

Dispositif du *split-root in vitro* pour l'analyse architecturale du système racinaire chez *Arabidopsis thaliana*

Marjorie Pervent et Philippe Nacry¹

Résumé : Dans le sol, la disponibilité en azote présente d'importantes fluctuations temporelles et spatiales. Face à cette contrainte, les plantes ont développé un ensemble de réponses adaptatives visant à améliorer leur efficacité de prélèvement. Une des plus spectaculaires concerne la prolifération des racines latérales dans les zones du sol riches en nitrate.

Afin de caractériser les événements physiologiques et moléculaires impliqués dans le contrôle du développement racinaire par le nitrate, nous avons mis au point un dispositif de culture en « split-root » *in vitro* chez *Arabidopsis thaliana*. Ce système de culture permet d'une part d'analyser finement, en cinétique, le développement racinaire en réponse à un apport localisé en NO_3^- et d'autre part de disposer de matériel végétal pour réaliser des analyses d'influx d'azote ou des analyses moléculaires.

Mots clés : Développement racinaire adaptatif, *Arabidopsis thaliana*, transporteur de nitrate, « split-root » *in vitro*.

Introduction

L'azote est un macroélément indispensable chez les végétaux, représentant de 1 à 6 % de la matière sèche totale. Une des particularités de l'azote est d'être disponible sous plusieurs formes pour la nutrition des plantes : formes minérales telles que le nitrate (NO_3^-) et l'ammonium (NH_4^+), mais aussi organiques (acides aminés). Chez les plantes herbacées non symbiotiques, le NO_3^- est la principale source d'azote du sol. Une des contraintes environnementales les plus fortes que doivent affronter les végétaux est liée aux fluctuations temporelles et spatiales très marquées de la disponibilité en NO_3^- du sol. La concentration locale de cet ion au voisinage des racines peut en effet varier de plusieurs ordres de grandeur (de quelques μM à quelques mM , Crawford et Glass, 1998). Pour y faire face, les végétaux ont développé une panoplie de réponses adaptatives, basées à la fois sur une grande flexibilité métabolique et sur une plasticité morphologique importante. Une carence en azote provoque entre autre : (i) une stimulation de l'efficacité de l'absorption racinaire d'azote, liée à l'activité accrue de système d'absorption spécifique à forte affinité pour ces ions (Lejay *et al.*, 1999 ; Forde, 2000 ; Cerezo *et al.*, 2001 ; Orsel *et al.*, 2002); et (ii) de profondes modifications de la taille et de l'architecture du système racinaire, dues en particulier à un développement accru de racines latérales qui permet d'augmenter le volume de sol exploré par la plante (Drew, 1975 ; Stitt, 1999 ; Zhang et Forde, 2000 ; Tranbarger *et al.*, 2003).

Concernant le développement des racines, le nitrate a deux effets antagonistes (Zhang *et al.* 1999) : l'élongation des racines latérales est localement stimulée par le NO_3^- , alors que

¹ Inra Unité de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes – équipe Intégration des fonctions nutritives, 2 Place Pierre Viala, 34060 Montpellier Cedex 2

✉ pervent@supagro.inra.fr ✉ nacry@supagro.inra.fr (responsable scientifique)

l'émergence de nouvelles racines latérales est au contraire réprimée de manière systémique (signaux provenant des parties aériennes) par une alimentation azotée non limitante. La balance entre ces deux effets, étroitement dépendante du statut nutritionnel de la plante et des concentrations externes locales en NO_3^- , permet à la plante d'explorer spécifiquement les zones riches en cet ion (la présence de NO_3^- dans ces zones provoque une prolifération locale de racines latérales si la plante est en situation de contrainte nutritionnelle). Cette réponse morphologique, associée à la stimulation de prélèvement de NO_3^- par les racines bénéficiant de l'apport localisé, est sans doute à la base de la capacité des plantes à exploiter les zones du sol riches en N.

La technique développée ici permet donc de mettre en évidence l'effet d'un traitement localisé sur une partie du système racinaire et le cas échéant, de caractériser les modifications physiologiques et moléculaires induites sur l'autre partie du système racinaire.

1. Le *split-root* : une technique utilisée pour tester l'effet d'un traitement localisé

La réalisation des traitements de carence localisée fait appel à l'utilisation du dispositif expérimental dit de « *split-root* », impliquant la séparation du système racinaire de la plante en deux parties, positionnées respectivement sur deux compartiments différents. Plusieurs systèmes de culture en « *split-root* » ont été décrits et largement utilisés mais, ces différents systèmes présentent un certain nombre d'inconvénients.

Drew (1975) a développé sur sol un « *split-root* vertical » (l'hétérogénéité spatiale du milieu de culture est verticale), permettant d'analyser le système racinaire des plantes en dispositif stratifié avec 2 ou 3 zones. Ce système, récemment adapté à la culture *in vitro* (Zhang et Forde, 1998) a très largement été utilisé mais ne permet pas une comparaison rigoureuse du développement racinaire entre les 3 strates au sein d'une même plante car la racine primaire rencontre successivement les trois strates et les racines latérales ont des âges différents.

Parallèlement, un « *split-root* horizontal » (l'hétérogénéité spatiale du milieu de culture est horizontale) en système de culture hydroponique a été développé (Tillard *et al.*, 1998). Ce système ne peut être utilisé dans le cas de jeunes plantes ayant un système racinaire de type pivotant (une seule racine séminale) et d'autre part, il ne permet pas de réaliser des analyses architecturales (i) en cinétique à cause des mouvements dus aux déplacements des racines dans la solution nutritive et (ii) détaillées à cause d'un chevelu racinaire rapidement trop important.

Pour pallier à ces différents inconvénients, nous avons développé un dispositif de « *split-root* horizontal » *in vitro* permettant l'étude comparative de deux racines du même âge et de même statut et de travailler sur un support gélosé permettant de réaliser des analyses architecturales détaillées du système racinaire. Il permet donc d'une part d'analyser finement la chronologie de la réponse du développement racinaire et d'autre part, de réaliser des mesures de prélèvement de NO_3^- (marquage ^{15}N) ou d'étudier l'expression de gènes par RT-PCR quantitative à partir des différents tissus récoltés.

2 Mise en œuvre d'un dispositif de *split-root* horizontal *in vitro*

Arabidopsis thaliana a un système racinaire de type pivotant. Afin d'obtenir deux racines latérales, la racine primaire de plantules cultivées *in vitro* sur boîtes maintenues en position verticale est sectionnée. Les plantes ainsi traitées sont transférées sur un milieu nutritif hétérogène en prenant soin de positionner les deux racines sur les différents compartiments (figure 1).

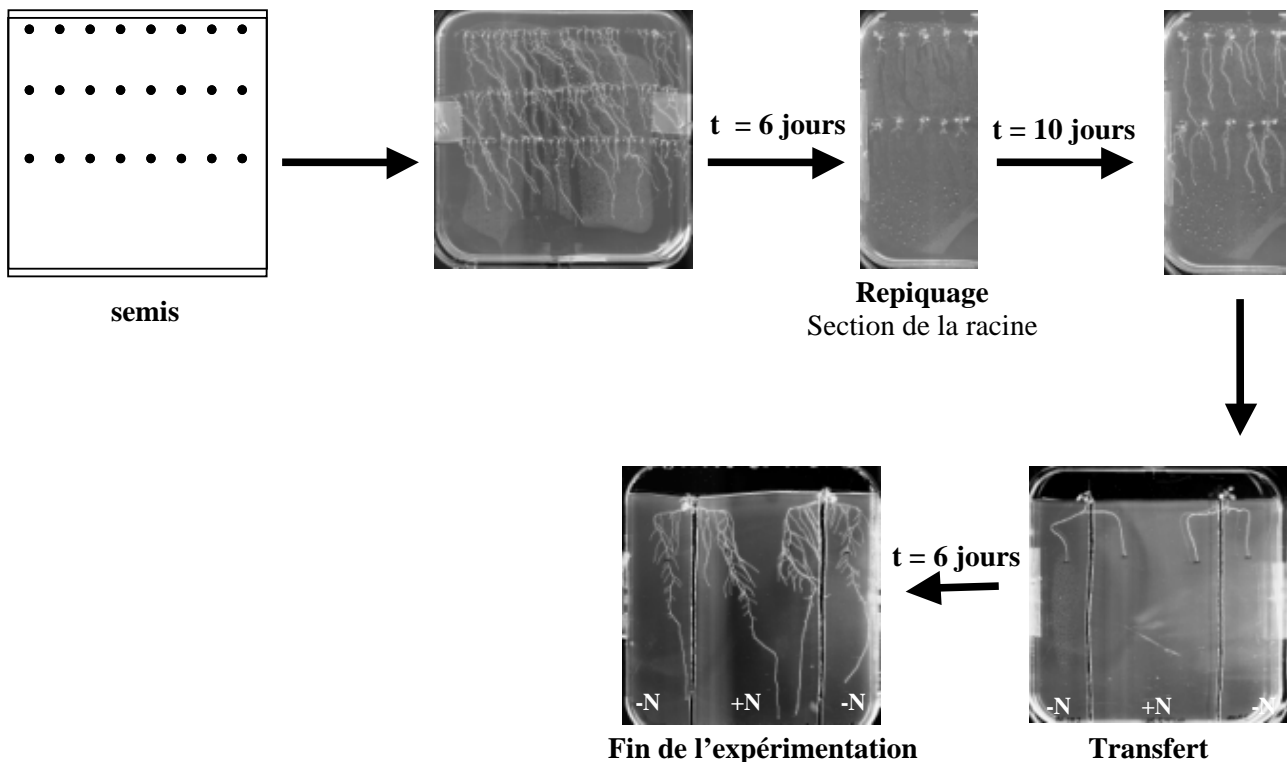


Figure 1 : Procédure expérimentale

2.1 Mise en culture préalable

Les graines sont stérilisées dans une solution de Bayrochlor (Bayrol, Planegg, Allemagne) 4% [p/v] et d'éthanol 50% [v/v] pendant 10 min. Après trois rinçages rapides à l'éthanol absolu, les graines sont séchées quelques heures sous une hotte à flux laminaire. Les graines stériles sont semées individuellement dans des boîtes de Pétri de 12x12 cm contenant 40 ml de milieu gélosé.

Le milieu de culture de base utilisé contient 0,5 mM CaSO₄, 0,5 mM MgCl₂, 1mM KH₂PO₄, 2,5 mM MES (2-[morpholino]ethanesulphonic acid), 50 µM NaFeEDTA, 50 µM H₃BO₃, 12 µM MnCl₂, 1µM CuCl₂, 1µM ZnCl₂ et 0,03 µM NH₄Mo, 1% de Bacto™ Agar (Becton, Dickinson et Compagnie, Le Pont de Claix, France), pH 5,8.

Les semis sont ensuite vernalisés 48h à 4°C puis transférés en chambre de culture à ambiance contrôlée (16h d'éclairement ; 20°C ; 230 μmol de photons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) en position verticale.

Les plantes sont cultivées pendant 6 jours sur le milieu de base décrit précédemment puis la racine primaire de chaque plante est coupée au dessous de la seconde racine latérale à l'aide d'une lame de rasoir stérile. Les plantes sont alors repiquées sur le même milieu de culture pendant 4 jours afin de favoriser leur croissance.

2.2 Préparation des boîtes de Pétri en système *split-root*

Un volume de 40 ml de milieu de culture est coulé dans une boîte de Pétri (12x12 cm). Les boîtes sont mises à sécher pendant 1h. A l'aide d'un scalpel, une tranche de 1 cm environ est réalisée en haut de la boîte afin de faciliter le développement des parties aériennes. Deux tranchées verticales d'environ 0,2 cm sont effectuées de façon à obtenir trois compartiments mesurant respectivement 3 - 6 et 3 cm.

Une solution de nitrate de concentration déterminée est étalée à l'aide d'un étaleur dans la bande centrale puis une solution de K_2SO_4 (pour maintenir une concentration en K^+ équivalente dans les deux compartiments) est étalée sur les tranches de 3 cm. Les boîtes sont stockées pendant plusieurs heures avant utilisation afin de permettre la diffusion des solutions étalées.

2.3 Transfert des plantes en *split-root*

Les plantes préparées comme décrit précédemment (§ 2.1) sont sélectionnées. Les racines latérales supplémentaires apparues sont éliminées afin de ne laisser que deux racines latérales de même longueur par plante.

Les plantes ne présentant pas deux racines latérales de même longueur sont éliminées. En conséquence, il faut prévoir au moins 2 à 3 fois plus de plantes que le nombre nécessaire pour l'expérimentation.

Au cours de l'expérimentation, il faut éliminer la condensation qui pourrait se former afin d'éviter l'accumulation d'eau au fond des boîtes ce qui entraînerait la diffusion d'ions entre les différents compartiments.

2.4 Acquisition et traitement des données morphologiques

Les boîtes de culture sont numérisées quotidiennement à l'aide d'un scanner selon les paramètres suivants : « Black and White Photo (16-bit) », « 300 dpi » pour la résolution de l'image.

L'analyse des images obtenues est réalisée à l'aide du logiciel Optimas 6.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Celui-ci permet de mesurer manuellement ou de façon semi-automatique la longueur des racines. Différentes variables quantitatives telles que la longueur et la vitesse de croissance des racines latérales d'ordre 1 et d'ordre 2, la longueur de la zone ramifiée et de la zone non ramifiée, le nombre de racines latérales et la densité de racines latérales d'ordre 2 peuvent être ainsi mesurées et/ou calculées. Au total, dix-huit variables peuvent être traitées à partir de cette analyse (**tableau 1**).

	lg rac RL1	lg zn non ram	lg zn néof	lg zn avt rep	nb rac lat zn néof	nb rac lat avt rep	nb rac lat tot	lg tot rac lat avt rep	lg tot rac lat zn néof
ws 0,05mM	12,21	4,85	8,54	3,67	15	15	30	19,6	7,56
ws 10mM	11,99	4,6	8,63	3,36	19	17	36	31,06*	10,26*
chl1-10 0,05mM	11,56	4,48	7,48	4,09	12	16	28	16,47	4,51
chl1-10 10mM	11,81	4,7	8	3,81	14	15	29	21,75	5,7

	dens	dens zn ram	dens zn néof	lg moy lat	lg tot rac lat	lg moy lat zn rep	lg moy lat zn néof	Vit rac RL1	Vit rac RL2
ws 0,05mM	2,43	4,07	1,71	0,91	27,15	1,32	0,5	1	0,15
ws 10mM	3	4,86	2,25	1,15*	41,32*	1,88*	0,54	1,2	0,27*
chl1-10 0,05mM	2,4	3,95	1,64	0,75	20,98	1,05	0,36	1,1	0,19
chl1-10 10mM	2,42	4,01	1,73	0,95	27,45	1,46	0,41	1,15	0,20

Tableau 1 : Exemple de variables mesurées et calculées à partir du traitement des données morphologiques ($n=10$ plantes).
Pour des raisons de clarté dans la lisibilité du tableau, les écart-types ne sont pas représentés ici. Les cellules grisées correspondent aux variables qui sont affectées en réponse au traitement chez le sauvage et le mutant. *: valeur significativement différente.

lg rac RL1 = longueur de la racine latérale d'ordre 1 (en cm)

lg zn non ram = longueur de la zone non ramifiée (en cm)

lg zn néof = longueur de la zone néoformée (en cm)

lg zn avt rep = longueur de la zone avant repiquage en *split-root* (en cm)

nb RL2 zn néof = nombre de racines latérales d'ordre 2 dans la zone néoformée après le repiquage en *split-root*

nb RL2 avt rep = nombre de racines latérales d'ordre 2 dans la zone avant repiquage en *split-root*

nb tot RL2 = nombre total de racines latérales d'ordre 2

lg tot rac lat avt rep = longueur totale des racines latérales dans la zone avant repiquage (en cm)

lg tot rac lat zn néof = longueur totale des racines latérales dans la zone néoformée (en cm)

dens = densité de racines latérales (racines cm^{-1})

dens zn ram = densité de racines latérales dans la zone ramifiée (racines cm^{-1})

dens zn néof = densité de racines latérales dans la zone néoformée (racines cm^{-1})

lg moy RL2 = longueur moyenne des racines latérales d'ordre 2 (en cm)

lg tot RL2 = longueur totale des racines latérales d'ordre 2 (en cm)

lg moy RL2 zn rep = longueur moyenne des racines latérales d'ordre 2 dans la zone de repiquage (en cm)

lg moy RL2 zn néof = longueur moyenne des racines latérales d'ordre 2 dans la zone néoformée (en cm)

vit RL1 = vitesse de croissance de la racine latérale d'ordre 1 (en cm j^{-1})

vit RL2 = vitesse de croissance des racines latérales d'ordre 2 (en cm j^{-1})

2.5 Exemple de résultats

Une étude fine de l'architecture du système racinaire a ainsi montré que les plantes sauvages privilégient le développement des racines latérales dans la zone du milieu riche en nitrate. La longueur totale des racines latérales y est en effet 3 à 4 fois plus importante que dans la zone pauvre en nitrate, après seulement 4 à 5 jours de nutrition hétérogène. Chez les plantes mutantes déficientes pour le transporteur de nitrate NRT1.1, cette réponse adaptative est fortement atténuée, essentiellement du fait d'une élévation limitée des racines latérales par rapport au sauvage (**figure 2**) (Remans *et al.*, 2006).

Par contre, la croissance de ces racines latérales reste identique entre le sauvage et le mutant cultivés en conditions témoin (10mM/10mM de NO_3^-).

Ce système de *split-root* simplifié, permet donc de quantifier le phénotype du mutant de façon rapide, et d'étudier le développement du système racinaire en parallèle dans les deux compartiments.

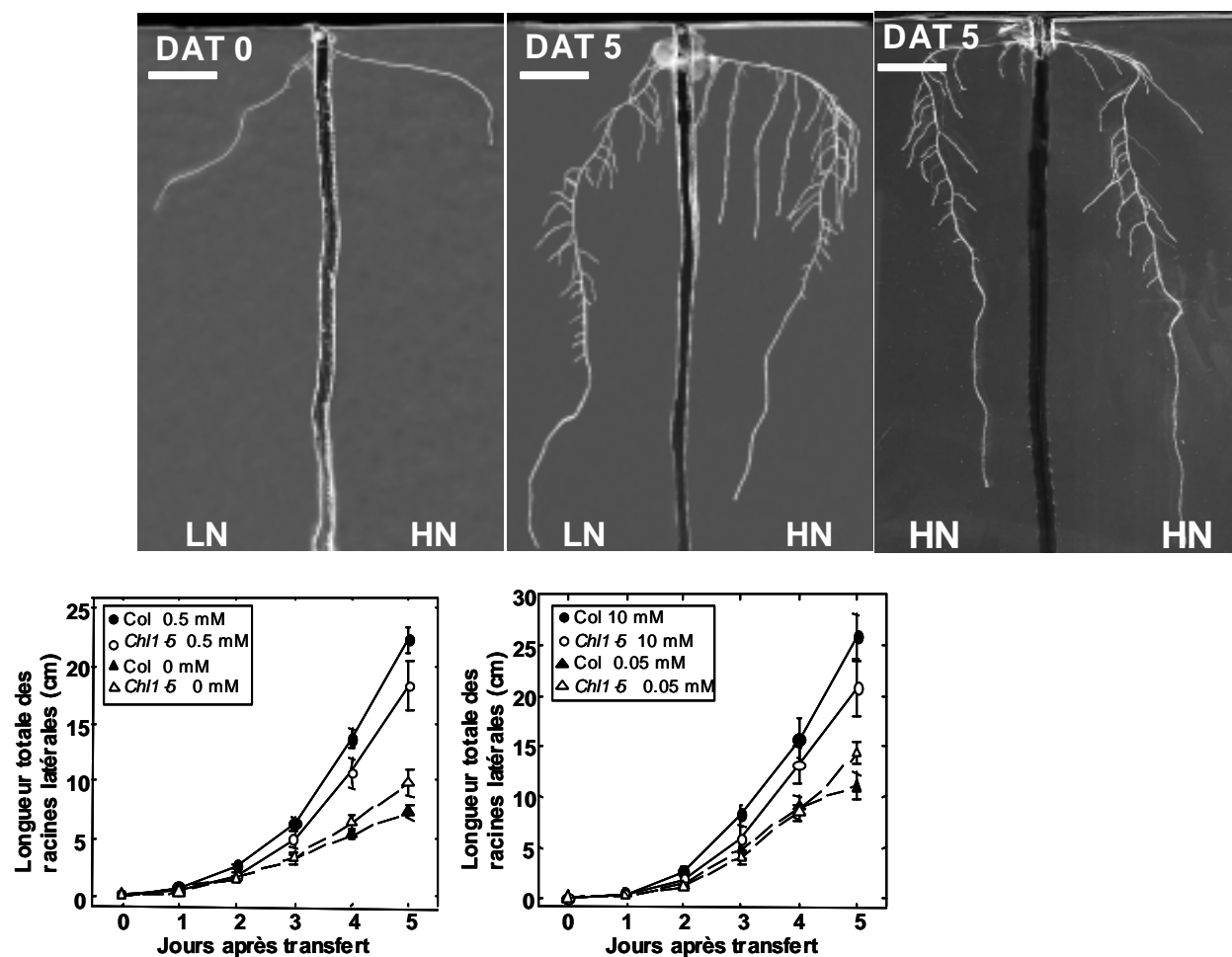


Figure 2 : Analyse cinétique du développement racinaire en condition de «split-root» (Remans *et al.*, 2006). Les plantes ont été cultivées pendant 10 jours sur 0,5mM ou 10mM de NO_3^- puis transférées pendant 5 jours en condition de «split-root» avec deux racines latérales positionnées dans des zones contenant respectivement 0 et 0,5mM (LN) ou 0,5 et 10mM de NO_3^- (HN). Différents paramètres ont été quantifiés au cours de la cinétique de 5 jours, seule la longueur totale des latérales d'ordre 2 (cm) est représentée. Les barres verticales représentent l'erreur standard (n=10).

Conclusion

La réponse architecturale des plantes à un apport localisé de nitrate nous a conduits à développer un système de « *split-root* » *in vitro* permettant de quantifier cette réponse adaptative. Cette technique nous a permis de décrire finement la réponse de l'architecture du système racinaire à une carence en nitrate et de cibler les mécanismes physiologiques impliqués : modification de l'élongation des racines latérales d'ordre 2 et de focaliser l'analyse moléculaire sur cet élément clé du développement.

Bibliographie

- Cerezo M., Tillard P., Filleur, S., Munos S., Daniel-Vedele F. and Gojon A. (2001) Major alterations of the regulation of root NO_3^- uptake are associated with the mutation of Nrt2.1 and Nrt2.2 genes in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 127, 262-71.
- Crawford N.M. and Glass A.D.M. (1998) Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Plant Sci.*, 3, 389-395.
- Drew M.C. (1975) Comparison of the effects of a localized supply of phosphate, nitrate, ammonium and potassium on the growth of the seminal root system, and the shoot, in barley. *New Phytol.*, 75, 479-490.
- Forde B.G. (2000) Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1465, 219-235.
- Lejay L., Tillard, P., Lepetit M., Olive F., Filleur S., Daniel-Vedele F. and Gojon A. (1999) Molecular and functional regulation of two NO_3^- uptake systems by N- and C-status of Arabidopsis plants. *Plant J.*, 18, 509-519.
- Orsel M., Krapp A. and Daniel-Vedele F. (2002) Analysis of the NRT2 Nitrate Transporter Family in Arabidopsis. Structure and Gene Expression. *Plant Physiol.*, 129, 886-96.
- Remans T., Nacry P., Pervent M., Filleur S., Dialoff E., Mounier E., Tillard P., Forde. B. and Gojon A. (2006). The Arabidopsis NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *PNAS*, 50, 19206-19211.
- Stitt M. (1999) Nitrate regulation of metabolism and growth. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2, 178-186.
- Tillard P., Passama L. and Gojon A. (1998). Are phloem amino acids involved in the shoot to root control of NO_3^- uptake in *Ricinus communis* plants?. *J Exp Bot*, 49, 1371-1379.
- Tranbarger T., Al-Ghazi Y., Teyssendier de la Serve B., Muller B., Dumas P. and Touraine B. (2003) Transcription factor genes with expression correlated to nitrate related root plasticity of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Environ*, 26, 459-469.
- Zhang H. and Forde B. (1998) An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science*, 279, 407-409.
- Zhang H., Jennings A., Barlow P. and Ford B. (1999) Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 6529-6534.
- Zhang H. and Forde B. (2000) Regulation of Arabidopsis root development by nitrate availability. *J Exp Bot*, 51, 51-59.

