expression, and characterization of sorbitol transporters from developing sour cherry fruit and leaf sink tissues. *Plant Physiol.* 131, 1566–1575. doi: 10.1104/pp.102.016725

Geigenberger, P., Reimholz, R., Geiger, M., Merlo, L., Canale, V., and Stitt, M. (1997). Regulation of sucrose and starch metabolism in potato tubers in response to short-term water deficit. *Planta* 201, 502–518. doi: 10.1007/s004250050095

Gifford, R. M., Thorne, J. H., Hitz, W. D., and Giaquinta, R. T. (1984). Crop productivity and photoassimilate partitioning. *Science* 225, 801–808. doi: 10.1126/science.225.4664.801

Gil, L., Yaron, I., Shalitin, D., Sauer, N., Turgeon, R., and Wolf, S. (2011). Sucrose transporter plays a role in phloem loading in CMV-infected melon plants that are defined as symplastic loaders. *Plant J.* 66, 366–374. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04498.x

Girousse, C., Bournoville, R., and Bonnemain, J. L. (1996). Water deficit-induced changes in concentrations in proline and some other amino acids in the phloem sap of alfalfa. *Plant Physiol.* 111, 109–113. doi: 10.1104/pp.111.1.109

Girousse, C., Faucher, M., Kleinpeter, C., and Bonnemain, J. L. (2003). Dissection of the effects of the aphid Acyrthosiphon pisum feeding on assimilate partitioning in *Medicago sativa*. *New Phytol.* 157, 83–92. doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00659.x

Girousse, C., Moulia, B., Silk, W., and Bonnemain, J. L. (2005). Aphid infestation causes different changes in carbon and nitrogen allocation in alfalfa stems as well as different inhibitions of longitudinal and radial expansion. *Plant Physiol.* 137, 1474–1484. doi: 10.1104/pp.104.057430

Godt, D., and Roitsch, T. (2006). The developmental and organ specific expression of sucrose cleaving enzymes in sugar beet suggests a transition between apoplasmic and symplasmic phloem unloading in the tap roots. *Plant Physiol. Biochem.* 44, 656–665. doi: 10.1016/j.plaphy.2006.09.019

Gosalvez-Bernal, B., Genoves, A., Antonio Navarro, J., Pallas, V., and Sanchez-Pina, M. A. (2008). Distribution and pathway for phloem-dependent movement of Melon necrotic spot virus in melon plants. *Mol. Plant Pathol.* 9, 447–461. doi: 10.1111/j.1364-3703.2008.00474.x

Grams, T. E. E., Anegg, S., Häberle, K.-H., Langebartels, C., and Matyssek, R. (1999). Interactions of chronic exposure to elevated CO2 and O3 levels in the photosynthetic light and dark reactions of European beech (*Fagus sylvatica*). *New Phytol.* 144, 95–107.

Grantz, D. A. (2003). Ozone impacts on cotton: towards an integrated mechanism. *Environ. Pollut.* 126, 331–344. doi: 10.1016/S0269-7491(03)00246-X

Grantz, D. A., and Farrar, J. F. (1999). Acute exposure to ozone inhibits rapid carbon translocation from source leaves of Pima cotton. *J. Exp. Bot.* 50, 1253–1262. doi: 10.1093/jxb/50.336.1253

Grantz, D. A., Gunn, S., and Vu, H. B. (2006). O3 impacts on plant development: a meta-analysis of root/shoot allocation and growth. *Plant Cell Environ.* 29, 1193–1209. doi: 10.1111/j.1365-3040.2006.01521.x

Grantz, D. A., and Yang, S. (2000). Ozone impacts on allometry and root hydraulic conductance are not mediated by source limitation nor developmental age. *J. Exp. Bot.* 51, 919–927. doi: 10.1093/jexbot/51.346.919

Grimmer, C., Bachfischer, T., and Komor, E. (1999). Carbohydrate partitioning into starch in leaves of Ricinus *communis* L. grown under elevated CO2 is controlled by sucrose. *Plant Cell Environ.* 22, 1275–1280. doi: 10.1046/j.1365-3040.1999.00481.x

Grimmer, C., and Komor, E. (1999). Assimilate export by leaves of *Ricinus communis* L. growing under normal and elevated carbon dioxide concentrations: the same rate during the day, a different rate at night. *Planta* 209, 275–281. doi: 10.1007/s004250050633

Hafke, J. B., Van Amerongen, J. K., Kelling, F., Furch, A. C., Gaupels, F., and Van Bel, A. J. E. (2005). Thermodynamic battle for photosynthate acquisition between sieve tubes and adjoining parenchyma in transport phloem. *Plant Physiol.* 138, 1527–1537. doi: 10.1104/pp.104.058511

Hall, J. L., and Williams, L. E. (2000). Assimilate transport and partitioning in fungal biotrophic interactions. *Funct. Plant Biol.* 27, 549–560. doi: 10.1071/PP99140

Hammond, J. P., and White, P. J. (2008). Sucrose transport in the phloem: integrating root responses to phosphorus starvation. *J. Exp. Bot.* 59, 93–109. doi: 10.1093/jxb/erm221

Harloff, H. J., and Wegmann, K. (1993). Evidence for a mannitol cycle in *Orobanche ramosa* and *Orobanche crenata*. *J. Plant Physiol.* 141, 513–520. doi: 10.1016/S0176-1617(11)80449-9

Haupt, S., Oparka, K. J., Sauer, N., and Neumann, S. (2001). Macromolecular trafficking between *Nicotiana tabacum* and the holoparasite *Cuscuta reflexa*. *J. Exp. Bot.* 52, 173–177. doi: 10.1093/jexbot/52.354.173

Hawkins, C. D. B., Whitecross, M. I., and Aston, M. J. (1987). The effect of short-term aphid feeding on the partitioning of 14CO2 photoassimilate in three legume species. *Can. J. Bot.* 65, 666–672. doi: 10.1139/b87-089

Hayes, M. A., Feechan, A., and Dry, I. B. (2010). Involvement of abscisic acid in the coordinated regulation of a stress-inducible hexose transporter (VvHT5) and a cell wall invertase in grapevine in response to biotrophic fungal infection. *Plant Physiol.* 153, 211–221. doi: 10.1104/pp.110.154765

Helber, N., Wippel, K., Sauer, N., Schaarschmidt, S., Hause, B., and Requena, N. (2011). A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus sp. is crucial for the symbiotic relationship with plants. *Plant Cell* 23, 3812–3823. doi: 10.1105/tpc.111.089813

Herbers, K., Meuwly, P., Frommer, W. B., Metraux, J. P., and Sonnewald, U. (1996). Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway. *Plant Cell* 8, 793–803. doi: 10.1105/tpc.8.5.793

Herbers, K., Takahata, Y., Melzer, M., Mock, H. P., Hajirezaei, M., and Sonnewald, U. (2000). Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of potato virus Y with tobacco. *Mol. Plant Pathol.* 1, 51–59. doi: 10.1046/j.1364-3703.2000.00007.x

Hermans, C., Bourgis, F., Faucher, M., Strasser, R. J., Delrot, S., and Verbruggen, N. (2005). Magnesium deficiency in sugar beets alters sugar partitioning and phloem loading in young mature leaves. *Planta* 220, 541–549. doi: 10.1007/s00425-004-1376-5

Hermans, C., Hammond, J. P., White, P. J., and Verbruggen, N. (2006). How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends Plant Sci.* 11, 610–617. doi: 10.1016/j.tplants.2006.10.007

Hermans, C., Johnson, G. N., Strasser, R. J., and Verbruggen, N. (2004). Physiological characterisation of magnesium deficiency in sugar beet: acclimation to low magnesium differentially affects photosystems I and II. *Planta* 220, 344–355. doi: 10.1007/s00425-004-1340-4

Hewer, A., Will, T., and Van Bel, A. J. E. (2010). Plant cues for aphid navigation in vascular tissues. *J. Exp. Bot.* 213, 4030–4042. doi: 10.1242/jeb.046326

Hibberd, J. M., and Jeschke, W. D. (2001). Solute flux into parasitic plants. *J. Exp. Bot.* 52, 2043–2049. doi: 10.1093/jexbot/52.363.2043

Ho, L. C. (1988). Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 39, 355–378. doi: 10.1146/annurev.pp.39.060188.002035

Hoffmann-Thoma, G., Van Bel, A. J. E., and Ehlers, K. (2001). Ultrastructure of minor-vein phloem and assimilate export in summer and winter leaves of symplasmatically loading evergreens *Ajuga reptans* L., *Aucuba japonica Thunb.*, and *Hedera helix* L. *Planta* 212, 231–242. doi: 10.1007/s004250000382

Hofius, D., Hajirezaei, M. R., Geiger, M., Tschiersch, H., Melzer, M., and Sonnewald, U. (2004). RNAi-mediated tocopherol deficiency impairs photoassimilate export in transgenic potato plants. *Plant Physiol.* 135, 1256–1268. doi: 10.1104/pp.104.043927

Hofius, D., Herbers, K., Melzer, M., Omid, A., Tacke, E., Wolf, S., et al. (2001). Evidence for expression level-dependent modulation of carbohydrate status and viral resistance by the potato leafroll virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant J.* 28, 529–543. doi: 10.1046/j.1365-313X.2001.01179.x

Hou, W. (1985). Seasonal fluctuation of reserve materials in the trunkwood of spruce [*Picea abies* (L.) *Karst*]. *J. Plant Physiol.* 117, 355–362. doi: 10.1016/S0176-1617(85)80071-7

Huglin, P. (1986). Biologie et écologie de la vigne. Paris: INRA Payot Lausanne, Techniques and Documentation

Hummel, I., Pantin, F., Sulpice, R., Piques, M., Rolland, G., Dauzat, M., et al. (2010). *Arabidopsis* plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. *Plant Physiol.* 154, 357–372. doi: 10.1104/pp.110.157008

Ibraheem, O., Dealtry, G., Roux, S., and Bradley, G. (2011). The effect of drought and salinity on the expressional levels of sucrose transporters in rice (*Oryza sativa* Nipponbare) cultivar plants. *Plant Omics J.* 4, 68–74.

Jeschke, W. D., Bäumel, P., Räth, N., Czygan, F.-C., and Proksch, P. (1994). Modelling of the flows and partitioning of carbon and nitrogen in the holoparasite *Cuscuta reflexa* Roxb. *and* its host *Lupinus albus* L.: II. Flows between host and parasite and within the parasitized host. *J. Exp. Bot.* 45, 801–812.

Juchaux-Cachau, M., Landouar-Arsivaud, L., Pichaut, J. P., Campion, C., Porcheron, B., Jeauffre, J., et al. (2007). Characterization of AgMaT2, a plasma membrane mannitol transporter from celery, expressed in phloem cells, including phloem parenchyma cells. *Plant Physiol.* 145, 62–74. doi: 10.1104/pp.107.103143

Kangasjärvi, J., Talvinen, J., Utriainen, M., and Karjalainen, R. (1994). Plant defence systems induced by ozone. *Plant Cell Environ.* 17, 783–794. doi: 10.1111/j.1365-3040.1994.tb00173.x

Kehr, J. (2013). Systemic regulation of mineral homeostasis by micro RNAs. *Front. Plant Sci.* 4:145. doi: 10.3389/fpls.2013.00145

Kim, J.-Y., Mahé, A., Brangeon, J., and Prioul, J.-L. (2000). A maize vacuolar invertase, IVR2, is induced by water stress. Organ/tissue specificity and diurnal modulation of expression. *Plant Physiol.* 124, 71–84. doi: 10.1104/pp.124.1.71

Knoblauch, M., and Oparka, K. (2012). The structure of the phloem-still more questions than answers. *Plant J.* 70, 147–156. doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.04931.x

Kocal, N., Sonnewald, U., and Sonnewald, S. (2008). Cell wall-bound invertase limits sucrose export and is involved in symptom development and inhibition of photosynthesis during compatible interaction between tomato and *Xanthomonas campestris* pv vesicatoria. *Plant Physiol.* 148, 1523–1536. doi: 10.1104/pp.108.127977

Koch, K. (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 235–246. doi: 10.1016/j.pbi.2004.03.014

Koster, K. L., and Leopold, A. C. (1988). Sugars and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiol.* 88, 829–832. doi: 10.1104/pp.88.3.829

Krupa, S. V., and Manning, W. J. (1988). Atmospheric ozone-formation and effects on vegetation. *Environ. Pollut.* 50, 101–137. doi: 10.1016/0269-7491(88)90187-X

Kurczyńska, E. U., Dmuchowski, W., Włoch, W., and Bytnerowicz, A. (1997). The influence of air pollutants on needles and stems of scots pine (*Pinus Sylvestris* L.) trees. *Environ. Pollut.* 98, 325–334. doi: 10.1016/S0269-7491(97)00141-3

Lalonde, S., Wipf, D., and Frommer, W. B. (2004). Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 341–372. doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141758

Landouar-Arsivaud, L., Juchaux-Cachau, M., Jeauffre, J., Biolley, J.-P., Maurousset, L., and Lemoine, R. M. (2011). The promoters of 3

celery salt-induced phloem-specific genes as new tools for monitoring salt stress responses. *Plant Physiol. Biochem.* 49, 2–8. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.09.008

Lang, A., and Minchin, P. E. H. (1986). Phylogenetic distribution and mechanism of translocation inhibition by chilling. *J. Exp. Bot.* 37, 389–398. doi: 10.1093/jxb/37.3.389

Lebon, E., Pellegrino, A., Louarn, G., and Lecoeur, J. (2006). Branch development controls leaf area dynamics in grapevine (*Vitis vinifera*) growing in drying soil. *Ann. Bot.* 98, 175–185. doi: 10.1093/aob/mcl085

Lecoeur, J., Wery, J., Turc, O., and Tardieu, F. (1995). Expansion of pea leaves subjected to short water deficit: cell number and cell size are sensitive to stress at different periods of leaf development. *J. Exp. Bot.* 46, 1093–1101. doi: 10.1093/jxb/46.9.1093

Lee-Ho, E., Walton, L. J., Reid, D. M., Yeung, E. C., and Kurepin, L. V. (2007). Effects of elevated carbon dioxide and sucrose concentrations on *Arabidopsis thaliana* root architecture and anatomy. *Can. J. Bot.* 85, 324–330. doi: 10.1139/B07-009

Lei, M., Liu, Y., Zhang, B., Zhao, Y., Wang, X., Zhou, Y., et al. (2011). Genetic and genomic evidence that sucrose is a global regulator of plant responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 156, 1116–1130. doi: 10.1104/pp.110.171736

Lingner, U., Munch, S., Deising, H. B., and Sauer, N. (2011). Hexose transporters of a hemibiotrophic plant pathogen: functional variations and regulatory differences at different stages of infection. *J. Biol. Chem.* 286, 20913–20922. doi: 10.1074/jbc.M110.213678

Liu, D. D., Chao, W. M., and Turgeon, R. (2012). Transport of sucrose, not hexose, in the phloem. *J. Exp. Bot.* 63, 4315–4320. doi: 10.1093/jxb/ers127

Liu, J., Samac, D. A., Bucciarelli, B., Allan, D. L., and Vance, C. P. (2005). Signaling of phosphorus deficiency-induced gene expression in white lupin requires sugar and phloem transport. *Plant J.* 41, 257–268. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02289.x

Lloyd, J. C., and Zakhleniuk, O. V. (2004). Responses of primary and secondary metabolism to sugar accumulation revealed by microarray expression analysis of the *Arabidopsis* mutant, pho3. *J. Exp. Bot.* 55, 1221–1230. doi: 10.1093/jxb/erh143

Lohaus, G., Hussmann, M., Pennewiss, K., Schneider, H., Zhu, J. Ä., and Sattelmacher, B. (2000). Solute balance of a maize (*Zea mays* L.) source leaf as affected by salt treatment with special emphasis on phloem retranslocation and ion leaching. *J. Exp. Bot.* 51, 1721–1732. doi: 10.1093/jexbot/51.351.172

Lorenc-Plucinska, G., and Ziegler, H. (1987). Effect of sulfite and sulfhydryl reagents on the phloem loading in cotyledons of *Ricinus communis* L. *J. Plant Physiol.* 128, 417–424. doi: 10.1016/S0176-1617(87)80126-8

Lucas, W. J., and Wolf, S. (1999). Connections between virus movement, macromolecular signaling and assimilate allocation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 192–197. doi: 10.1016/S1369-5266(99)80035-1

Lundmark, M., Cavaco, A. M., Trevanion, S., and Hurry, V. (2006). Carbon partitioning and export in transgenic Arabidopsis thaliana with altered capacity for sucrose synthesis grown at low temperature: a role for metabolite transporters. *Plant Cell Environ.* 29, 1703–1714. doi: 10.1111/j.1365-3040.2006.01543.x

Maeda, H., Song, W., Sage, T. L., and Dellapenna, D. (2006). Tocopherols play a crucial role in low-temperature adaptation and phloem loading in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 2710–2732. doi: 10.1105/tpc.105.039404

Makino, A., and Mae, T. (1999). Photosynthesis and plant growth at elevated levels of CO2. *Plant Cell Physiol.* 40, 999–1006. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a029493

Marschner, H., Kirkby, E. A., and Cakmak, I. (1996). Effect of mineral nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. *J. Exp. Biol.* 47, 1255–1263. doi: 10.1093/jxb/47.Special_Issue.1255

Martin, T., Oswald, O., and Graham, I. A. (2002). *Arabidopsis* seedling growth, storage lipid mobilization, and photosynthetic gene expression are regulated by carbon:nitrogen availability. *Plant Physiol.* 128, 472–481. doi: 10.1104/pp.010475

Maurousset, L., Lemoine, R., Gallet, O., Delrot, S., and Bonnemain, J.-L. (1992a). Sulfur dioxide inhibits the sucrose carrier of the plant plasma membrane. *BBA Biomembranes* 1105, 230–236. doi: 10.1016/0005-2736(92)90199-V

Maurousset, L., Raymond, P., Caudillert, M., and Bonnemain, J.-L. (1992b). Mechanism of the inhibition of phloem loading by sodium sulfite: effect of the pollutant on respiration, photosynthesis and energy charge in the leaf tissues. *Physiol. Plant.* 84, 101–105. doi: 10.1111/j.1399-3054.1992.tb08771.x

Mendgen, K., and Hahn, M. (2002). Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends Plant Sci.* 7, 352–356. doi: 10.1016/S1360-1385(02)02297-5

Mendoza-Cozatl, D. G., Jobe, T. O., Hauser, F., and Schroeder, J. I. (2011). Long-distance transport, vacuolar sequestration, tolerance, and transcriptional responses induced by cadmium and arsenic. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 554–562. doi: 10.1016/j.pbi.2011.07.004

Merchant, A., and Richter, A. A. (2011). Polyols as biomarkers and bioindicators for 21st century plant breeding. *Funct. Plant Biol.* 38, 934–940. doi: 10.1071/FP11105

Mewis, I., Khan, M. A. M., Glawischnig, E., Schreiner, M., and Ulrichs, C. (2012). Water stress and aphid feeding differentially influence metabolite composition in *Arabidopsis thaliana* (L.). *PLoS ONE* 7:48661. doi: 10.1371/journal.pone.0048661

Miles, P. W. (1989). "The responses of plant to the feeding of *Arabidopsis*: principles," in Minks, Aphids, Natural Enemies and Control ed. A. K. Herrawyn (Elsevier: Amsterdam), 1–21.

Miles, P. W. (1999). Aphid saliva. *Biol. Rev.* 74, 41–85. doi: 10.1017/S0006323198005271

Minchin, P. E. H., and Gould, R. (1986). Effect of SO2 on phloem loading. *Plant Sci.* 43, 179–183. doi: 10.1016/0168-9452(86)90015-4

Minchin, P. E. H., and Thorpe, M. R. (1987). Measurement of unloading and reloading of photoassimilate within the stem of bean. *J. Exp. Bot.* 38, 211–220. doi: 10.1093/jxb/38.2.211

Minchin, P. E. H., Thorpe, M. R., Farrar, J. F., and Koroleva, O. A. (2002). Source and sink coupling in young barley plants and control of phloem loading. *J. Exp. Bot.* 53, 1671–1676. doi: 10.1093/jxb/erf003

Moran, P. J., and Thompson, G. A. (2001). Molecular responses to aphid feeding in *Arabidopsis* in relation to plant defense pathways. *Plant Physiol.* 125, 1074–1085. doi: 10.1104/pp.125.2.1074

Mortensen, L., and Engvild, K. C. (1995). Effects of ozone on 14C translocation velocity and growth of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) exposed in open-top chambers. *Environ. Pollut.* 87, 135–140. doi: 10.1016/0269-7491(94)P2599-5

Muller, B., Pantin, F., Genard, M., Turc, O., Freixes, S., Piques, M., et al. (2011). Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *J. Exp. Bot.* 62, 1715–1729. doi: 10.1093/jxb/erq438

Nadler-Hassar, T., Goldshmidt, A., Rubin, B., and Wolf, S. (2004). Glyphosate inhibits the translocation of green fluorescent protein and sucrose from a transgenic tobacco host to *Cuscuta campestris* Yunk. *Planta* 219, 790–796. doi: 10.1007/s00425-004-1288-4

Newton, A. C., Fitt, B. D. L., Atkins, S. D., Walters, D. R., and Daniell, T. J. (2010). Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe–plant interactions. *Trends Microbiol.* 18, 365–373. doi: 10.1016/j.tim.2010.06.002

Noiraud, N., Maurousset, L., and Lemoine, R. (2001a). Identification of a mannitol transporter, AgMaT1, in celery phloem. *Plant Cell* 13, 695–705. doi: 10.1105/tpc.13.3.695

Noiraud, N., Maurousset, L., and Lemoine, R. M. (2001b). Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* 39, 717–728. doi: 10.1016/S0981-9428(01)01292-X

Olesinski, A. A., Almon, E., Navot, N., Perl, A., Galun, E., Lucas, W. J., et al. (1996). Tissue-specific expression of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic potato plants alters plasmodesmal function and carbohydrate partitioning. *Plant Physiol.* 111, 541–550. doi: 10.1104/pp.111.2.541

Panstruga, R. (2003). Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 320–326. doi: 10.1016/S1369-5266(03)00043-8

Patrick, J. W. (1997). PHLOEM UNLOADING: sieve element unloading and post-sieve element transport. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 191–222. doi: 10.1146/annurev.arplant.48.1.191

Pattanagul, W., and Madore, M. A. (1999). Water deficit effects on raffinose family oligosaccharide metabolism in Coleus. *Plant Physiol.* 121, 987–993. doi: 10.1104/pp.121.3.987

Paul, M. J., and Driscoll, S. P. (1997). Sugar repression of photosynthesis: the role of carbohydrates in signalling nitrogen deficiency through source:sink imbalance. *Plant Cell Environ.* 20, 110–116. doi: 10.1046/j.1365-3040.1997.d01-17.x

Pell, E. J., and Dann, M. S. (1991). "Multiple stress induced foliar senescence and implications for whole," in *Response of Plants to Multiples Stress*, eds H. A. Mooney, W. E. Winner and E. J. Pell (San Diego C.A: Academic Press), 189–204.

Pelleschi, S., Rocher, J. P., and Prioul, J. L. (1997). Effect of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis in mature maize leaves. *Plant Cell Environ.* 20, 493–503. doi: 10.1046/j.1365-3040.1997.d01-89.x

Péron, T., Véronési, C., Mortreau, E., Pouvreau, J.-B., Thoiron, S., Leduc, N., et al. (2012). Role of the sucrose synthase encoding PrSus1 gene in the development of the parasitic plant *Phelipanche ramosa* L. (Pomel). *Mol. Plant Microbe Interact.* 25, 402–411. doi: 10.1094/MPMI-10-11-0260

Peuke, A. D. (2010). Correlations in concentrations, xylem and phloem flows, and partitioning of elements and ions in intact plants. A summary and statistical re-evaluation of modelling experiments in *Ricinus communis*. *J. Exp. Bot.* 61, 635–655. doi: 10.1093/jxb/erp352

Peuke, A. D., Hartung, W., and Jeschke, W. D. (1994). The uptake and flow of C, N and ions between roots and shoots in *Ricinus communis* L. II. Grown with low or high nitrate supply. *J. Exp. Bot.* 45, 733–740. doi: 10.1093/jxb/45.6.733

Peuke, A. D., Windt, C., and Van As, H. (2006). Effects of cold-girdling on flows in the transport phloem in *Ricinus communis*: is mass flow inhibited? *Plant Cell Environ.* 29, 15–25. doi: 10.1111/j.1365-3040.2005.01396.x

Pickard, W. F., and Minchin, P. E. H. (1990). The transient inhibition of phloem translocation in *Phaseolus vulgaris* by abrupt temperature drops, vibration, and electric shock. *J. Exp. Bot.* 41, 1361–1369. doi: 10.1093/jxb/41.11.1361

Pinheiro, C., Chaves, M. M., and Ricardo, C. P. (2001). Alterations in carbon and nitrogen metabolism induced by water deficit in the stems and leaves of *Lupinus albus* L. *J. Exp. Bot.* 52, 1063–1070. doi: 10.1093/jexbot/52.358.1063

Pinheiro, C., Rodrigues, A. P., De Carvalho, I. S., Chaves, M. M., and Ricardo, C. P. (2005). Sugar metabolism in developing lupin seeds is affected by a short-term water deficit. *J. Exp. Bot.* 56, 2705–2712. doi: 10.1093/jxb/eri263

Pleijel, H., and Uddling, J. (2012). Yield vs. Quality trade-offs for wheat in response to carbon dioxide and ozone. *Glob. Change Biol.* 18, 596–605. doi: 10.1111/j.1365-2486.2011.2489.x

Pommerrenig, B., Papini-Terzi, F. S., and Sauer, N. (2007). Differential regulation of sorbitol and sucrose loading into the phloem of Plantago major in response to salt stress. *Plant Physiol.* 144, 1029–1038. doi: 10.1104/pp.106.089151

Puckett, K. J., Nieboer, E., Flora, W. P., and Richardson, D. H. S. (1973). Sulphur dioxide: its effect on photo-synthetic 14C fixation in lichens and suggested mechanisms of phytotoxicity. *New Phytol.* 72, 141–154. doi: 10.1111/j.1469-8137.1973.tb02019.x

Reinders, A., Sivitz, A. B., and Ward, J. M. (2012). Evolution of plant sucrose uptake transporters. *Front. Plant Sci.* 3:22. doi: 10.3389/fpls.2012.00022

Remans, T., Nacry, P., Pervent, M., Girin, T., Tillard, P., Lepetit, M., et al. (2006). A central role for the nitrate transporter NRT2.1 in the integrated morphological and physiological responses of the root system to nitrogen limitation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 140, 909–921. doi: 10.1104/pp.105.075721

Rennie, E. A., and Turgeon, R. (2009). A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 14162–14167. doi: 10.1073/pnas.0902279106

Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., and Mittler, R. (2004). When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol.* 134, 1683–1696. doi: 10.1104/pp.103.033431

Roitsch, T. (1999). Source-sink regulation by sugar and stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 198–206. doi: 10.1016/S1369-5266(99)80036-3

Roitsch, T., Balibrea, M. E., Hofmann, M., Proels, R., and Sinha, A. K. (2003). Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *J. Exp. Bot.* 54, 513–524. doi: 10.1093/jxb/erg050

Roitsch, T., and Gonzalez, M. C. (2004). Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends Plant Sci.* 9, 606–613. doi: 10.1016/j.tplants.2004.10.009

Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., and Sheen, J. (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 675–709. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105441

Ruiz, E., and Ruffner, H. P. (2002). Immunodetection of Botrytis-specific invertase in infected grapes. *J. Phytopathol.* 150, 76–85. doi: 10.1046/j.1439-0434.2002.00720.x

Sandermann, H. (1996). Ozone and plant health. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34, 347–366. doi: 10.1146/annurev.phyto.34.1.347

Sauer, N. (2007). Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Lett.* 581, 2309–2317. doi: 10.1016/j.febslet.2007.03.048

Saxe, H., and Murali, N. S. (1989). Diagnostic parameters for selecting against novel spruce (*Picea abies*) decline: I. Tree morphology and photosynthesis response to acute SO2 exposures. *Physiol. Plant.* 76, 340–348. doi: 10.1111/j.1399-3054.1989.tb06201.x

Scheible, W.-R., Lauerer, M., Schulze, E.-D., Caboche, M., and Stitt, M. (1997). Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *Plant J.* 11, 671–691. doi: 10.1046/j.1365-313X.1997.11040671.x

Schnyder, H. (1993). The role of carbohydrate storage and redistribution in the source-sink relations of wheat and barley during grain filling – a review. *New Phytol.* 123, 233–245. doi: 10.1111/j.1469-8137.1993.tb03731.x

Schoelz, J. E., Harries, P. A., and Nelson, R. S. (2011). Intracellular transport of plant viruses: finding the door out of the cell. *Mol. Plant* 4, 813–831. doi: 10.1093/mp/ssr070

Schrier, A., Hoffmann-Thoma, G., and Van Bel, A. J. E. (2000). Temperature effects on symplasmic and apoplasmic phloem loading and loading-associated carbohydrate processing. *Aust. J. Plant Physiol.* 27, 769–778. doi: 10.1071/PP99166

Schroeder, J. I., Delhaize, E., Frommer, W. B., Guerinot, M. L., Harrison, M. J., Herrera-Estrella, L., et al. (2013). Using membrane transporters to improve crops for sustainable food production. *Nature* 497, 60–66. doi: 10.1038/nature11909

Schulz, A., Beyhl, D., Marten, I., Wormit, A., Neuhaus, E., Poschet, G., et al. (2011). Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2. *Plant J.* 68, 129–136. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04672.x

Shalitin, D., and Wolf, S. (2000). Cucumber Mosaic Virus infection affects sugar transport in melon plants. *Plant Physiol.* 123, 597–604. doi: 10.1104/pp.123.2.597

Siemens, J., Gonzalez, M. C., Wolf, S., Hofmann, C., Greiner, S., Du, Y., et al. (2011). Extracellular invertase is involved in the regulation of clubroot disease in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Pathol.* 12, 247–262. doi: 10.1111/j.1364-3703.2010.00667.x

Singh, V., Louis, J., Ayre, B. G., Reese, J. C., Pegadaraju, V., and Shah, J. (2011). TREHALOSE PHOSPHATE SYNTHASE11-dependent trehalose metabolism promotes *Arabidopsis thaliana* defense against the phloem-feeding insect *Myzus persicae*. *Plant J.* 67, 94–104. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04583.x

Slewinski, T. L. (2011). Diverse functional roles of monosaccharide transporters and their homologs in vascular plants: a physiological perspective. *Mol. Plant* 4, 641–662. doi: 10.1093/mp/ssr051

Smith, S. E., and Smith, F. A. (2012). Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. *Mycologia* 104, 1–13. doi: 10.3852/11-229

Stockwell, W. R., Kirchner, F., Kuhn, M., and Seefeld, S. (1997). A new mechanism for regional atmospheric chemistry modeling. *J. Geophys. Res. Atmos.* 102, 25847–25879. doi: 10.1029/97JD00849

Stoop, J. M. H., Williamson, J. D., and Mason Pharr, D. (1996). Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends Plant Sci.* 1, 139–144. doi: 10.1016/S1360-1385(96)80048-3

Sutton, P. N., Gilbert, M. J., Williams, L. E., and Hall, J. L. (2007). Powdery mildew infection of wheat leaves changes host solute transport and invertase activity. *Physiol. Plant.* 129, 787–795. doi: 10.1111/j.1399-3054.2007.00863.x

Sutton, P. N., Henry, M. J., and Hall, J. L. (1999). Glucose, and not sucrose, is transported from wheat to wheat powdery mildew. *Planta* 208, 426–430. doi: 10.1007/s004250050578

Suwa, R., Fujimaki, S., Suzui, N., Kawachi, N., Ishii, S., Sakamoto, K., et al. (2008). Use of positron-emitting tracer imaging system for measuring the effect of salinity on temporal and spatial distribution of 11C tracer and coupling between source and sink organs. *Plant Sci.* 175, 210–216. doi: 10.1016/j.plantsci.2008.03.022

Taji, T., Ohsumi, C., Iuchi, S., Seki, M., Kasuga, M., Kobayashi, M., et al. (2002). Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 29, 417–426. doi: 10.1046/j.0960-7412.2001.01227.x

Talbot, N. J. (2010). Living the sweet life: how does a plant pathogenic fungus acquire sugar from plants? *PLoS Biol.* 8:1000308. doi: 10.1371/journal.pbio.1000308

Tecsi, L. I., Smith, A. M., Maule, A. J., and Leegood, R. C. (1996). A spatial analysis of physiological changes associated with infection of cotyledons of marrow plants with cucumber mosaic virus. *Plant Physiol.* 111, 975–985. doi: 10.1104/pp.111.4.975

Thorpe, M. R., Furch, A. C., Minchin, P. E., Föller, J., Van Bel, A. J., and Hafke, J. B. (2010). Rapid cooling triggers forisome dispersion just before phloem transport stops. *Plant Cell Environ.* 33, 259–271. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.02079.x

Tjallingii, W. F. (2006). Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. *J. Exp. Bot.* 57, 739–745. doi: 10.1093/jxb/erj088

Trouverie, J., Chateau-Joubert, S., Thevenot, C., Jacquemot, M. P., and Prioul, J. L. (2004). Regulation of vacuolar invertase by abscisic acid or glucose in leaves and roots from maize plantlets. *Planta* 219, 894–905. doi: 10.1007/s00425-004-1289-3

Truernit, E., Schmid, J., Epple, P., Illig, J., and Sauer, N. (1996). The sink-specific and stress-regulated Arabidopsis STP4 gene: enhanced expression of a gene encoding a monosaccharide transporter by wounding, elicitors, and pathogen challenge. *Plant Cell* 8, 2169–2182. doi: 10.1105/tpc.8.12.2169

Turgeon, R. (2010a). The puzzle of phloem pressure. *Plant Physiol.* 154, 578–581. doi: 10.1104/pp.110.161679

Turgeon, R. (2010b). The role of phloem loading reconsidered. *Plant Physiol.* 152, 1817–1823. doi: 10.1104/pp.110.153023

Uraguchi, S., Kamiya, T., Sakamoto, T., Kasai, K., Sato, Y., Nagamura, Y., et al. (2011). Low-affinity cation transporter (OsLCT1) regulates cadmium transport into rice grains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 20959–20964. doi: 10.1073/pnas.1116531109

Van Bel, A. J. E. (2003). The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant Cell Environ.* 26, 125–149. doi: 10.1046/j.1365-3040.2003.00963.x

Van Bel, A. J. E., and Gamalei, Y. V. (1992). Ecophysiology of phloem loading in source leaves. *Plant Cell Environ.* 15, 265–270. doi: 10.1111/j.1365-3040.1992.tb00973.x

van Bel, A. J. E., and Hess, P. H. (2008). Hexoses as phloem transport sugars: the end of a dogma? *J. Exp. Bot.* 59, 261–272. doi: 10.1093/jxb/erm294

van Kan, J. A. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci.* 11, 247–253. doi: 10.1016/j.tplants.2006.03.005

Viola, R., Roberts, A. G., Haupt, S., Gazzani, S., Hancock, R. D., Marmiroli, N., et al. (2001). Tuberization in potato involves a switch from apoplastic to symplastic phloem unloading. *Plant Cell* 13, 385–398. doi: 10.1105/tpc.13.2.385

Voegele, R., and Mendgen, K. (2011). Nutrient uptake in rust fungi: how sweet is parasitic life? *Euphytica* 179, 41–55. doi: 10.1007/s10681-011-0358-5

Voegele, R. T., Struck, C., Hahn, M., and Mendgen, K. (2001). The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 8133–8138. doi: 10.1073/pnas.131186798

Voegele, R. T., Wirsel, S., Moll, U., Lechner, M., and Mendgen, K. (2006). Cloning and characterization of a novel invertase from the obligate biotroph *Uromyces fabae* and analysis of expression patterns of host and pathogen invertases in the course of infection. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19, 625–634. doi: 10.1094/MPMI-19-0625

Voelckel, C., Weisser, W. W., and Baldwin, I. T. (2004). An analysis of plant–aphid interactions by different microarray hybridization strategies. *Mol. Ecol.* 13, 3187–3195. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02297.x

Vollenweider, P., Cosio, C., Günthardt-Goerg, M. S., and Keller, C. (2006). Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.). *Environ. Exp. Bot.* 58, 25–40. doi: 10.1016/j.envexpbot.2005.06.012

Volz, A., and Kley, D. (1988). Evaluation of the Montsouris series of ozone measurements made in the 19th-century. *Nature* 332, 240–242. doi: 10.1038/332240a0

Wahl, R., Wippel, K., Goos, S., Kamper, J., and Sauer, N. (2010). A novel high-affinity sucrose transporter is required for virulence of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *PLoS Biol.* 8:1000303. doi: 10.1371/journal.pbio.1000303

Wang, N., and Nobel, P. S. (1996). Doubling the CO2 concentration enhanced the activity of carbohydrate-metabolism enzymes, source carbohydrate production, photoassimilate transport, and sink strength for *Opuntia ficus-indica*. *Plant Physiol.* 110, 893–902.

Wardlaw, I. F. (1990). Tansley Review No. 27 The control of carbon partitioning in plants. *New Phytol.* 116, 341–381. doi: 10.1111/j.1469-8137.1990.tb00524.x

Way, D. A., Ladeau, S. L., Mccarthy, H. R., Clark, J. S., Oren, R. A. M., Finzi, A. C., et al. (2010). Greater seed production in elevated CO2 is not accompanied by reduced seed quality in *Pinus taeda* L. *Glob. Change Biol.* 16, 1046–1056. doi: 10.1111/j.1365-2486.2009.02007.x

Weber, H., Borisjuk, L., Heim, U., Sauer, N., and Wobus, U. (1997). A role for sugar transporters during seed development: molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in fava bean seeds. *Plant Cell* 9, 895–908. doi: 10.1105/tpc.9.6.895

Weschke, W., Panitz, R., Gubatz, S., Wang, Q., Radchuk, R., Weber, H., et al. (2003). The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. *Plant J.* 33, 395–411. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01633.x

Weschke, W., Panitz, R., Sauer, N., Wang, Q., Neubohn, B., Weber, H., et al. (2000). Sucrose transport into barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation. *Plant J.* 21, 455–467. doi: 10.1046/j.1365-313x.2000.00695.x

Westgate, M. E., Schussler, J. R., Reicosky, D. C., and Brenner, M. L. (1989). Effect of water deficits on seed development in Soybean: II. Conservation of seed growth rate. *Plant Physiol.* 91, 980–985. doi: 10.1104/pp.91.3.980

White, P. J. (2009). Depolarization-activated calcium channels shape the calcium signatures induced by low-temperature stress. *New Phytol.* 183, 6–8. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02857.x

Whittaker, A., Bochicchio, A., Vazzana, C., Lindsey, G., and Farrant, J. (2001). Changes in leaf hexokinase activity and metabolite levels in response to drying in the desiccation-tolerant species *Sporobolus stapfianus* and Xerophyta viscosa. *J. Exp. Bot.* 52, 961–969. doi: 10.1093/jexbot/52.358.961

Wilkinson, S., Mills, G., Illidge, R., and Davies, W. J. (2012). How is ozone pollution reducing our food supply? *J. Exp. Bot.* 63, 527–536. doi: 10.1093/jxb/err317

Will, T., Tjallingii, W. F., Thonnessen, A., and Van Bel, A. J. E. (2007). Molecular sabotage of plant defense by aphid saliva. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 10536–10541. doi: 10.1073/pnas.0703535104

Wingenter, K., Schulz, A., Wormit, A., Wic, S., Trentmann, O., Hoermiller, I. I., et al. (2010). Increased activity of the vacuolar monosaccharide transporter TMT1 alters cellular sugar partitioning, sugar signaling, and seed yield in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 154, 665–677. doi: 10.1104/pp.110.162040

Wingler, A., Von Schaewen, A., Leegood, R. C., Lea, P. J., and Quick, P. W. (1998). Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars, and light: sefects on NADH-dependent hydroxypyruvate reductase. *Plant Physiol.* 116, 329–335. doi: 10.1104/pp.116.1.329

Wippel, K., Wittek, A., Hedrich, R., and Sauer, N. (2010). Inverse pH regulation of plant and fungal sucrose transporters: a mechanism to regulate competition for sucrose at the host/pathogen interface? *PLoS ONE* 5:12429. doi: 10.1371/journal.pone.0012429

Wolswinkel, P. (1974). Complete inhibition of setting and growth of fruits of *Vicia faba* L., resulting from the draining of the phloem system by *Cuscuta* species. *Acta Bot. Neerl.* 23, 48–60.

Wolswinkel, P., Ammerlaan, A., and Peters, H. F. C. (1984). Phloem unloading of amino acids at the site of attachment of *Cuscuta europaea*. *Plant Physiol.* 75, 13–20. doi: 10.1104/pp.75.1.13

Woodward, F. I. (2002). Potential impacts of global elevated CO2 concentrations on plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 207–211. doi: 10.1016/S1369-5266(02)00253-4

Wright, D. P., Baldwin, B. C., Shephard, M. C., and Scholes, J. D. (1995). Source-sink relationships in wheat leaves infected with powdery mildew. II. Changes in the regulation of the Calvin cycle. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 47, 255–267. doi: 10.1006/pmpp.1995.1056

Wu, L., and Birch, R. G. (2007). Doubled sugar content in sugarcane plants modified to produce a sucrose isomer. *Plant Biotechnol. J.* 5, 109–117. doi: 10.1111/j.1467-7652.2006.00224.x

Yang, J., Zhang, J., Wang, Z., Xu, G., and Zhu, Q. (2004). Activities of key enzymes in sucrose-to-starch conversion in wheat grains subjected to water deficit during grain filling. *Plant Physiol.* 135, 1621–1629. doi: 10.1104/pp.104.041038

Yang, J., Zhang, J., Wang, Z., Zhu, Q., and Liu, L. (2002). Abscisic acid and cytokinins in the root exudates and leaves and their relationship to senescence and remobilization of carbon reserves in rice subjected to water stress during grain filling. *Planta* 215,

645–652. doi: 10.1007/s00425-002-0789-2

Zakhleniuk, O. V., Raines, C. A., and Lloyd, J. C. (2001). pho3: a phosphorus-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* 212, 529–534. doi: 10.1007/s004250000450

Zhang, L. Y., Peng, Y. B., Pelleschi-Travier, S., Fan, Y., Lu, Y. F., Lu, Y. M., et al. (2004). Evidence for apoplasmic phloem unloading in developing apple fruit. *Plant Physiol.* 135, 574–586. doi: 10.1104/pp.103.036632

Zhang, W.-H., Zhou, Y., Dibley, K. E., Tyerman, S. D., Furbank, R. T., and Patrick, J. W. (2007). Nutrient loading of developing seeds. *Funct. Plant Biol.* 34, 314–331. doi: 10.1071/FP06271

Zhang, X. Y., Wang, X. L., Wang, X. F., Xia, G. H., Pan, Q. H., Fan, R. C., et al. (2006). A shift of Phloem unloading from symplasmic to apoplasmic pathway is involved in developmental onset of ripening in grape berry. *Plant Physiol.* 142, 220–232. doi: 10.1104/pp.106.081430

Conflict of Interest Statement: 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.

Received: 13 April 2013; accepted: 02 July 2013; published online: 24 July 2013.

Citation: Lemoine R, La Camera S, Atanassova R, Dédaldéchamp F, Allario T, Pourtau N, Bonnemain J-L, Laloi M, Coutos-Thévenot P, Maurousset L, Faucher M, Girousse C, Lemonnier P, Parrilla J and Durand M (2013) Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. Front. Plant Sci. ***4****:272. doi: 10.3389/fpls.2013.00272*

This article was submitted to Frontiers in Plant Physiology, a specialty of Frontiers in Plant Science.

Copyright © 2013 Lemoine, La Camera, Atanassova, Dédaldéchamp, Allario, Pourtau, Bonnemain, Laloi, Coutos-Thévenot, Maurousset, Faucher, Girousse, Lemonnier, Parrilla and Durand. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and subject to any copyright notices concerning any third-party graphics etc.

Etude de l'allocation du carbone dans la plante en réponse à la contrainte hydrique : impact sur l'expression des transporteurs de saccharose dans les organe source et puits

L'objectif de cette thèse était d'étudier les transporteurs de saccharose impliqués dans le développement des organes puits, et plus précisément leur rôle dans la racine des plantes soumises à la contrainte hydrique.

L'expression des transporteurs *AtSUCs* et *AtSWEETs* a été cartographiée, au cours du développement complet de plantes *A. thaliana* cultivées en hydroponie, dans la rosette, la hampe, les siliques et les racines. En parallèle, nous avons évalué l'allocation du carbone et le métabolisme des sucres dans la plante entière au cours du développement pour finalement (1) avoir un aperçu de l'allocation du carbone, du métabolisme des sucres ainsi que de l'expression des transporteurs de saccharose et (2) discuter leurs possibles relations.

Dans un second temps, nous avons conçu un système de culture en sol innovant appelé « Rhizobox » permettant la récolte de racines propres, l'analyse de l'architecture du système racinaire et l'application de la contrainte hydrique. Lors de la contrainte hydrique, la croissance racinaire est réduite, mais l'exploration en profondeur du système racinaire est maintenue probablement pour améliorer l'absorption d'eau. De plus, même si la rosette soumise à la contrainte hydrique était plus petite, l'export de ^{14}C, vers la racine, était augmenté. Dans le même temps, les niveaux de transcrits des gènes de facilitateurs de saccharose *AtSWEET11* et *AtSWEET12* ainsi que du gène *AtSUC2*, un symporteur saccharose:H^+ spécifique de la cellule compagne, tous trois impliqués dans le chargement du saccharose dans le phloème, étaient augmentés dans les feuilles des plantes soumises à la contrainte hydrique, corroborant l'augmentation de l'export du carbone vers la racine. De façon intéressante, les niveaux de transcrits des gènes *AtSUC2* et d'*ASWEET11-15*, étaient plus élevés dans les racines stressées, soulignant (1) la potentielle existence d'un déchargement apoplastique du saccharose dans la racine d'*A. thaliana* et (2) un rôle putatif pour ces transporteurs de saccharose dans le déchargement du saccharose dans la racine étant donné qu'ils sont principalement exprimés dans les zones de la racine où la demande en carbone est importante.

Study of plant carbon allocation under water deficit: impact on sucrose transporters genes expression in source and sink organs

The aim of this thesis was to investigate the sucrose transporters involved in sink organs development, and more precisely their role in roots of plants submitted to water deficit.

The expression of *AtSUCs* and *AtSWEETs* transporters was mapped during the full development of *A. thaliana* plants grown hydroponically in rosette, stem, siliques and roots. In parallel, we evaluated C partitioning and sugar metabolism in whole plant during development to finally (1) get an insight on C allocation, sugar metabolism and sucrose transporters genes expression and (2) discuss their possible relationships.

Secondly, we designed an innovating soil culture system, called "Rhizobox" which allows clean roots harvest, root system architecture analysis and water deficit experiment. Under water deficit, root growth was reduced, but in depth root exploration was maintained probably to improve water uptake. In addition, although shoot submitted to water deficit were smaller, ^{14}C exported to the roots increased. In the same time, the transcript levels of the sucrose effluxers gene *AtSWEET11* and *AtSWEET12* and the companion-cell specific sucrose:H^+ symporter gene *AtSUC2*, all three involved in sucrose phloem loading, are up-regulated in leaves of water deficit plants, agreeing with the increase in carbon export to the roots. Interestingly, the transcript levels of *AtSUC2*, and *AtSWEET11-15*, were higher in stressed roots, underlying (1) the potential existence of sucrose apoplastic unloading in *Arabidopsis* roots and (2) a putative role for these sucrose transporters in sucrose unloading in root since they are mainly expressed in root zones where C demand is high.