

Introduction.....	1
A. Le nitrate, un anion essentiel pour le développement de la plante .....	2
1. Le nitrate, un macroélément essentiel à la croissance des plantes .....	2
a) Le nitrate, un nutriment majeur pour le développement des plantes.....	2
b) La disponibilité du nitrate est sujette à de fortes variations spatio-temporelles dans le sol ..	3
c) L'application de fertilisants azotés pour maximiser la quantité de nitrate utilisable par la plante .....	5
2. Le prélèvement du nitrate par la plante et son transport.....	7
a) Des stratégies pour prélever efficacement le nitrate dans le sol .....	7
b) Le transport du nitrate dans la plante.....	9
3. Les rôles du nitrate dans la cellule végétale.....	11
a) Un nutriment assimilable .....	11
b) Une molécule de signalisation.....	13
4. Le stockage vacuolaire du nitrate, un double rôle nutritif et osmotique .....	14
a) La vacuole des cellules végétales, un compartiment central aux rôles multiples .....	14
b) Le stock vacuolaire, une réserve de nitrate assimilable .....	17
c) Le stock vacuolaire de nitrate, un rôle osmotique .....	18
B. L'acteur principal du stockage de nitrate vacuolaire : AtClCa .....	19
1. Clonage et caractérisation d'un membre des ClCs : AtClCa .....	19
a) Identification d'un transporteur impliqué dans l'homéostasie du nitrate : AtClCa.....	19
b) Localisation et caractérisation fonctionnelle d'AtClCa .....	20
2. AtClCa est essentiel pour l'homéostasie hydrique de la plante .....	22
a) La cellule de garde, un modèle d'étude des phénomènes osmotiques .....	22
b) Le rôle d'AtClCa dans l'homéostasie hydrique.....	24
3. Régulation du transport chez AtClCa .....	25
a) Le fonctionnement d'AtClCa nécessite un couplage avec les pompes à protons vacuolaires.....	25
b) La fixation d'ATP impacte le fonctionnement d'AtClCa.....	26

## Table des matières

---

c) La modulation de l'activité d'AtClCa par phosphorylation .....	27
C. Les ClCs, une famille de protéines conservées au sein du vivant .....	28
1. Les ClCs, découverte et élucidation de leur structure .....	28
a) Historique de la découverte des ClCs .....	28
b) Topologie des ClCs .....	28
c) La structure des ClCs à l'origine de leur sélectivité et gating .....	30
d) L'identification du premier ClC échangeur et le « mystère » du switch mécanistique	32
2. Identification de résidus essentiels au couplage proton/anion chez les ClCs échangeurs	
33	
a) Des résidus conservés impliqués dans le couplage des ClCs .....	33
b) Hypothèses actuelles sur le cycle de transport des ClCs .....	36
c) Le canal, un échangeur dysfonctionnel ? .....	38
3. Les ClCs, des échangeurs ou des canaux ? .....	39
a) Les ClCs procaryotes .....	40
b) Les ClCs des mammifères .....	41
c) Les ClCs chez les plantes .....	41
D. Objectif du travail de thèse .....	45
Chapitre I : Conséquences physiologiques d'une mutation du gating glutamate chez AtClCa .....	48
A. Physiological importance of the exchange mechanism conservation in AtClCa, a nitrate/proton vacuolar transporter in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	49
B. Résultats complémentaires .....	89
1. Recherche de conditions permettant une complémentation de la teneur en nitrate chez <i>AtClCa<sub>E203A</sub></i> .....	89
a) La sous-accumulation du nitrate chez les plantes surexprimant <i>AtClCa<sub>E203A</sub></i> est conservée quelle que soit la teneur en nitrate dans le milieu de culture .....	89
a) La photopériode n'impacte pas le stockage du nitrate chez les plantes surexprimant <i>AtClCa<sub>E203A</sub></i> .....	92
2. La perturbation des mouvements stomatiques est-elle nitrate-dépendante ? .....	94
3. Impact du profil d'expression d' <i>AtClCa<sub>E203A</sub></i> sur les phénotypes observés .....	96
4. La mutation E203A, une mutation gain de fonction ? .....	97

## Table des matières

---

C. Discussion complémentaire .....	99
Chapitre II : Conséquences physiologiques d'une mutation du proton glutamate chez AtCICa .....	102
A. Obtention de plantes mutées pour le proton glutamate.....	103
1. Analyse de l'expression de la forme mutée par RT-qPCR .....	103
2. Impact de la mutation <i>AtCICa<sub>E270A</sub></i> sur la production de matière fraîche par les plantes	
104	
B. Conséquences de la mutation E270A sur l'homéostasie nitrate .....	105
1. Impact de la mutation E270A sur la teneur en nitrate après une culture <i>in vitro</i> .....	105
2. Impact de la mutation du proton glutamate sur la teneur en nitrate après culture en	
hydroponie.....	106
C. Conséquence de la mutation E270A sur l'homéostasie hydrique .....	107
D. Discussion des résultats .....	109
Matériel et méthodes .....	111
A. Génération des différents mutants.....	112
B. Conditions de culture des plantes .....	113
1. Culture <i>in vitro</i> .....	113
2. Culture en serre.....	114
Références.....	121

**Liste des figures**

Figure 1 : Effet de la teneur en nitrate sur la production de biomasse et le rendement en graines chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	3
Figure 2: Représentation simplifiée du cycle de l'azote à l'interface atmosphère-sol-plante .....	4
Figure 3: Evolution du rendement en graines et de la lixiviation du nitrate chez le maïs en réponse à un taux de fertilisation azoté croissant .....	6
Figure 4 : Représentation schématique des transporteurs impliqués dans le prélèvement du nitrate au niveau racinaire chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	8
Figure 5: Représentation schématique du prélèvement du nitrate et de son transport entre les organes sources et puits.....	10
Figure 6: Représentation schématique de l'assimilation du nitrate et sa régulation dans la cellule végétale .....	12
Figure 7: Représentation schématique de la pluralité fonctionnelle de la vacuole des cellules végétales et des transporteurs impliqués .....	16
Figure 8 : Contenu en anion chez les mutants KO pour AtClCa déterminé par électrophorèse capillaire ou dosage colorimétrique.....	20
Figure 9: Localisation de l'expression d'AtClCa à l'échelle subcellulaire, tissulaire ou de l'organe. ....	21
Figure 10: Vue d'ensemble des flux d'ions impliqués dans les mouvements stomatiques .....	23
Figure 11: Localisation de l'expression d'AtClCa par une analyse histochimique GUS dans les cotylédons et les feuilles matures chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	24
Figure 12: Réponse à la déshydratation des rosettes et fermeture stomatique induite par l'ABA chez <i>cica-2</i> , WS et le KO complémenté avec AtClCa .....	25
Figure 13: Représentation schématique des différents modes de régulation de l'activité d'AtClCa chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	27
Figure 14: Structure de ClC-ec1 vue depuis la face extracellulaire .....	29
Figure 15: Structure d'une sous unité du CmClC représentant les domaines CBS et agrandissement de l'interface entre le domaine transmembranaire et le domaine CBS .....	30
Figure 16: Représentation schématique de la localisation des trois résidus majeurs impliqués dans le couplage Cl <sup>-</sup> /H <sup>+</sup> chez ClC-ec1.....	31
Figure 17: Représentation de la voie de transport des ions et de l'accessibilité à la solution interne chez ClC-ec1 .....	35
Figure 18: Modèle de transport chez les échangeurs ClCs .....	37
Figure 19: Représentation schématique des événements pouvant conduire au switch mécanistique entre échangeur et canal chez les ClCs .....	38

## Table des illustrations

---

Figure 20: Dendrogramme représentant les degrés de similarité entre les membres de la famille des ClCs .....	40
Figure 21: Localisation subcellulaire des ClCs chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	42
Figure 22: La mutation du gating glutamate engendre une diminution de la teneur en nitrate endogène .....	90
Figure 23: : Les plantes surexprimant <i>AtClCa<sub>E203A</sub></i> n'accumulent plus le nitrate en conditions limitantes .....	91
Figure 24: La déplétion en nitrate chez les plantes surexprimant <i>AtClCa<sub>E203A</sub></i> n'est pas modifiée en jours longs.....	93
Figure 25: La déplétion en nitrate chez plantes surexprimant <i>AtClCa<sub>E203A</sub></i> n'est pas modifiée en jours continus.....	94
Figure 26: Les plantes surexprimant <i>AtClCa<sub>E203A</sub></i> ne complémentent pas le défaut d'ouverture stomatique observé chez <i>clca-2</i> en présence de nitrate.....	95
Figure 27: Les plantes surexprimant <i>AtClCa<sub>E203A</sub></i> ne complémentent pas le défaut de fermeture stomatique observé chez <i>clca-2</i> en présence de nitrate.....	96
Figure 28: Niveau d'expression d'AtClCa chez les lignées transgéniques <i>clca-2/pmyb60:AtClCa</i> et <i>clca-2/pmyb60:AtClCa<sub>E203A</sub></i> .....	97
Figure 29: Niveau d'expression d'AtClCa chez les lignées transgéniques <i>WS/35S:AtClCa<sub>E203A</sub></i> et <i>WS/35S:AtClCa</i> .....	98
Figure 30: Niveau d'expression d'AtClCa chez les lignées transgéniques <i>clca-2/35S:AtClCa<sub>E270A</sub></i> .....	103
Figure 31: Masses fraîches des rosettes de plantes exprimant <i>AtClCa<sub>E270A</sub></i> sous le contrôle du promoteur 35S .....	104
Figure 32: La mutation du proton glutamate ne complémente pas le phénotype sauvage pour les contenus en nitrate endogène après culture <i>in vitro</i> .....	106
Figure 33: La mutation du proton glutamate engendre une diminution de la teneur en nitrate endogène après culture en hydroponie .....	107
Figure 34: L'expression d'AtClCa muté pour le proton glutamate ne complémente pas le phénotype de <i>clca-2</i> pour le contenu en eau.....	108
Figure 35: Modification du vecteur pH2GW7.0 afin d'introduire le promoteur stomate : <i>pmyb60</i> .....	113

## Liste des tableaux

Tableau 1: Vue d'ensemble de la localisation, du mode de transport et de la conservation des résidus importants chez les ClCs d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	43
Tableau 2 : Milieu Hoagland modifié adapté pour modifier la teneur en nitrate .....	114

# Introduction

La croissance des végétaux requiert la présence d'éléments dits essentiels, c'est à dire participant à la constitution de molécules fondamentales ou au métabolisme. Un approvisionnement insuffisant en éléments essentiels provoque de graves problèmes de croissance, développement ou reproduction tels que la chlorose des feuilles ou l'apparition de zones nécrosées. Pour la plupart, ces éléments sont prélevés dans le sol, ils sont couramment divisés en macronutriments et micronutriments. Les macronutriments sont les plus abondants au niveau tissulaire et, parmi eux, l'azote est l'élément requis en plus grande quantité par la plante.

### A. Le nitrate, un anion essentiel pour le développement de la plante

#### 1. Le nitrate, un macroélément essentiel à la croissance des plantes

##### a) Le nitrate, un nutriment majeur pour le développement des plantes

L'azote est découvert en 1772 par D. Rutherford, c'est un élément essentiel à la constitution des molécules du vivant, comme les acides aminés, les protéines ou les chlorophylles (Crawford, 1995). Chez les végétaux, la disponibilité en azote conditionne la production de matière aux différents stades de leur développement. Lors du stade végétatif, un approvisionnement croissant en nitrate, qui est la forme directement utilisable par la plante en conditions aérobies, engendre une plus forte production de masse fraîche foliaire chez de nombreuses espèces (Brouwer, 1962; Chen *et al.*, 2004; Lemaître *et al.*, 2008) (Figure 1) et donc une augmentation du ratio feuille/racine. Cette croissance accrue s'explique par un effet direct sur le métabolisme azoté mais aussi indirect car l'homéostasie azoté et hydrique sont en interaction. Un fort approvisionnement en azote accroît notamment la sensibilité des plantes à la sécheresse et la conductance stomatique (Cramer *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2016; Shangguan *et al.*, 2000). Au-delà d'une croissance optimale, une inhibition de croissance est observée en raison d'une toxicité due à la présence excessive d'azote (Chen *et al.*, 2004; Vitousek, 2009). Lors de la phase reproductive, un fort approvisionnement en azote provoque une augmentation du rendement en graine mais ceci au détriment de la teneur en protéine (Figure 1) (Chope *et al.*, 2014; Miller, 1939).

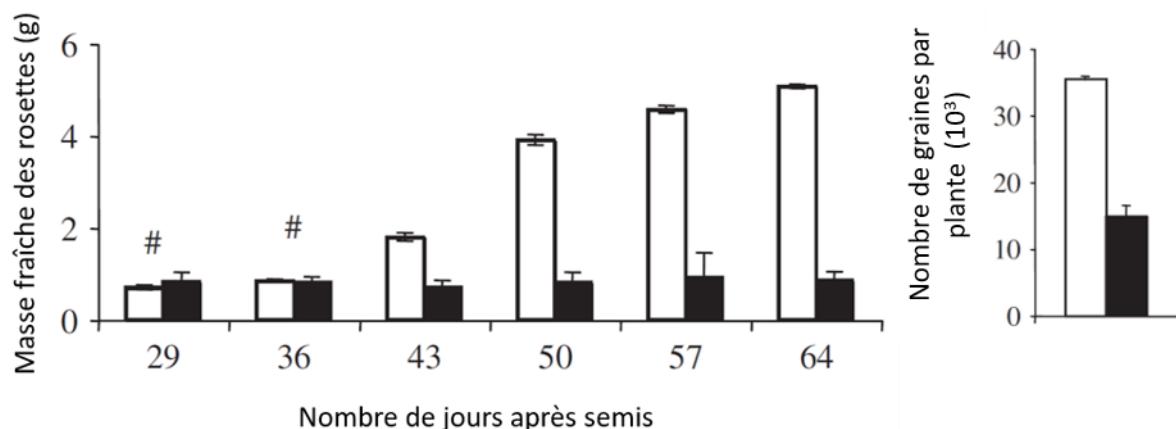


Figure 1 : Effet de la teneur en nitrate sur la production de biomasse et le rendement en graines chez *Arabidopsis thaliana* cultivée sur sol en jours courts (barres blanches : 10 mM ; barres noires 2 mM) (Modifié d'après (Lemaître *et al.*, 2008)).

Lors de l'établissement d'une carence en azote chez *Arabidopsis thaliana*, on observe une diminution de la croissance foliaire et racinaire dans une moindre mesure (ratio racine/feuille augmenté) et un plus grand nombre de racines latérales (Gruber *et al.*, 2013). Ceci peut être expliqué, d'une part, par une altération directe du métabolisme azoté, notamment par une inhibition des processus impliqués dans l'assimilation du nitrate (Schluter *et al.*, 2012; Krapp *et al.*, 2011) et, d'autre part, par un effet indirect sur le métabolisme carboné. En effet, l'assimilation du nitrate requiert la présence de pouvoir réducteur, d'ATP mais aussi de molécules carbonées issues de la photosynthèse (Stitt and Krapp, 1999; Oaks and Hirel, 1985; Møller *et al.*, 2011). Une carence azotée prolongée chez *Arabidopsis thaliana* induit une senescence foliaire précoce (Gregersen *et al.*, 2013; Guo and Gan, 2005) aboutissant notamment au recyclage des protéines en direction des organes puits, tels que les graines. Ceci se fait par dégradation des chloroplastes, dont le rôle est central pour l'assimilation azotée et la synthèse des acides aminés (Guiboileau *et al.*, 2010). Des conditions limitantes en azote favorisent donc la remobilisation de l'azote vers les graines augmentant ainsi leur teneur en protéine (Lemaître *et al.*, 2008; Chope *et al.*, 2014).

b) La disponibilité du nitrate est sujette à de fortes variations spatio-temporelles dans le sol

Dans le sol, la disponibilité du nitrate résulte de l'équilibre entre la production ou l'apport de celui-ci et sa dégradation ou perte. Ceci s'inscrit dans le cycle de l'azote au niveau du sol (Figure 2). La majeure partie de l'azote du sol est sous forme organique (Dechorganat *et al.*, 2011). Il peut, en

condition de faibles teneurs en azote, être utilisé directement par la plante, c'est le cas des acides aminés (Schimel and Bennett, 2004). Cependant, l'azote utilisable par les végétaux est majoritairement inorganique et est formé par minéralisation de l'azote organique en nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) et ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) grâce aux micro-organismes du sol. En condition aérobie, l'ammonium est converti par une oxydation appelée nitrification en nitrate, qui est la source d'azote inorganique dominante dans ces conditions. En condition de limitation en oxygène, un processus de dénitritification peut avoir lieu, l'azote est alors converti en  $\text{N}_2$  ou en  $\text{NO}$  et  $\text{N}_2\text{O}$  (Godde and Conrad, 2000). Enfin, la conversion de l'ammonium en ammoniac engendre un flux sortant par volatilisation. Ces conversions sont dépendantes des conditions environnementales, ainsi la forme azotée majoritairement présente peut varier d'un sol à un autre.

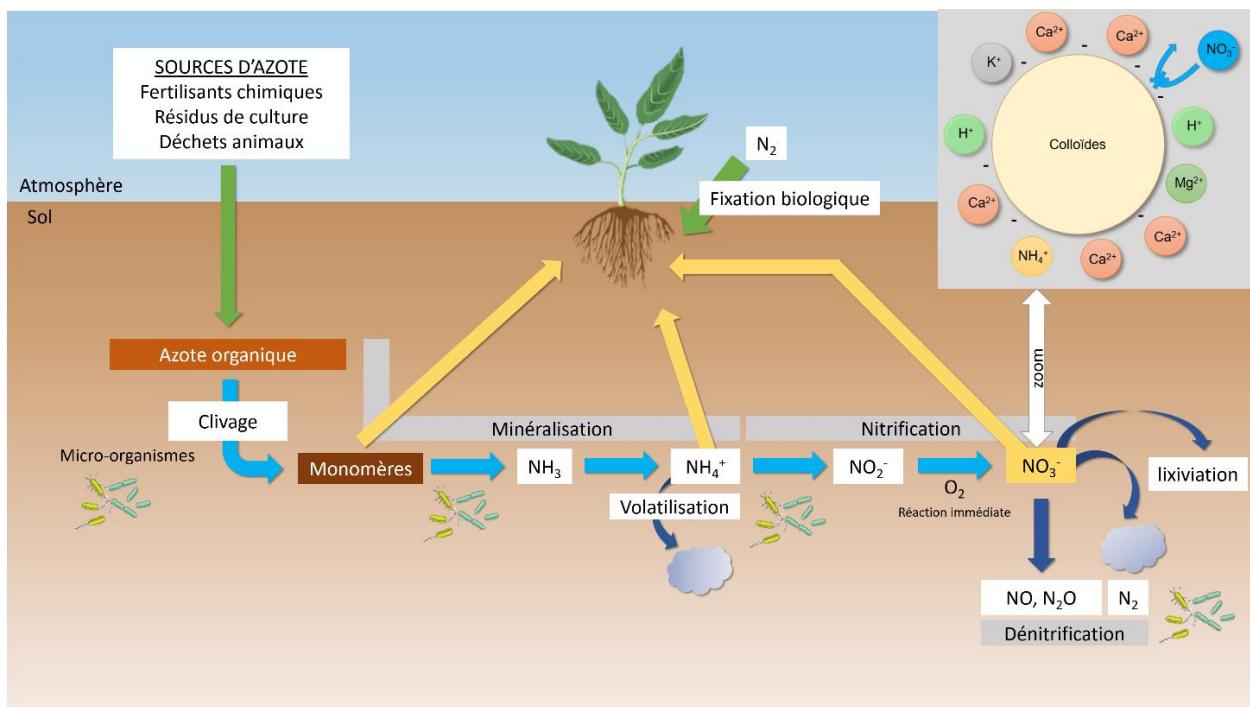


Figure 2: Représentation simplifiée du cycle de l'azote à l'interface atmosphère-sol-plante

Dans les sols oxygénés, le nitrate est la forme majoritaire d'azote mais sa concentration dans les sols est très variable. En effet, l'étude d'un transect à travers plusieurs parcelles révèle une variation d'un facteur 100 de la concentration en nitrate (Miller *et al.*, 2007; Lark *et al.*, 2004) et, de façon générale, plusieurs études montrent que la concentration est comprise entre quelques micro molaires et environ 20 mM (Dechorganat *et al.*, 2011). Cette concentration varie selon plusieurs paramètres tels que la teneur en eau, l'activité microbienne, le pH, la température et la disponibilité

en oxygène (Miller *et al.*, 2007). En plus des pertes de nitrate issues de la dénitrification (Figure 2), celui-ci est également sujet à une forte lixiviation dans le sol. En effet, le nitrate étant chargé négativement, il est faiblement adsorbé à la surface des complexes minéralogiques (Figure 2) présents dans le sol (Strahm and Harrison, 2006). Ainsi, en raison de la grande mobilité de cet anion dans le sol, la quantité de nitrate réellement utilisable par la plante pour sa croissance diffère de la concentration en nitrate du sol. La totalité du nitrate du sol n'est en réalité pas directement utilisable par la plante. Par conséquent, afin de maximiser les rendements, une application de fertilisants contenant de l'azote inorganique, notamment du nitrate, est effectuée.

c) L'application de fertilisants azotés pour maximiser la quantité de nitrate utilisable par la plante

Depuis le 20<sup>ème</sup> siècle, une quantité importante de fertilisants azotés est appliquée dans les champs afin de maximiser le rendement des cultures. L'efficacité d'utilisation de l'azote ou NUE (Nitrogen Use Efficiency) peut être exprimée comme le rapport entre le rendement en grain et la quantité d'azote apportée, notamment par les fertilisants. Si les fertilisants azotés favorisent le développement important de la canopée et donc optimise la photosynthèse ainsi que le rendement, cette relation entre fertilisation et rendement n'est pas linéaire (Figure 3) : un rendement optimal est atteint suivi par une décroissance du rendement en réponse à une application excessive d'engrais azotés (Hawkesford, 2014; Zhang *et al.*, 2015).

Chez les céréales, la NUE a été évaluée à environ 33%, ce qui suggère de fortes pertes de l'azote appliqué dues à une utilisation partielle. En effet, de façon concomitante à l'application de fertilisants, une fois le rendement maximal atteint, la quantité d'azote lixivié dans l'environnement augmente (Figure 3). Ceci engendre d'importantes pollutions des eaux extraites des nappes souterraines, une eutrophisation des eaux marines et douces (Sebilo *et al.*, 2013) et la production de N<sub>2</sub>O par réduction du nitrate, un gaz à effet de serre 300 fois plus puissant que le CO<sub>2</sub> (Yan *et al.*, 2014). La teneur en nitrate des eaux souterraines mais également des végétaux peut dépasser le seuil de consommation. Les plantes vertes, particulièrement consommées sont celles contenant le plus de nitrate. La laitue par exemple, contient 5000 à 6100 mg/kg de nitrate quand elle est cultivée sur un sol contenant un fertilisant azoté inorganique contre 1,391 mg/kg sans fertilisant

(Liu *et al.*, 2014). Le seuil de consommation acceptable en nitrate est actuellement fixé à 3,7 mg par kg et par jour par le Comité d'experts FAO/OMS sur les additifs alimentaires (JECFA). Au-delà de ce seuil, des effets néfastes ont été constatés sur la santé des nourrissons et la combinaison du nitrite avec des amines provoque la formation de nitrosamines connues comme cancérogènes (Mensinga *et al.*, 2003; Umar and Iqbal, 2007).

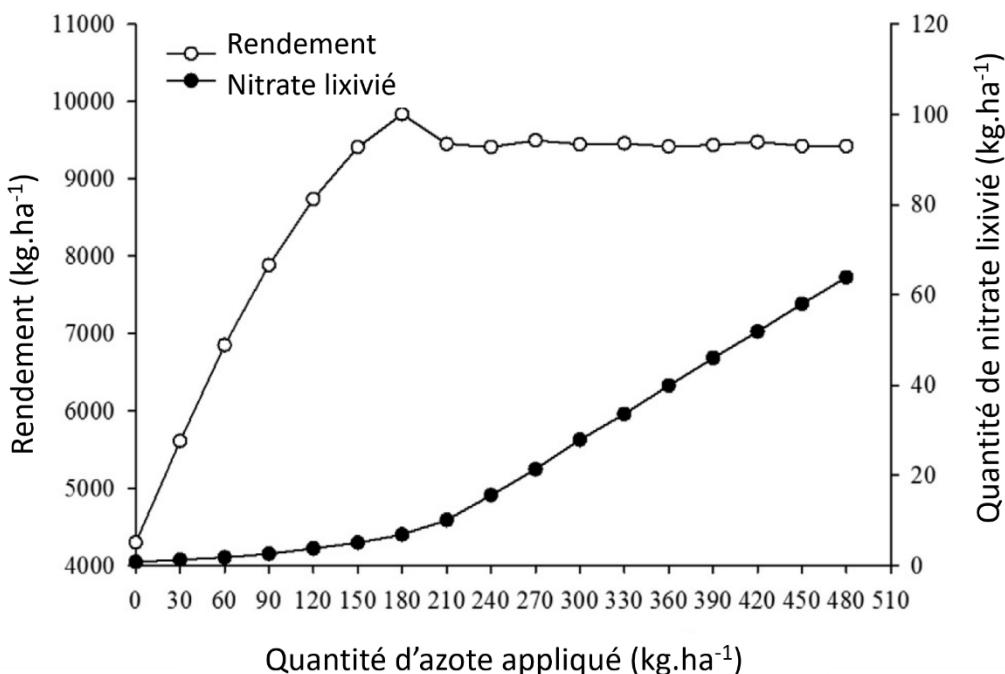


Figure 3: Evolution du rendement en graines et de la lixiviation du nitrate chez le maïs en réponse à un taux de fertilisation azoté croissant (modifié d'après (Zhang *et al.*, 2015)).

Le principal challenge actuellement est donc de maintenir un rendement correct en diminuant la lixiviation du nitrate. Une étude conduite sur du maïs cultivé en Chine a permis la mesure du rendement et de la quantité de nitrate lixivié en réponse à différents approvisionnements en fertilisants (Zhang *et al.*, 2015). Comme montré en figure 3, le plus fort rendement est obtenu pour 180 kg d'azote appliqué par hectare, ce qui ne correspond pas à la quantité maximale appliquée dans cette étude et permet une limitation de la quantité de nitrate lixivié (Zhang *et al.*, 2015). Un autre moyen de limiter la nécessité d'apport externe en azote est d'optimiser son prélèvement et son utilisation par les végétaux. Afin d'identifier de potentielles cibles pour l'amélioration des végétaux, des études transcriptomiques ont été effectuées ainsi que le ciblage de gènes identifiés comme impliqués dans les processus de prélèvement, d'assimilation et de stockage dans la

vacuole de l'azote (paragraphe A4) (Han *et al.*, 2016; Hawkesford, 2014). La manipulation génétique de ces acteurs pourrait conduire à une amélioration de l'efficacité d'utilisation de l'azote par les plantes et donc permettre une réduction de l'utilisation de fertilisants azotés. Récemment, des effets bénéfiques, bien que limités, ont été obtenus par surexpression de la nitrate ou nitrite reductase, deux enzymes clefs de l'assimilation azotée ainsi que de transporteurs de nitrate (Zhao *et al.*, 2013; Davenport *et al.*, 2015).

### 2. Le prélèvement du nitrate par la plante et son transport

#### a) Des stratégies pour prélever efficacement le nitrate dans le sol

En raison de la forte mobilité de l'ion nitrate, sa concentration dans le sol est sujette à de fortes variations spatiales (voir paragraphe 1b) (Miller *et al.*, 2007). Afin de croître en dépit de cette variation de disponibilité en nitrate, les végétaux ont développé différentes stratégies. L'une d'entre elles, est l'adaptation de l'architecture racinaire à la disponibilité en nitrate dans le sol. Des études effectuées notamment chez *Arabidopsis thaliana* montrent que la densité et la longueur des racines latérales changent en réponse à la quantité de nitrate dans le milieu (Hackett, 1972; Zhang and Forde, 2000; De Pessemier *et al.*, 2013; Tian *et al.*, 2014).

En plus de cela, les végétaux ont développé plusieurs types de transporteurs racinaires d'affinités différentes permettant l'ajustement du prélèvement à la teneur en nitrate du milieu extérieur (Wang *et al.*, 2018). Le prélèvement est assuré par un système à faible affinité (actif pour des teneurs en nitrate supérieures à 1 mM) et un système à forte affinité (pour des concentrations inférieures à 1 mM) (Dechorganat *et al.*, 2011). Le système de transport à faible affinité (LATS) inclut les membres de la famille NPF (Nitrate Transporter 1/Peptide), constitué de NPF6.3/NRT1.1 et NPF4.6/NRT1.2, exprimés au niveau du rhizoderme, et des poils et du cortex racinaires (Figure 4) (Huang *et al.*, 1999). Le système de transport à forte affinité (HATS) est constitué par les transporteurs NRT2 (NRT2.1, NRT2.2, NRT2.4 et NRT2.5). Les acteurs majeurs de ce système de transport sont NRT2.1 et NRT2.2 qui contribuent de façon prépondérante au prélèvement du nitrate avec une affinité importante en condition limitante (Tegeder and Masclaux-Daubresse, 2018). NRT2.1 est exprimé dans les racines matures au niveau de l'épiderme et du cortex et contribue à hauteur de 72% au système de transport à forte affinité, le reste étant dû à l'activité de

NRT2.2 (Dechorganat *et al.*, 2011; Filleur *et al.*, 2001). Enfin, NRT2.4 et 2.5 sont également des acteurs du système de transport à forte affinité, mais leur activité est déclenchée lors d'une carence azotée. NRT2.4 présente une affinité particulièrement forte pour le nitrate (Kiba *et al.*, 2012). Ils sont exprimés dans le rhizoderme de la zone pilifère, ainsi que le cortex pour NRT2.5, et participent donc à l'acquisition du nitrate directement à l'interface avec le sol (Lezhneva *et al.*, 2014; Kiba *et al.*, 2012). L'influx net de nitrate est la somme son influx et de son efflux, ce dernier est permis par le transporteur NAXT1 exprimé au niveau du cortex des racines (Segonzac *et al.*, 2007).

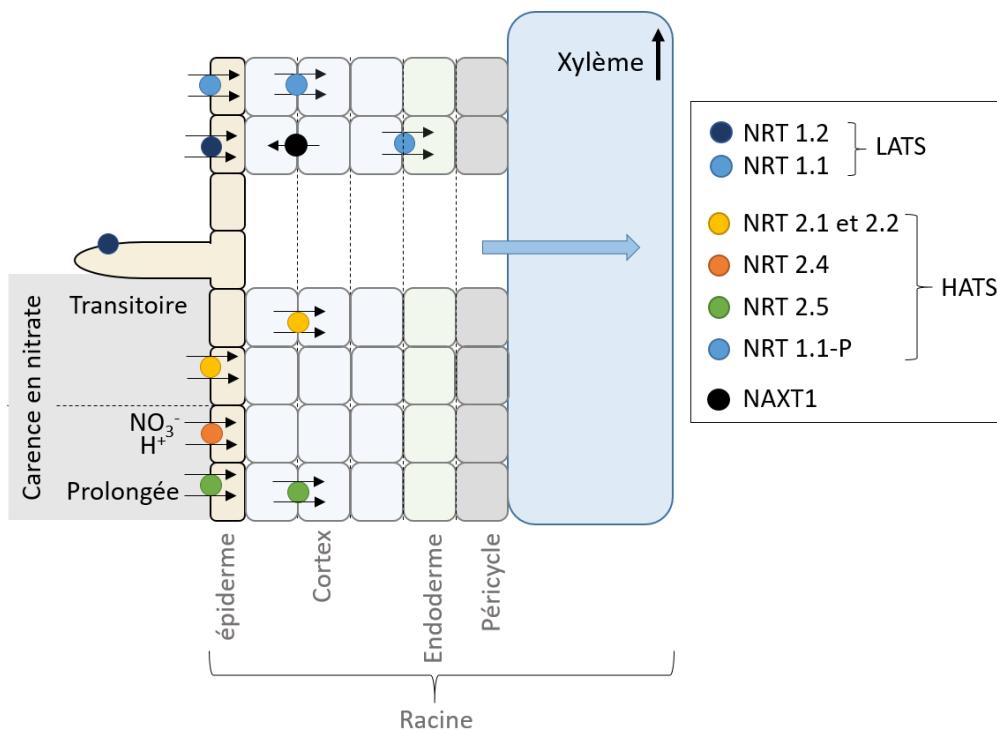


Figure 4 : Représentation schématique des transporteurs impliqués dans le prélèvement du nitrate au niveau racinaire chez *Arabidopsis thaliana* (modifié de (Noguero et Lacombe, 2016))

De façon intéressante, le transporteur NPF6.3/NRT1.1 (nitrate transporter 1/peptide) dispose d'un transport à faible affinité mais également à forte affinité selon les teneurs en nitrate dans l'environnement. Un tel switch d'affinité à lieu suite à la détection de la teneur en nitrate dans l'environnement (rôle de senseur) et à la phosphorylation du transporteur (Ho *et al.*, 2009). Quand AtNRT1.1 est phosphorylé, il devient un transporteur à haute affinité alors que déphosphorylé il transporte le nitrate avec une faible affinité (Liu and Tsay, 2003). Un tel système permet une adaptation rapide aux conditions externes et favorise le prélèvement du nitrate en cas de conditions limitantes, puisque son expression, près de la pointe racinaire dans le rhizoderme,

permet une acquisition par voie symplasmique du nitrate (Dechorganat *et al.*, 2011). AtNRT2.1 subit également une régulation post-traductionnelle par phosphorylation sur trois sites récemment identifiés. L'un des sites présente un état de phosphorylation dépendant de l'approvisionnement en nitrate du milieu, ce qui suggère que le prélèvement de nitrate est ajusté en accord avec sa teneur dans l'environnement (Jacquot *et al.*, 2017; Engelsberger and Schulze, 2012). Les activités des transporteurs peuvent également être régulées par interaction avec d'autres molécules comme NRT2.1 dont l'activité est modulée par interaction avec NAR2 (NRT3.1) qui conditionne l'expression et l'adressage du transporteur à la membrane plasmique (Yong *et al.*, 2010; Wirth *et al.*, 2007). Enfin, le prélèvement du nitrate dans le sol est régulé directement par la teneur en nitrate. En effet, l'expression de NPF6.3/NRT1.1 est induite par le nitrate contrairement à celle du transporteur NRT1.2 qui représente donc la partie constitutive du système de transport à faible affinité. En condition de carence, l'expression de NRT2.4 et 2.5 est induite, NRT2.5 devient même le transcrit le plus abondant de la famille NRT2 lors d'une carence prolongée (Lejay *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2006; Girin *et al.*, 2007; Tsay *et al.*, 1993; Kiba *et al.*, 2012; Lezhneva *et al.*, 2014). En plus du nitrate lui-même, l'activité des transporteurs peut être régulée de façon indirecte par la teneur en acides aminés, comme la glutamine qui exerce une répression de l'activité de NRT2.1 (Nazoa *et al.*, 2003).

b) Le transport du nitrate dans la plante

Suite au prélèvement du nitrate, ce dernier est soit assimilé ou stocké dans la racine pour une faible proportion soit mobilisé vers les parties aériennes. Une fois dans la racine, le nitrate est chargé dans le xylème (Figure 5). Ceci nécessite un transport apoplastique et donc le franchissement du péricycle grâce au transporteur actif secondaire NPF7.3/NRT1.5 exprimé dans les cellules du péricycle, adjacentes au xylème, et au transporteur NPF2.3 (Lin *et al.*, 2008). Une fois dans le xylème, le nitrate peut toutefois retourner dans les cellules du parenchyme racinaire via les transporteurs NPF7.2/NRT1.8 et NPF2.9/NRT1.9, qui régulent le taux de translocation depuis les racines vers les parties aériennes (Tegeder and Masclaux-Daubresse, 2018). Ce taux est crucial car une allocation croissante du nitrate vers les parties aériennes, notamment via une activation de NRT1.5 et une inhibition de NRT1.8, favorise l'efficacité d'utilisation de l'azote (NUE) chez le Colza

(Han *et al.*, 2016). Un autre mode de régulation du taux de translocation vers les parties aériennes repose sur la remobilisation du nitrate stocké dans les vacuoles des cellules racinaires. Au niveau du péricycle et des cellules du parenchyme du xylème, les transporteurs NPF5.11, NPF5.12 et NPF5.16 de la membrane vacuolaire permettraient la remobilisation du nitrate depuis la vacuole vers le cytoplasme (He *et al.*, 2017). Afin d'atteindre les organes demandeurs en azote, le nitrate peut être transféré au phloème directement grâce à NPF7.2/NRT1.8, NPF1.2/NRT1.11 et NPF1.1/NRT1.12 (Tegeder and Masclaux-Daubresse, 2018).

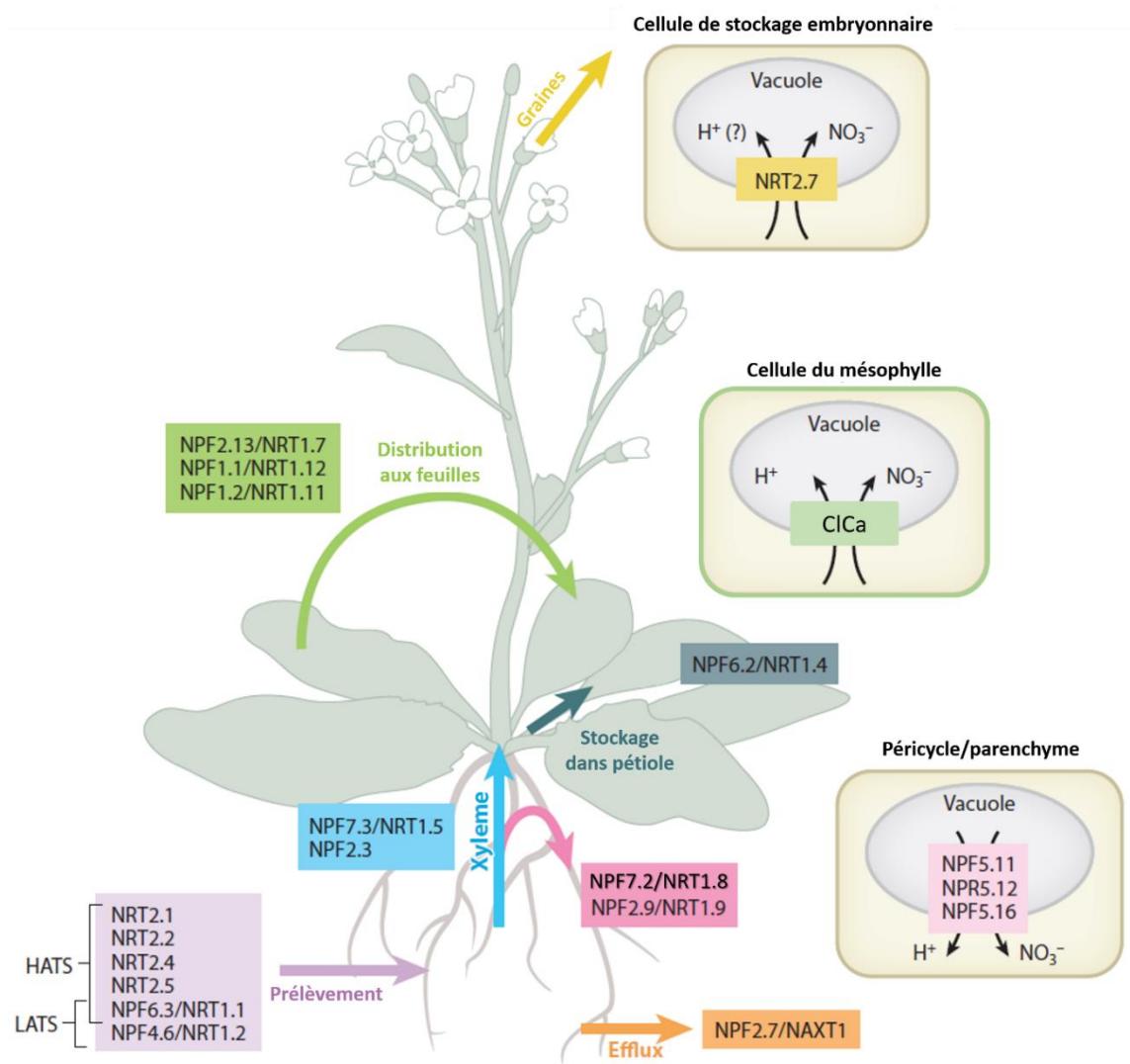


Figure 5: Représentation schématique du prélèvement du nitrate et de son transport entre les organes sources et puits (modifié de (Wang *et al.*, 2018))

Lors de son transfert vers la feuille, le nitrate peut être stocké au niveau du pétiole grâce à NPF6.2/NRT1.4 (Chiu *et al.*, 2004) ou être finalement importé dans les cellules du mésophylle grâce

à des transporteurs encore inconnus. Une partie du nitrate sera stocké dans la vacuole grâce au transporteur ClCa (voir partie B), le reste du nitrate est assimilé. C'est donc sous forme organiques, comme les acides aminés, qu'il sera majoritairement remobilisé vers les organes puits par la suite. Cependant, des études récentes démontrent que le nitrate est également transporté dans le phloème et que ceci est important pour la répartition du nitrate dans la plante et sa croissance. En condition d'approvisionnement suffisant en nitrate, NPF1.2/NRT1.11 et NPF1.1/NRT1.12 permettent notamment la redistribution depuis les grandes vers les petites feuilles. En cas d'approvisionnement limité, NPF2.13/NRT1.7 permet la remobilisation du nitrate depuis les feuilles âgées vers les jeunes feuilles en développement. (Wang *et al.*, 2018). Cette remobilisation est majeure car elle permet le stockage vacuolaire de nitrate dans les organes puits, comme les graines, via le transporteur NRT2.7 (Chopin *et al.*, 2007).

### 3. Les rôles du nitrate dans la cellule végétale

#### a) Un nutriment assimilable

La plus grande partie du nitrate est transportée depuis les racines vers les feuilles où il est importé dans les cellules et pourra être assimilé (Figure 6). La nitrate réductase cytosolique (NR) est responsable de la réduction du nitrate en nitrite (Srivastava, 1980). Le nitrite est alors transporté dans le chloroplaste via le transporteur NITR2;1 où la réduction du nitrite en ammonium a lieu (Maeda *et al.*, 2014; Miflin, 1974). L'ammonium est converti par la voie glutamine synthase (GS)/Glutamine 2-OxoGlutarate AminoTransferases (GOGAT) en glutamate. Ce dernier est une source de carbone et d'azote permettant la synthèse de la plupart des autres acides aminés. Cette assimilation primaire a majoritairement lieu dans de jeunes feuilles grâce à l'isoforme 2 de la GS qui est localisé dans le chloroplaste. Dans le cas de feuilles matures à sénescences, l'acteur principal est la GS1 localisée dans le cytoplasme qui permet soit de favoriser la charge du phloème pour approvisionner les organes puits soit le recyclage de l'ammonium issu du catabolisme des acides aminés respectivement (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010; Krapp, 2015).

L'assimilation du nitrate est régulée par un ensemble de signaux externes et internes pouvant conduire à des modifications transcriptionnelles, traductionnelles et post-traductionnelles des enzymes impliquées. De plus, l'assimilation est connectée avec le métabolisme carboné car elle

requiert la présence de composés réduits, d'ATP et de squelettes carbonés fournis au niveau foliaire par la photosynthèse. Ceci, ainsi que la forte activité de la NR à la lumière, provoque une plus forte assimilation azotée à la lumière par rapport à l'obscurité. Si la photosynthèse est nécessaire à l'assimilation, la réciproque est vraie car les composés azotés sont requis pour la production de la machinerie photosynthétique, notamment la RuBisCO ou les complexes collecteurs de lumière (Nunes-Nesi *et al.*, 2010). Le statut en azote de la plante exerce une régulation sur le prélèvement et l'assimilation de l'azote via le nitrate intracellulaire directement mais aussi les acides aminés (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010; Tsay *et al.*, 2007). La teneur en nitrate cytosolique pourrait agir comme un signal régulant l'assimilation (Cookson *et al.*, 2005). Une modification de la distribution du nitrate entre vacuole et cytoplasme, via une diminution de l'influx vacuolaire, modifie le NUE chez le Colza. Ceci s'explique par une augmentation de la quantité disponible pour l'assimilation dans le cytoplasme ou indirectement par une modification du transport longue distance du nitrate depuis les racines vers les feuilles (Han *et al.*, 2016). Ce dernier point met en évidence un rôle du nitrate pas seulement en tant que nutriment mais aussi en tant que molécule de signalisation.

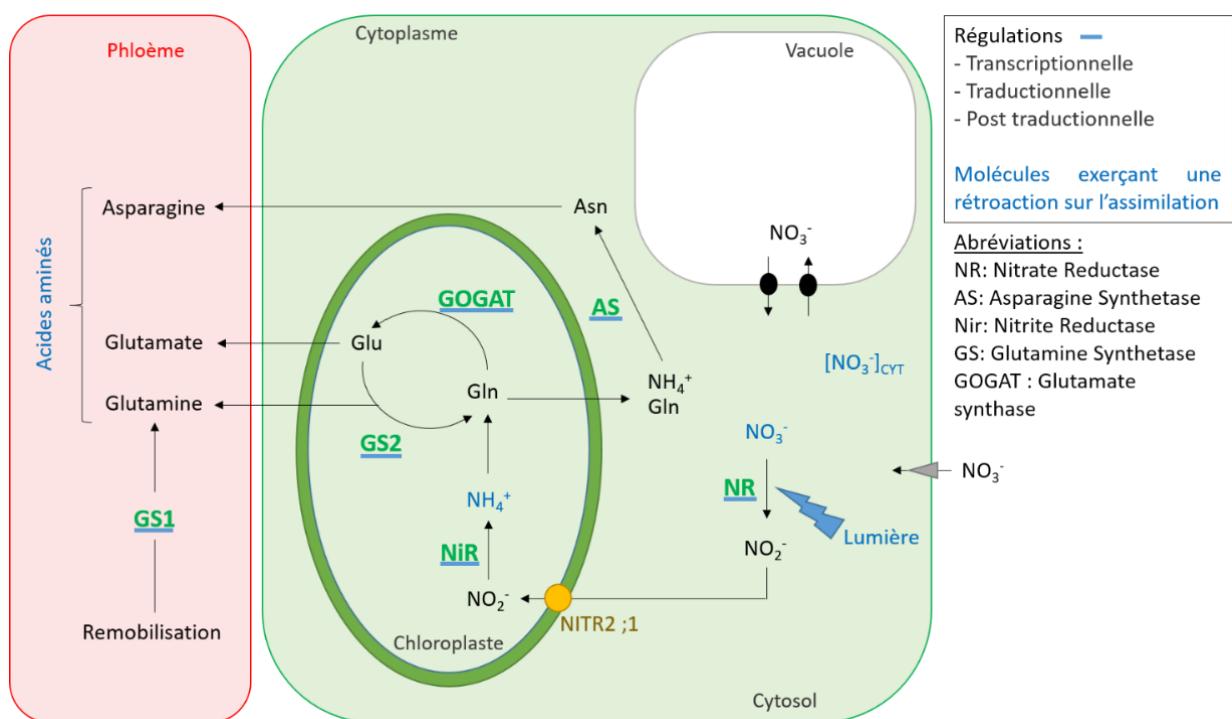


Figure 6: Représentation schématique de l'assimilation du nitrate et sa régulation dans la cellule végétale (modifié de (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010)).

b) Une molécule de signalisation

Le nitrate n'est pas seulement un nutriment mais également une molécule de signalisation impliquée dans de nombreux processus physiologiques au niveau foliaire (Krapp *et al.*, 2014), racinaire (Zhang and Forde, 2000; Zhang and Forde, 1998; Zhang *et al.*, 2007; Menz *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2017) ou de la graine (Alboresi *et al.*, 2005).

Au niveau local, au sein d'une cellule, on observe une régulation rapide (quelques minutes) de l'expression de jusqu'à 1000 gènes en réponse à l'approvisionnement en nitrate, c'est la Primary Nitrate Response (PNR) (Wang, 2000). La plupart sont impliqués dans le prélèvement ou l'assimilation de l'azote, la synthèse des acides aminés ou encore sont des acteurs de la voie des pentoses phosphate aboutissant à la production de composés réduits (Wang, 2000). A l'issu des premières minutes, durant lesquelles la réponse est spécifique au nitrate, une interaction avec d'autres molécules apparaît, notamment des phytohormones (Zhang *et al.*, 2007; Krouk, 2016). Une telle réponse transcriptionnelle au sein de la cellule met en jeu, d'une part, des séquences promotrices « *cis* » sensibles au nitrate et d'autre part des facteurs de transcription « *trans* ». Une séquence consensus n'a pas pu être caractérisée mais certains promoteurs spécifiques ont été identifiés comme la séquence NRE dans le promoteur de la nitrite reductase NII (Konishi and Yanagisawa, 2010). Certains facteurs de transcription « *trans* » ont pu être identifiés comme les NIN Like Proteins (NLP), SLP9 et ANR1. Parmi ces protéines, NLP7 semble tenir le rôle de « chef d'orchestre » de la réponse (Konishi and Yanagisawa, 2013). En réponse à une carence azoté, NLP7 est transporté depuis le noyau vers le cytoplasme en quelques minutes de façon réversible et peut se fixer à 851 gènes, dont certains contiennent la séquence NRE (Marchive *et al.*, 2013; Krapp *et al.*, 2014). Le facteur de transcription ANR1 a été démontré comme essentiel pour la stimulation localisée de la croissance des racines latérales en réponse au nitrate (Zhang and Forde, 2000; Zhang and Forde, 1998; Zhang *et al.*, 2007).

La réponse cellulaire au nitrate nécessite l'existence d'une détection du nitrate dans la cellule. Ces senseurs internes pourraient être des molécules cytoplasmiques ou encore des molécules impliquées dans le transport ou le métabolisme de l'azote. Des mesures effectuées en cellules épidermiques de racine démontrent que la teneur en nitrate cytoplasmique est maintenue à valeur

constante, et ce, même si la quantité dans milieu externe varie considérablement, c'est l'homéostasie cytosolique. Cette stabilité suggère que le contenu en nitrate cytoplasmique pourrait agir comme un signal témoignant du statut en azote de la plante (Cookson *et al.*, 2005; Miller and Smith, 2008).

Ces molécules senseurs permettent donc d'avoir des informations sur le statut nutritif de la plante, elles doivent être intégrées aux informations environnementales concernant la disponibilité en nitrate dans l'environnement afin d'ajuster l'acquisition en nitrate aux besoins réels de la plante. Le transporteur NRT1.1 (CHL1/NPF6.3) exerce ce rôle de senseur de la teneur externe en nitrate. La fonction de détection du nitrate a été démontrée comme étant impliquée dans la PNR et le phénotype racinaire en réponse à la teneur en nitrate indépendamment de sa fonction de transporteur (Tsay *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1999; Ho *et al.*, 2009). Une communication bidirectionnelle systémique entre les racines et les feuilles de la plante permet ensuite l'intégration de ces informations environnementales. Récemment, les bases moléculaires de cette signalisation systémique ont été révélées (pour plus d'informations voir Ruffel & Gojon 2017; Tabata et al. 2014; Ohyama et al. 2008; Ohkubo et al. 2017).

### 4. Le stockage vacuolaire du nitrate, un double rôle nutritif et osmotique

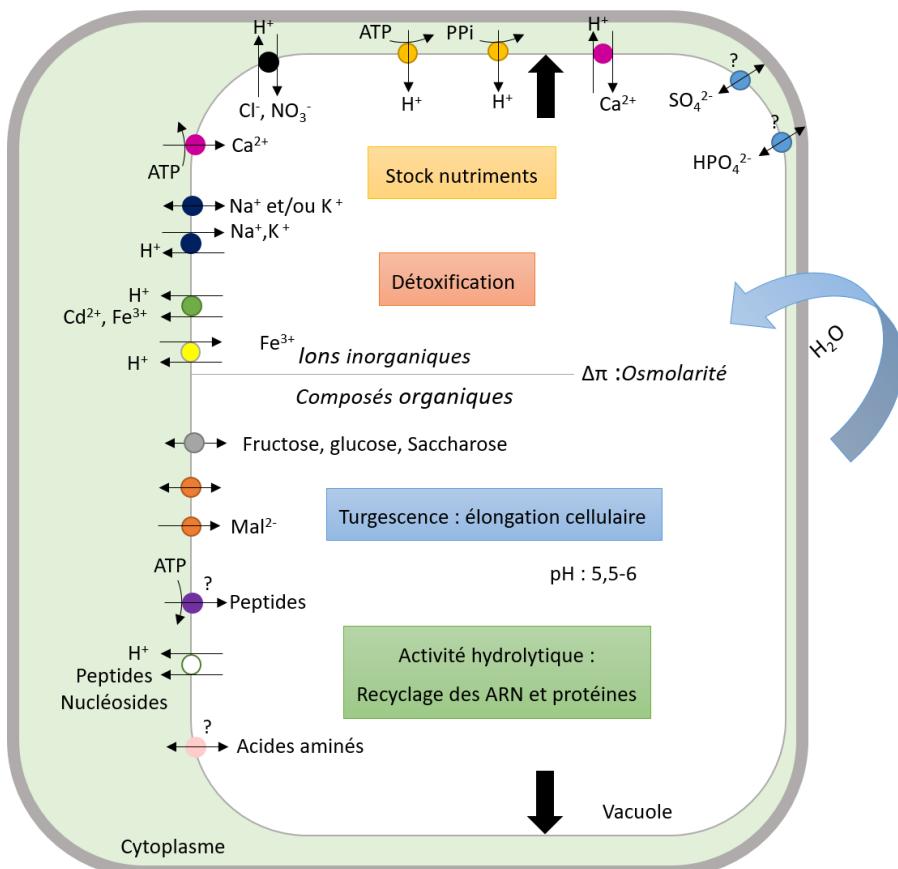
#### a) La vacuole des cellules végétales, un compartiment central aux rôles multiples

Au sein des cellules de la pointe racinaire, dans lesquelles les vacuoles ne sont pas complètement développées, l'homéostasie cytosolique pour le nitrate semble moins stricte : ceci suggère une implication de la vacuole dans son maintien, et donc potentiellement dans la signalisation nitrate (Miller and Smith, 2008).

#### *La vacuole, un compartiment plurifonctionnel*

La vacuole, décrite au sens large, est le produit final de la voie de sécrétion. Il y a plus de 20 ans, deux types de compartiments vacuolaires ont été décrits sur la base de marqueurs spécifiques à chaque type. La vacuole est alors décrite à la fois comme la « poubelle » et le « grenier » de la cellule car, au niveau racinaire, des vacuoles de type lytique à faible pH sont décrites mais également des vacuoles permettant le stockage protéique (Paris *et al.*, 1996). Cette ségrégation permet de réconcilier les rôles, pouvant sembler antagonistes, de la vacuole. Plus récemment, cet

état de fait a été fortement remis en question : de nombreuses études soutiennent que l'existence de deux vacuoles distinctes est en fait limité à un faible nombre de types cellulaires ou de transitions développementales (Frigerio *et al.*, 2008). Dans les cellules matures, une grande vacuole centrale représente environ 80% du volume cellulaire. La vacuole est un lieu pour le stockage cellulaire de molécules glucidiques (Kühn and Grof, 2010) (fructose, glucose, saccharose et amidon), d'ions et de peptides. Les anions stockés sont sous forme inorganique (De Angelis *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2017; Kataoka *et al.*, 2004) (chlorure, nitrate, sulfate et phosphate) ou organique (malate, citrate et glutamate). L'équilibre des charges au sein de la vacuole est donc assuré par le stockage de cations comme le potassium, le sodium et le calcium. La séquestration de ces ions et métabolites a un double rôle à la fois nutritif et osmotique. Ce stockage permet de constituer une réserve facilement remobilisable en cas de carence nutritionnelle et participe à la constitution d'un potentiel osmotique important permettant la création d'une pression de turgescence, moteur de l'elongation cellulaire (Ray *et al.*, 1972; Boyer, 1968; Braidwood *et al.*, 2014). La vacuole est également le lieu de stockage de composés toxiques comme les métaux (Fer, Zinc, Cuivre, Cadmium) ou le sel (Martinoia *et al.*, 2012). En plus de son rôle de stockage, la vacuole est également un compartiment concentrant une grande activité hydrolytique. Une forte activité RNase est à l'origine du recyclage des ARN mais un recyclage des protéines est également observé à ce niveau grâce à la présence de transporteurs de peptides et d'acides aminés. Les différentes fonctions assurées par la vacuole nécessitent le passage de molécules au travers de la membrane vacuolaire. Les transporteurs majeurs, de la membrane vacuolaire, impliqués dans ces processus sont représentés en figure 7.



- Glucides: SUC/SUT, SWEET : transport passifs ou antiports avec  $H^+$       ●  $Fe^{3+}$  : AtVIT1 : échangeur avec  $H^+$
- $Cl^-$ ,  $NO_3^-$  : CIC (Chloride Channel) : échangeurs avec  $H^+$       ●  $Fe^{3+}$  ou  $Cd^{2+}$  : AtNRAMP4 et 5 (symport avec  $H^+$ )
- $Ca^{2+}$  : ATPases ACA4 et 11 de type P      ● Malate : AttDT : transporteur malate/fumarate  
CAX1,3,4 et 9 : échangeurs avec  $H^+$       ● AtALMT4, 5, 6, et 9 : canal malate/fumarate
- $K^+$  : TPK 1, 2, 3 et 5 (two pore channel 1) : canaux  
 $K^+$  et  $Na^+$  : TPC1 : canaux et NHX1: échangeur avec  $H^+$       ● Peptide : Transport actif supposé
- $SO_4^{2-}$ : SULTR : mécanisme inconnu      ● Peptides et nucléosides: AtENT1 symport nucléoside/ $H^+$   
 $HPO_4^{2-}$ : Type ABC? mécanisme inconnu      ● AtPTR2 symport peptide/ $H^+$
- Acides aminés: mécanisme inconnu

Figure 7: Représentation schématique de la pluralité fonctionnelle de la vacuole des cellules végétales et des transporteurs impliqués (inspiré de (Martinoia *et al.*, 2012).

### ***Le nitrate est fortement accumulé dans la vacuole***

Parmi tous les composés présents dans la vacuole, le nitrate est fortement accumulé. En effet une première étude a démontré que 99% du nitrate cellulaire est contenu dans la vacuole de protoplastes d'Orge (Martinoia *et al.*, 1981). Cette étude a par la suite été nuancée par d'autres approches aboutissant à un pourcentage de 58% (Granstedt and Huffaker, 1982) puis plus tardivement de 88% grâce à des mesures absolues par microélectrodes sélectives au nitrate dans

des cellules racinaires d'Orge (Miller and Smith, 1992). Plus récemment, l'utilisation d'une microélectrode sélective au nitrate sur cellule isolée a permis de montrer que, en dépit d'une modification de la teneur en nitrate dans le milieu d'un facteur 10 000, la teneur en nitrate cytosolique reste relativement constante dans le cytoplasme à la différence de la vacuole dont l'accumulation en nitrate est largement corrélée à l'apport extérieur (Miller and Smith, 2008; Van Der Leij *et al.*, 1998).

Une telle stabilité est toutefois à nuancer puisque des mesures effectuées sur des cellules du mésophylle démontrent qu'en réponse à une transition jour/nuit, la concentration cytosolique en nitrate augmente de façon dépendante de l'activité nitrate reductase. Les cellules du mésophylle représentant le lieu préférentiel de réduction du nitrate, en réponse à l'activation de la NR à la lumière, la réduction du nitrate serait augmentée ce qui induit une diminution de la concentration cytosolique du nitrate et inversement à l'obscurité (Cookson *et al.*, 2005). Enfin, récemment, grâce à l'utilisation d'un senseur codé génétiquement permettant la mesure de la teneur en nitrate cytosolique, Elsa Demes, Alexis De Angeli et collaborateurs ont mis en évidence d'importantes fluctuations de la teneur en nitrate cytosolique en réponse à une variation environnementale dans les cellules de garde (données non publiées).

b) Le stock vacuolaire, une réserve de nitrate assimilable

Dans la cellule végétale, deux stocks de nitrate sont présents, un limité mais accessible à la NR dans le cytoplasme (4 mM) et un, plus conséquent, vacuolaire (40 mM) inaccessible à la NR (Van Der Leij *et al.*, 1998). La majeure partie de la réduction du nitrate par NR se fait dans le cytoplasme des cellules du mésophylle à la lumière. Par conséquent une assimilation efficace requiert deux types de transport : un transport courte distance de la vacuole vers le cytoplasme et un transport longue distance depuis la racine vers les parties aériennes (Roy *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2016). La stimulation de l'assimilation du nitrate par la lumière favorise la remobilisation de ce dernier depuis la vacuole et entretient donc la disponibilité du nitrate pour la réduction par la NR (Cookson *et al.*, 2005).

En condition de carence, le nitrate peut être remobilisé. Une telle remobilisation, dans les cellules racinaires d'Orge, permet le maintien de la croissance, de l'assimilation et de la teneur en nitrate

cytosolique pendant 24h en condition de carence et fournit les parties aériennes en nitrate via un transport longue distance (Van Der Leij *et al.*, 1998). La remobilisation vacuolaire du nitrate fournit le cytoplasme en nitrate pour l'assimilation mais un effet sur le transport longue distance a également été démontré. En effet, chez le Colza, en réponse à une diminution de stockage vacuolaire du nitrate, une augmentation de la translocation depuis les racines vers les parties aériennes a été démontrée. Ceci aboutit à une plus grande biomasse et un rendement plus important (Han *et al.*, 2016). La réserve de nitrate vacuolaire est donc une source nutritionnelle pouvant être remobilisée en cas de carence pour entretenir l'assimilation de l'azote et favoriser la croissance.

c) Le stock vacuolaire de nitrate, un rôle osmotique

Le nitrate est connu depuis des années comme un nutriment essentiel à la croissance des végétaux, cependant il s'agit également d'un osmolyte majeur de la cellule végétale.

L'elongation des cellules végétales résulte d'une forte pression de turgescence en action concertée avec des modifications pariétales, permettant ainsi une augmentation du volume cellulaire (Kutschera and Niklas, 2013; Lockhart, 1965). L'augmentation du volume cellulaire est possible grâce à un influx d'eau contrôlé par le potentiel hydrique de la cellule. Celui-ci dépend du potentiel osmotique défini par la teneur en solutés osmotiquement actifs dissous.

$\psi = P - \pi$  Où  $\psi$  est le potentiel hydrique,  $\pi$  la pression osmotique et  $P$  la pression de turgescence

Un gradient de potentiel hydrique au travers des membranes provoque alors un flux d'eau rétablissant l'équilibre avec le milieu extérieur. Le lien entre le potentiel hydrique et la croissance des feuilles a été mis en évidence il y a 50 ans sur le tournesol (Boyer, 1968). Plus récemment, Ehlert et collaborateurs (2009) ont démontré qu'une diminution de la conductivité hydraulique de la racine induit une diminution de la turgescence des cellules de la zone d'elongation foliaire et un ralentissement du taux de croissance chez le maïs. L'expression du gène *AtTIP1;1* (codant une aquaporine sur la membrane vacuolaire) étant fortement corrélée à la croissance de la racine, de l'hypocotyle et des feuilles, ceci suggère un lien évident entre teneur en eau dans les vacuoles et croissance (Li *et al.*, 2014). Un grand nombre de travaux établissent une corrélation positive entre

la teneur en nitrate du milieu et la conductivité hydraulique des racines. Une telle corrélation s'explique notamment par une modification de l'expression ou de la régulation des aquaporines par le nitrate lui-même (Cramer *et al.*, 2009; Gorska *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2016). Dans ce cadre, le lien entre nitrate et l'homéostasie hydrique semble lié à une signalisation plus qu'à un effet osmotique. Cependant, McIntyre dans une revue publiée en 1997, rassemble un nombre important de faits révélant le rôle osmotique du nitrate lors de la germination, la levée de dominance apicale, la formation des racines latérales, la floraison etc. (McIntyre, 1997). En utilisant l'exemple de l'élongation des bourgeons axillaires, il met en évidence une chronologie impliquant, dans un premier temps, une élongation cellulaire favorisée par un effet osmotique du nitrate puis, dans un second temps, une croissance due à un effet nutritionnel (McIntyre, 1997). Plus récemment, l'implication du nitrate en tant qu'osmolyte a été démontrée dans les cellules de garde grâce à des mutants pour des transporteurs membranaires (AtNRT1.1) et vacuolaires de nitrate (AtClCa) (voir paragraphe B2b) (Guo *et al.*, 2003; Wege *et al.*, 2014).

### B. L'acteur principal du stockage de nitrate vacuolaire : AtClCa

#### 1. Clonage et caractérisation d'un membre des ClCs : AtClCa

Comme mentionné précédemment, de nombreuses études révèlent une accumulation vacuolaire de nitrate d'environ dix fois environ comparé au cytoplasme (Cookson *et al.*, 2005; Miller and Smith, 1992). En raison de la différence positive de potentiel de membrane entre l'intérieur de la vacuole, créée par les pompes à protons vacuolaires, et le cytoplasme, un influx passif de nitrate est théoriquement possible. Cependant, le gradient de nitrate mesuré entre la vacuole et le cytoplasme est trop important pour être le résultat d'un influx passif seul (Miller and Smith, 1992). Dès 1987, l'observation de la dissipation d'un gradient de pH, généré artificiellement, sous l'influence du nitrate démontre la probable existence d'un mécanisme de transport actif secondaire lié aux protons (Schumaker and Sze, 1987).

#### a) Identification d'un transporteur impliqué dans l'homéostasie du nitrate : AtClCa

Chez les animaux, le rôle des ClCs dans le fonctionnement cellulaire a été démontré dans les transports épithéliaux ou l'excitabilité des cellules (Jentsch *et al.*, 2014). L'existence d'homologues chez *Arabidopsis thaliana* a encouragé l'élucidation de leur fonction chez les plantes. Ceci a débuté

grâce à l'obtention de mutants d'insertion dans la partie 3' codante du gène *AtClCa* (*clca-1*) aboutissant à une expression fortement réduite de ce dernier (Geelen *et al.*, 2000). L'analyse phénotypique de ce mutant (*clca-1*), ainsi que d'un second mutant KO appelé *clca-2* (M. Allot, B. Bernasconi and G. Ephritikhine, données non publiées), n'a révélé aucune modification phénotypique, lorsque les plantes sont cultivées en serre ou *in vitro*, mais une diminution d'environ 50% de la teneur en nitrate dans les feuilles et dans les racines. Le gène *AtClCa* est exprimé à la fois dans les parties foliaires mais aussi dans les racines et une telle expression est stimulée par l'apport de nitrate dans le milieu (Geelen *et al.*, 2000). Aucun autre anion, à l'exception du malate et du nitrite, ne semble sur-accumulé ou sous-accumulé, ce qui suggère un rôle spécifique pour *AtClCa* dans l'homéostasie nitrate (Figure 8). Chez *clca-1*, cette augmentation du nitrite résulte très probablement d'une plus faible translocation du nitrate dans la vacuole qui augmente la disponibilité de ce dernier pour une réduction dans le cytoplasme (Monachello *et al.*, 2009). Le malate étant un anion organique, il peut porter plusieurs charges négatives en conditions acides (vacuoles) susceptibles de compenser le déficit de charge dû à la plus faible teneur en nitrate.

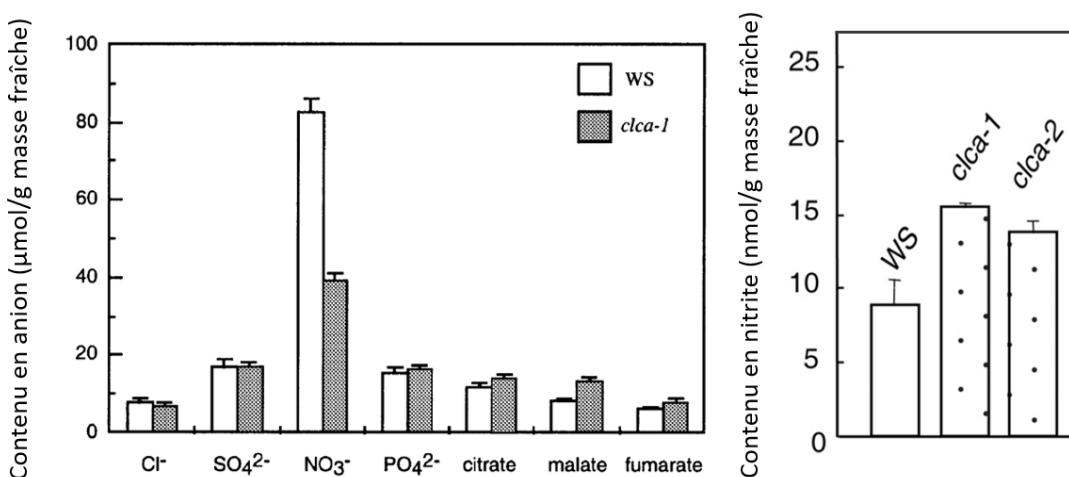


Figure 8 : Contenu en anion chez les mutants KO pour *AtClCa* déterminé par électrophorèse capillaire ou dosage colorimétrique (nitrite) (modifié à partir de (Geelen *et al.*, 2000; Monachello *et al.*, 2009))

b) Localisation et caractérisation fonctionnelle d'AtClCa

Afin de comprendre l'implication d'AtClCa dans l'homéostasie du nitrate, la localisation et la caractérisation du fonctionnement de ce transporteur a été effectuée. L'expression transitoire en

protoplastes de cellules du mésophylle d'AtClCa fusionné à un tag GFP (De Angeli *et al.*, 2006) ainsi que sa colocalisation avec un marqueur tonoplastique (Lv *et al.*, 2009) indique une localisation sur la membrane vacuolaire (Figure 9). Au niveau tissulaire, *AtClCa* est exprimé dans le cylindre central des racines, les feuilles, la tige, les fleurs, et plus faiblement les siliques, ce qui suggère un rôle de la protéine dans ces différents organes/tissus (Lv *et al.*, 2009; Monachello *et al.*, 2009).

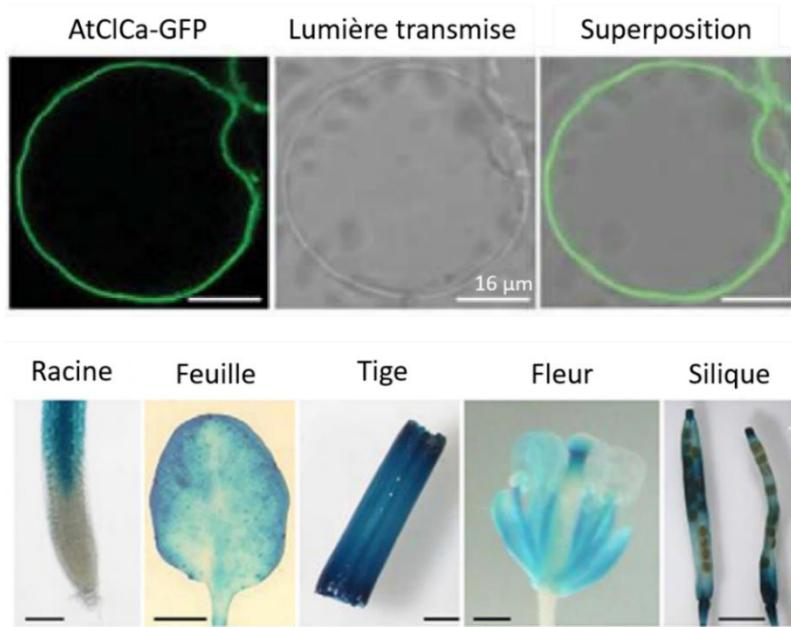


Figure 9: Localisation de l'expression d'AtClCa à l'échelle subcellulaire (haut) et à l'échelle tissulaire ou de l'organe (bas) (modifié de (Lv *et al.*, 2009; De Angeli *et al.*, 2006)).

Afin de déterminer le mécanisme de transport du nitrate par cette protéine, une approche d'électrophysiologie a été utilisée sur vacuoles isolées de cellules du mésophylle. Un courant anionique a été mesuré dans 100% des vacuoles dans les conditions testées (De Angeli *et al.*, 2006). De façon surprenante, la substitution du nitrate par le chlorure engendre une forte diminution de la densité de courant indiquant une sélectivité préférentielle pour le nitrate. La réduction de ce courant de 60 et 80%, chez les mutants KO *caca-1* et *caca-2* respectivement, a permis de confirmer l'implication de AtClCa dans le transport de nitrate au travers de la membrane vacuolaire. Les mesures du potentiel d'inversion indiquent qu'AtClCa n'est pas un canal perméable au nitrate mais un transporteur actif impliquant un second ion. La présence d'échangeurs ClCs  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  chez différents organismes tels que *Escherichia coli* (Dutzler, 2006) a conduit au test de l'implication des protons dans le transport chez AtClCa. L'analyse des courants AtClCa en réponse à une gamme de

pH a démontré qu'AtClCa fonctionne comme un échangeur  $2\text{NO}_3^-/\text{H}^+$  (De Angeli *et al.*, 2006). Celui-ci permet théoriquement une accumulation de nitrate cinquante fois supérieure dans la vacuole par rapport au cytoplasme en conditions physiologiques et corrobore ainsi les analyses physiologiques.

### 2. AtClCa est essentiel pour l'homéostasie hydrique de la plante

#### a) La cellule de garde, un modèle d'étude des phénomènes osmotiques

Les végétaux sont confrontés à d'importantes fluctuations de température et approvisionnement en eau. Ce stress abiotique est responsable de façon prépondérante de la réduction des rendements (Boyer, 1982). Parmi les adaptations évolutives permettant le maintien de la teneur en eau des plantes, l'acquisition d'une cuticule limite la déshydratation de la feuille. Cependant, cette dernière restreint également la fixation de  $\text{CO}_2$  requise pour la photosynthèse. La feuille présente donc un grand nombre de pores, appelés stomates, facilitant les échanges gazeux (Roelfsema et Hedrich, 2005). Ces derniers sont formés de deux cellules de garde dont la turgescence détermine le degré d'ouverture de l'ostiole (pore situé entre les deux cellules de garde). L'ouverture stomatique ne peut se produire que par turgescence des cellules de garde en réponse à une augmentation du potentiel osmotique (Roelfsema et Hedrich, 2005). L'augmentation du potentiel osmotique lors de l'ouverture et sa diminution lors de la fermeture des stomates sont permises par des flux de solutés facilités par un grand nombre de transporteurs membranaires et vacuolaires (Figure 10).

Ces flux sont déclenchés par des facteurs internes et externes. Parmi les facteurs externes, la lumière, l'hygrométrie et la teneur en dioxyde de carbone sont cruciaux. Lors de l'ouverture stomatique, la lumière active les pompes à protons membranaires ce qui engendre une hyperpolarisation responsable de l'activation de canaux  $\text{K}^+$  (KAT, AKT). En réponse à l'excès de charges positives généré, une entrée de  $\text{Cl}^-$ , malate et nitrate se produit. Les transporteurs sont peu connus, seul NRT1.1 a été identifié sur la membrane pour le nitrate (Guo *et al.*, 2003; Cotelle and Leonhardt, 2016; Pandey *et al.*, 2007). Au niveau vacuolaire, l'entrée de  $\text{K}^+$  se fait grâce aux NHX et de façon compensatoire, l'entrée de malate et de chlorure est assurée par ALMT9 (Eisenach et De Angeli, 2017). Parmi les transporteurs anioniques vacuolaires impliqués dans l'ouverture

stomatique, deux membres des CICs ont été identifiés : AtCICc est fortement exprimé dans les cellules de garde et est proposé comme étant un échangeur  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  permettant l'entrée de chlorure dans la vacuole (Jossier *et al.*, 2010; Lv *et al.*, 2009) et AtClCa (paragraphe B2b).

En réponse à une diminution de l'hygrométrie, sous le contrôle de l'acide abscissique (ABA), les stomates peuvent se fermer, minimisant ainsi les pertes d'eau (Claeys and Inze, 2013). L'ABA engendre l'activation, par levée d'inhibition, de la kinase OST1 qui active les canaux anioniques membranaires à cinétique lente (SLAC1) et rapide (ALMT12/QUAC1). L'efflux d'anions induit une dépolarisation activant des canaux d'efflux potassiques (GORK) (Munemasa *et al.*, 2015). Au niveau vacuolaire, les acteurs sont moins bien caractérisés mais un efflux de potassium, via les transporteurs TPC/TPK, est compensé par un efflux de malate et chlorure généré par ALMT6 ainsi qu'un probable efflux d'anions via AtClCa (paragraphe B2b) (Wege *et al.*, 2014; Munemasa *et al.*, 2015; Eisenach and De Angeli, 2017).

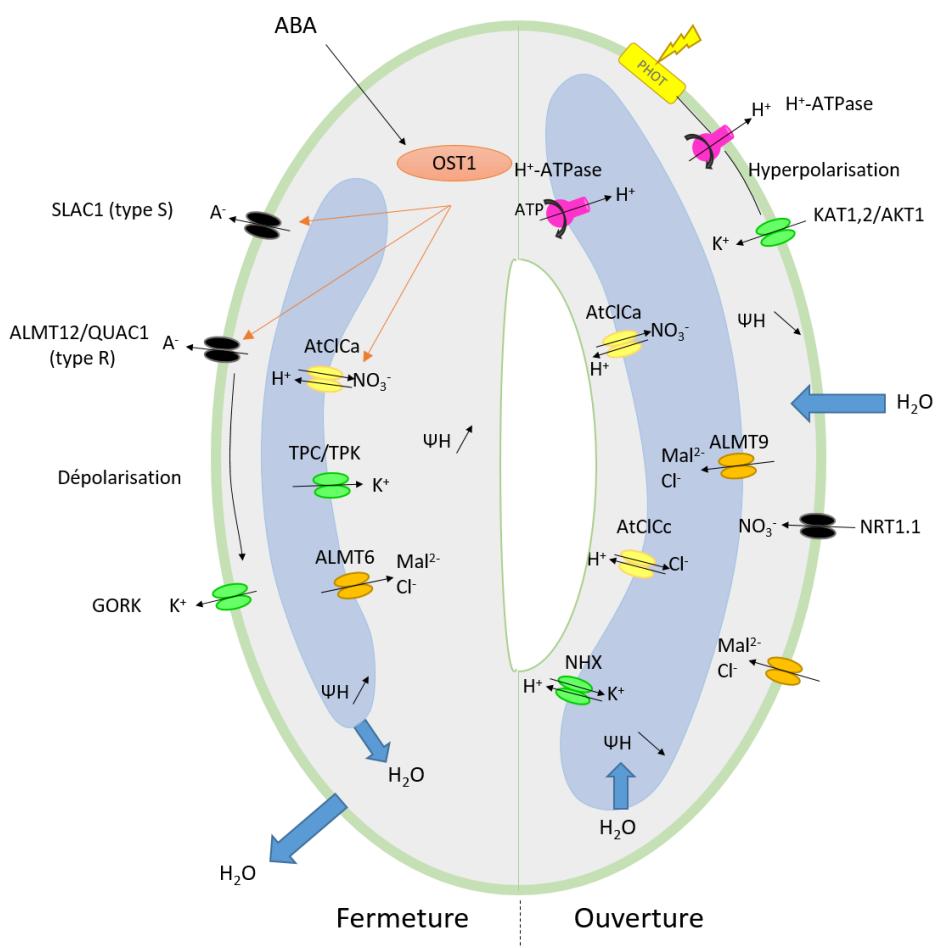


Figure 10: Vue d'ensemble des flux d'ions impliqués dans les mouvements stomatiques (modifié de (Munemasa *et al.*, 2015; Cotelle and Leonhardt, 2016))

### b) Le rôle d'AtClCa dans l'homéostasie hydrique

Parce que les flux ioniques à l'origine de l'augmentation de turgescence se répercutent en phénomènes observables et mesurables, que sont l'ouverture et la fermeture stomatique, les cellules de garde sont un excellent modèle pour étudier le rôle d'un transporteur dans l'équilibre osmotique et hydrique.

AtClCa est fortement exprimé dans les cellules de garde (Figure 11), ce qui a permis de déterminer son importance pour l'osmolarité de la cellule de garde, et donc dans les mouvements stomatiques grâce aux deux lignées KO pour AtClCa : *clca-1* et *clca-2*. Chez ces mutants, l'ouverture des stomates en réponse à la lumière, mesurée sur épiderme isolé, est réduite de 16-19%. La cinétique d'ouverture des stomates à la lumière s'arrête prématurément et aboutit à une ouverture partielle. AtClCa permet donc l'entrée de nitrate dans la vacuole et participe ainsi à l'augmentation du potentiel osmotique à l'origine de l'ouverture stomatique (Wege *et al.*, 2014).

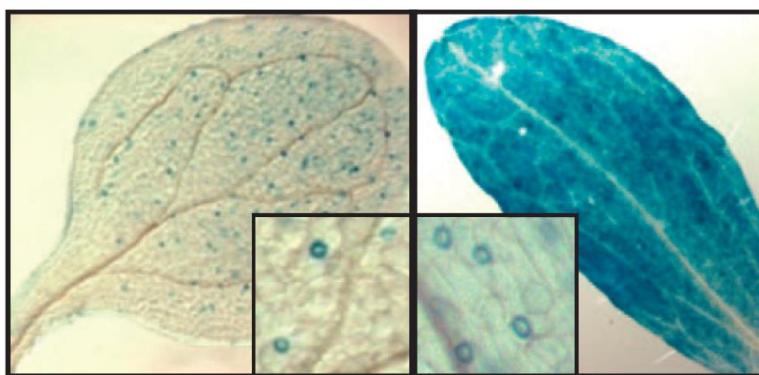


Figure 11: Localisation de l'expression d'AtClCa par une analyse histochimique GUS ( $\beta$ -glucuronidase, bleu) dans les cotylédons et les feuilles matures chez *Arabidopsis thaliana* (Wege *et al.*, 2014)

Un test de déshydratation a également été effectué sur des rosettes coupées et montre une déshydratation plus rapide chez *clca-2* comparé au sauvage (Figure 12). Ce résultat surprenant suggérait une implication d'AtClCa dans la fermeture des stomates. Afin de confirmer cela, une expérience a été conduite en présence d'ABA afin d'étudier la réponse à l'ABA à la fois sur la fermeture des stomates et sur la prévention de l'ouverture stomatique lors de la transition obscurité/lumière. Chez les mutants *clca-2*, l'ABA n'empêche pas l'ouverture des stomates contrairement au sauvage et l'application d'ABA après l'ouverture des stomates engendre une fermeture limitée de l'ordre de 15% contre 70% chez le sauvage (Wege *et al.*, 2014). Cet échangeur

participerait donc aussi à l'efflux d'ion nécessaire à la fermeture stomatique en réponse à l'ABA.

Ceci est conditionné par la phosphorylation de l'échangeur par la kinase OST1 (paragraphe B3c).

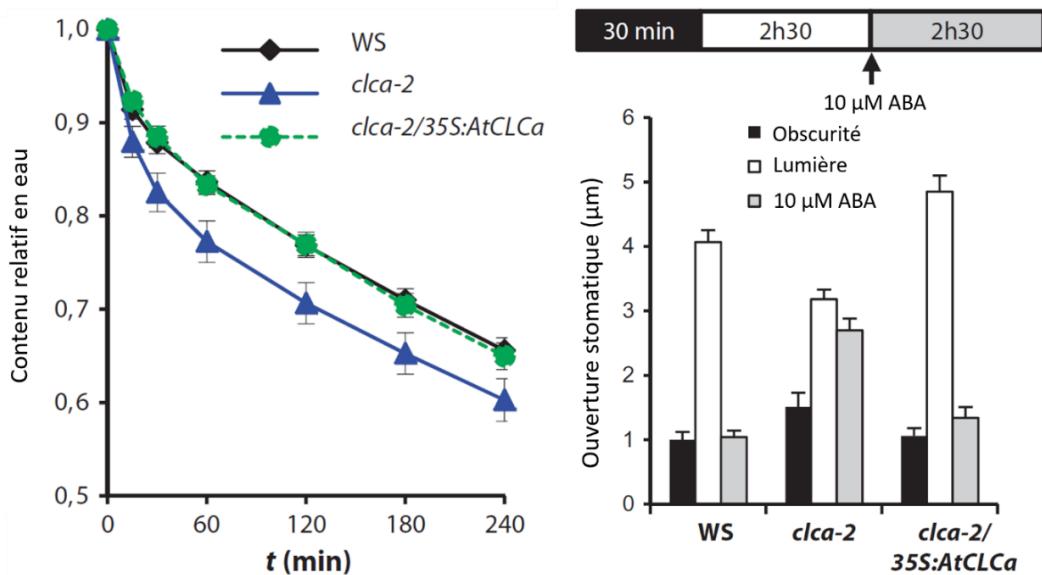


Figure 12: Réponse à la déshydratation des rosettes (gauche) et fermeture stomatique induite par l'ABA (droite) chez *cica-2*, WS et le KO complémenté avec AtCLCa (Wege *et al.*, 2014)

### 3. Régulation du transport chez AtCLCa

Au vue de la fonction essentielle de AtCLCa dans la physiologie de la plante, son activité est finement régulée afin de répondre aux fluctuations environnementales (Figure 13).

- a) Le fonctionnement d'AtCLCa nécessite un couplage avec les pompes à protons vacuolaires

Chez les mammifères, CIC-5 co-localise avec les V-ATPases, ce qui suggère un lien fonctionnel entre ces deux transporteurs (Günther *et al.*, 1998). Sa caractérisation en tant qu'échangeur  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  confirme que transport de chlorure nécessite l'activité des V-ATPases au niveau des endosomes (Picollo and Pusch, 2005). Réciproquement, un KO pour CIC-5 présente une plus faible acidification des endosomes que chez le sauvage, ce qui suggère que l'activité des V-ATPases nécessite celle de CIC-5 (Günther *et al.*, 1998; Satoh *et al.*, 2017). Le mécanisme sous-jacent n'est pas encore connu mais pourrait être lié à une activation des V-ATPases grâce aux charges négatives compensatrices du chlorure transporté dans les endosomes (Satoh *et al.*, 2017).

Chez les plantes, notamment le Colza et *Arabidopsis thaliana*, une baisse d'activité des V-ATPases est corrélée à une diminution de la teneur en nitrate de la plante (Han *et al.*, 2016; Krebs *et al.*, 2010). Cette diminution est proposée comme due à une baisse de l'efficacité du stockage

vacuolaire du nitrate. Ceci est en accord avec une augmentation de l'assimilation du nitrate chez ces plantes (activité NR, teneur en glutamine). Ces études suggèrent une implication majeure et spécifique des V-ATPases dans la translocation du nitrate depuis le cytoplasme vers la vacuole. Ce lien fonctionnel entre V-ATPase et stockage du nitrate peut résulter du transport actif secondaire utilisé par AtClCa (Figure 13).

b) La fixation d'ATP impacte le fonctionnement d'AtClCa

L'activité des échangeurs ClC est indirectement dépendante de l'hydrolyse de l'ATP par les V-ATPases. Cependant l'ATP peut également réguler ces ClCs de façon directe. En effet, de nombreuses études ont démontré que les domaines cytoplasmiques sont capables d'interagir avec les nucléotides à adénosine (ATP, AMP, ADP) (Poroca *et al.*, 2017). Chez les mammifères, par exemple, ClC-1, ClC-5 et ClC-2 interagissent avec l'ATP. Chez ClC-1, la fixation de l'ATP a un rôle inhibiteur sur le transporteur (Bennetts *et al.*, 2005) alors que, chez ClC-5, la fixation a un rôle activateur. Chez ClC-2, la fixation ne modifie pas la probabilité d'ouverture mais la cinétique d'activation et de désactivation du transporteur (Stölting *et al.*, 2013).

Chez *Arabidopsis thaliana*, une étude d'électrophysiologie réalisée sur AtClCa démontre que l'ajout d'ATP engendre une inhibition des courants entrants et sortants. Une approche de modélisation moléculaire a permis de mettre en évidence la présence d'un aspartate conservé (D753) important pour la fixation de l'ATP : la mutation du résidu D753 en une alanine engendre une abolition de l'inhibition du courant par l'ATP (Figure 13). L'ajout d'un excès d'AMP limite l'inhibition dépendant de l'ATP en raison d'une compétition entre ces deux molécules. Ainsi, à la différence de ClC-5 qui fixe avec une affinité égale l'ATP, l'AMP et l'ADP, AtClCa ne fixe que l'ATP et l'AMP mais aucune inhibition de transport n'est observée avec l'AMP seul (De Angeli *et al.*, 2009; Poroca *et al.*, 2017). L'activité de la NR est notamment régulée par les teneurs cytosoliques en ATP et AMP, ce qui suggère que l'inhibition d'AtClCa par l'ATP et la compétition AMP/ATP pourrait avoir un rôle physiologique lié au métabolisme azoté. L'augmentation du ratio AMP/ATP, témoin d'un état énergétique moins favorable, pourrait lever l'inhibition du transporteur et favoriser le stockage de nitrate dans la vacuole (De Angeli *et al.*, 2009). De plus, l'inhibition d'AtClCa par l'ATP suggère un lien physiologique entre son activité et celle des V-ATPases, dont le substrat est l'ATP.

c) La modulation de l'activité d'AtClCa par phosphorylation

Au sein de la cellule de garde, AtClCa a un rôle majeur dans l'entrée d'anions lors de l'ouverture mais également dans l'efflux nécessaire à la fermeture en réponse à l'ABA (paragraphe B2b). Dans ces mêmes cellules, une protéine kinase appelée OST1 est essentielle à l'activation de transporteurs membranaires en réponse à l'ABA (Cotelle and Leonhardt, 2016). Les travaux réalisés par Wege et collaborateurs sur AtClCa ont permis, tout d'abord, de montrer par BIFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) qu'AtClCa et OST1 interagissent au niveau de la membrane vacuolaire. De plus, OST1 phosphoryle AtClCa sur le résidu Thréonine 38 en N terminal de la protéine (Figure 13). Des mesures de courants réalisées en présence d'OST1 démontrent que la phosphorylation sur la thréonine 38 engendre une augmentation de la densité de courant anionique sortant. L'analyse des ouvertures et fermetures stomatiques chez les plantes *ccla-2* transformées avec AtClCaT38A (non phosphorylable) révèle une complémentation de l'ouverture des stomates mais pas de la fermeture. Ces travaux démontrent l'importance de la phosphorylation du résidu thréonine 38 en tant que stimulant de l'efflux d'anions nécessaire à la fermeture des stomates en réponse à l'ABA (Figure 10) (Wege *et al.*, 2014).

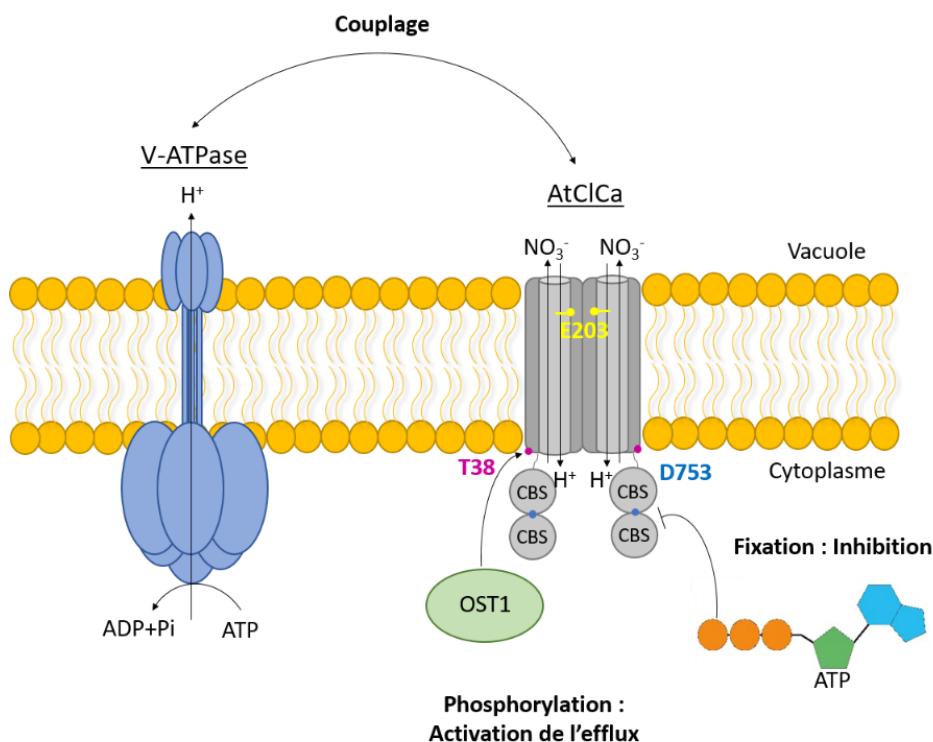


Figure 13: Représentation schématique des différents modes de régulation de l'activité d'AtClCa chez *Arabidopsis thaliana*

### C. Les ClCs, une famille de protéines conservées au sein du vivant

AtClCa appartient à une famille de protéines conservées et pourtant, en dépit de leur grande proximité, des échangeurs mais aussi des canaux existent. Quels sont donc les fondements moléculaires du transport chez les ClCs ?

#### 1. Les ClCs, découverte et élucidation de leur structure

##### a) Historique de la découverte des ClCs

C'est de façon inattendue que débute la découverte des ClCs en 1979. Michael White et Christopher Miller, essayaient d'incorporer dans les bicouches lipidiques le récepteur canal à l'Acétylcholine afin de le caractériser sur l'organe électrique de *Torpedo californica*. Contre toute attente, ce récepteur n'est pas trouvé dans la membrane, en revanche, ils identifient un canal anionique dont l'activité dépend du voltage et dont la sélectivité est forte pour le chlorure (White, Michael M; Miller, 1979; Jentsch, 2015). C'est en 1990 que Thomas Jentsch et ses collaborateurs clonent le premier gène *C/C* responsable de ce courant qu'ils appelleront *C/C-0*. La transcription de l'ADNc de 9kB en ARN et son injection en ovocyte de Xenope engendre une forte conductance au chlorure, caractéristique de l'activité du canal (Jentsch *et al.*, 1990; Jentsch, 2015). Ces travaux ont alors ouvert la voie pour la caractérisation des ClCs chez les mammifères mais aussi chez de nombreuses autres espèces.

##### b) Topologie des ClCs

L'insertion de CIC-0 en bicouche lipidique a permis l'observation de son activité sous forme de « burst » d'activité alternant avec des périodes d'inactivité. Quatre états sont alors observés pour le canal : l'état inactivé, et trois états activés avec des conductances respectives de 0, 10 et 20 pS dans les conditions testées. Ceci suggère la présence de deux pores distincts pouvant s'ouvrir indépendamment ou ensemble. La fermeture des deux pores conduit à une conductance nulle, l'ouverture d'un pore sur deux à 10 pS et enfin l'ouverture des deux pores à 20 pS. L'inactivation, grâce à un inhibiteur, de l'un des deux monomères aboutit à des périodes d'activité non plus constitués de 3 états mais de deux états de conductance 0 et 10 pS, confirmant le modèle d'un dimère (Miller and White, 1984).

L'obtention de la structure de deux ClCs procaryotes chez *Escherichia coli* (ClC-ec1) et *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (StClC), par diffraction à rayon X, confirme la présence de deux sous

unités identiques présentant un axe de symétrie perpendiculaire au plan de la membrane. Chaque sous unité à son propre pore et filtre de sélectivité. Chacune est constituée de 18 hélices alpha organisées selon une topologie complexe, mettant en contact la partie N terminale des hélices B à I avec la partie C terminale des hélices J à Q, donnant une organisation antiparallèle (Figure 14) (Dutzler *et al.*, 2002).

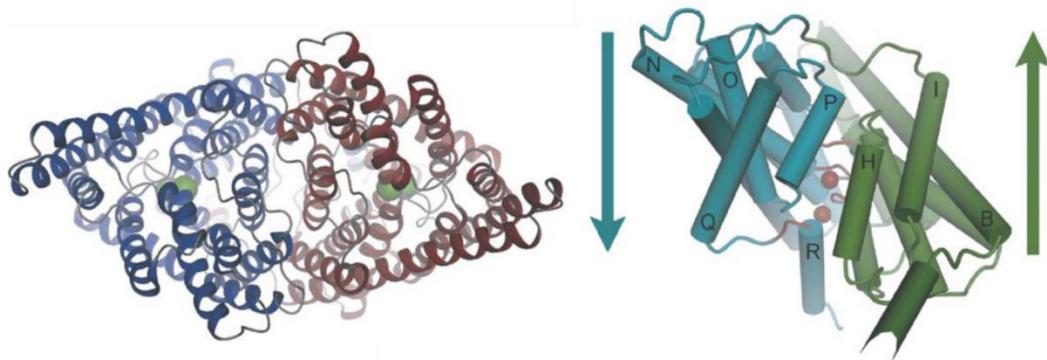


Figure 14: Structure de CIC-ec1 vue depuis la face extracellulaire (gauche). Les deux sous unités sont représentées en bleu et rouge et les ions fixés dans les filtres de sélectivité en vert. Vue détaillée d'une sous unité (droite) montrant l'organisation antiparallèle et les régions importantes pour la sélectivité (rouge) (modifié de (Dutzler, 2006)).

En plus des deux structures de CICs procaryotes décrites précédemment, celles de *Cyanobacterium Synechocystis*, de *Ralstonia metallidurans* mais également de CICs eucaryotes comme l'algue rouge (*Cyanidioschyzon merolae* : CmCIC) et le CIC bovin ont été résolues et montrent une forte conservation de la structure (Feng *et al.*, 2010; Jayaram *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2017; Abeyrathne and Grigorieff, 2017). Chez les CICs eucaryotes, on observe un domaine cytoplasmique C-terminal absent chez les procaryotes. En effet, au niveau cytoplasmique, deux domaines CBS (Cystathionine Beta Synthase 1 et 2) par sous unités sont présents (Figure 15). Ces domaines entrent en contact avec des hélices impliquées dans la fixation des ions chlorures (hélice D, ou R), ce qui suggère que des modifications conformationnelles des domaines CBS pourraient être transmises au domaine transmembranaire. Les domaines CBS sont également en contact avec l'interface entre les deux sous unités du transporteur ce qui suggère une influence sur les réarrangements concertés entre les deux sous unités et donc probablement sur le gating commun (paragraphe suivant). Ceci est confirmé par l'existence de nombreuses pathologies liées à une altération de l'interaction CBS-domaine transmembranaire (Feng *et al.*, 2010; Poroca *et al.*,

2017). Par ailleurs, ces domaines seraient également impliqués dans la localisation subcellulaire des ClCs puisque plusieurs études ont montrées qu'un domaine CBS2 tronqué ne permet plus le bon adressage des ClCs en question (Maduke *et al.*, 1998; Schwappach *et al.*, 1998; Carr *et al.*, 2003; Estévez *et al.*, 2004; Ludwig *et al.*, 2005; Peña-Münzenmayer *et al.*, 2005). Enfin la fixation de nucléotides impliqués dans la régulation des ClCs a lieu au niveau de ces motifs CBS (paragraphe B3b).

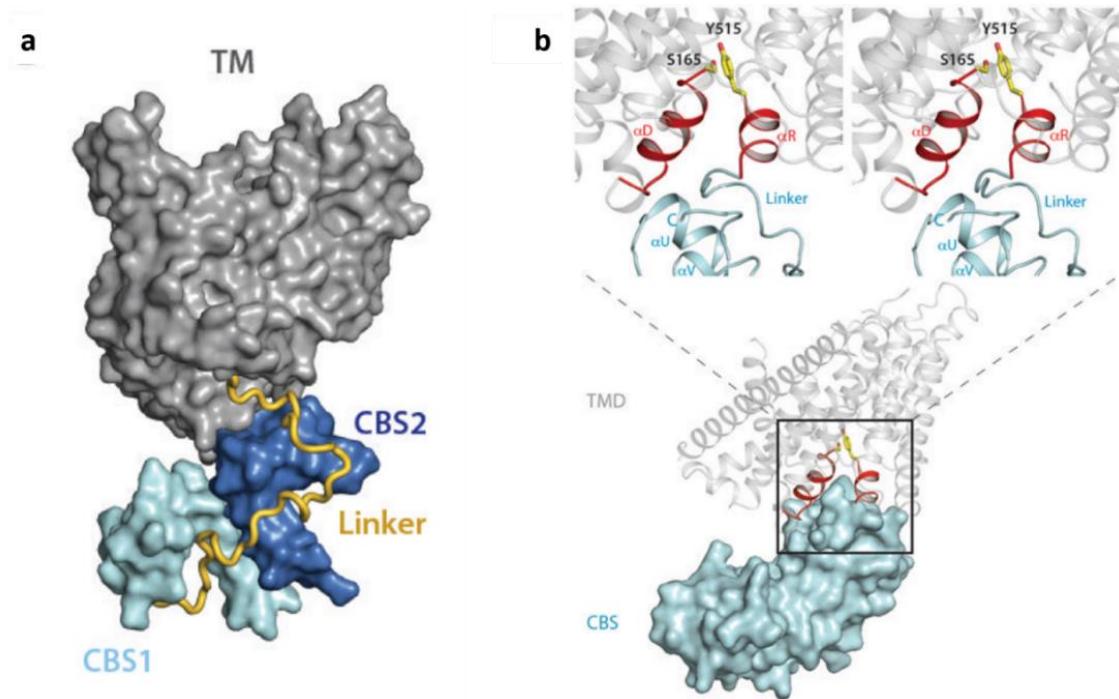


Figure 15: Structure d'une sous unité du CmClC représentant les domaines CBS (a) et agrandissement de l'interface entre le domaine transmembranaire et le domaine CBS (b) (modifié de (Feng *et al.*, 2010)).

c) La structure des ClCs à l'origine de leur sélectivité et gating

La topologie des ClCs est à l'origine de leurs caractéristiques. Leur structure antiparallèle favorise le rapprochement de quatre régions conservées au centre de la membrane et confère la sélectivité du transporteur ainsi que son gating. Ces régions (GSGIP, G(K/R) EGP, GXFXP et Tyr 445) sont toutes localisées dans la partie N terminale des hélices  $\alpha$  et pointent vers le site de fixation de l'ion (Figures 15 et 16) où leurs charges partielles positives créent un environnement électrostatique favorable à sa fixation.

Parmi ces régions, les séquences GSGIP, GXFXP ainsi que la Tyrosine 445 (ClC-ec1) forment le site dit central ( $S_{cen}$ ) qui confère la sélectivité du transporteur. A ce niveau les groupements amides de

l'hélice N, les résidus Ser 107 (GSGIP) et Tyr 445 participent à la coordination de l'ion chlorure. D'ailleurs, le remplacement de la sérine, au niveau de ce filtre de sélectivité, par une proline confère une plus forte sélectivité pour le nitrate que pour le chlorure (Zifarelli and Pusch, 2009; Wege *et al.*, 2010). Le site externe est localisé près du vestibule aqueux extracellulaire entre les hélices N et F et est constitué par les acides aminés G(K/R)EGP (hélice F) contenant le glutamate externe (gating glutamate, voir paragraphe C2a). Ce site externe peut soit, être occupé par la chaîne latérale de ce glutamate (état clos), soit par un ion chlorure (état ouvert) (Dutzler *et al.*, 2002; Dutzler *et al.*, 2003). Enfin, un glutamate du côté cytoplasmique ( $\text{Glu}_{\text{in}}$ , hélice H) fait partie du site dit « interne » localisé à l'interface du filtre de sélectivité et du vestibule aqueux. La fixation des anions au niveau de ces trois sites est indirectement visualisée grâce à la densité en électron, ce qui a permis de les délimiter (Figure 16).

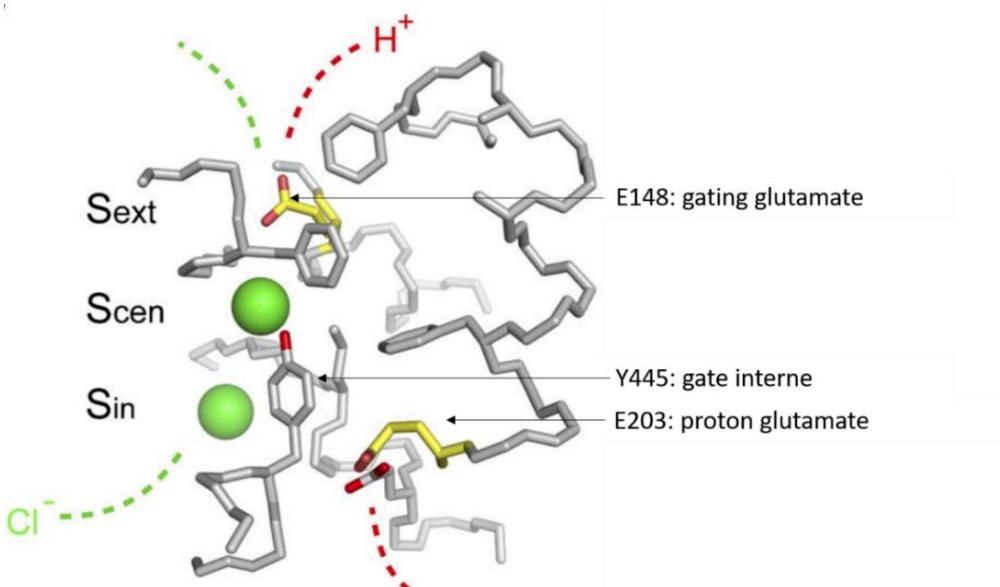


Figure 16: Représentation schématique de la localisation des trois résidus majeurs impliqués dans le couplage  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  chez CIC-ec1. Les ions chlorures sont les sphères vertes et les trajectoires supposées du  $\text{Cl}^-$  (vert) et du  $\text{H}^+$  (rouge) sont en pointillés (Modifié de (Accardi *et al.*, 2006)).

Chez les CICs, il existe un mécanisme appelé « fast gating » contrôlant la fermeture individuelle du pore de chaque sous unité mais aussi un mécanisme de « common gating ». Dès 1996, Ludewig et collaborateurs distinguent ce « fast gate » se fermant en quelques millisecondes de façon indépendante pour chaque pore et ce « common gate » se fermant en quelques secondes et nécessitant une action concertée des deux sous unités chez CIC-0 (Ludewig *et al.*, 1996; Poroca *et*

*al.*, 2017). En 2002, la résolution de la structure de ClCs procaryotes aboutit à l'identification du glutamate 148 chez *E. coli*, rapidement appelé « gating glutamate » correspondant au glutamate du site externe. Ce résidu fortement conservé projette sa chaîne latérale dans la voie de conduction de l'ion chlorure, bloquant ainsi le transport anionique, mais une rotation peut libérer l'accès à la voie de conduction de l'ion, il constitue donc un gate pour le transporteur. D'ailleurs, la mutation de ce résidu chez ClC-0 montre que le fast-gate reste constitutivement ouvert. Dès lors, Dutzler et ses collaborateurs formulent l'hypothèse que ce mouvement de rotation est initié par compétition de l'ion avec le groupement carboxyle du glutamate au niveau du site externe. Ceci expliquerait la dépendance de l'ouverture du canal à la concentration en chlorure (Dutzler *et al.*, 2002).

d) L'identification du premier ClC échangeur et le « mystère » du switch mécanistique

En 2004, Accardi et Miller identifient le premier ClC dont le mécanisme de transport est celui d'un échangeur et non d'un canal. En intégrant ClC-ec1 en bicouche lipidique, ils peuvent effectuer des enregistrements d'électrophysiologie démontrant une conductance, sélective pour le chlorure, dépendante du pH et indépendante du voltage. Ceci est en accord avec les hypothèses formulées alors décrivant ClC-ec1 comme un canal de fuite au chlorure activé par les protons. Cependant, le potentiel d'inversion mesuré étant distinct du potentiel de Nernst pour le chlorure, ceci suppose l'implication d'un autre ion durant le transport, les protons. Leur première hypothèse était celle d'une diffusion passive de chlorure et de proton à travers le pore. Cependant, en condition symétrique pour la concentration de proton, le potentiel d'inversion ne tend pas vers la valeur parfaite pour le chlorure. En revanche, quand le pH est modifié de façon asymétrique, une modification du potentiel est observée, ce qui traduit la présence d'un transport actif secondaire. La mesure des potentiels d'inversion dans différentes conditions expérimentales (variation de la teneur en chlorure et du pH) leur permet de déterminer une stoechiométrie de deux ions chlorure pour un proton transporté. Ils confirment ce résultat en mesurant directement, en liposome reconstitué, le transport de chlorure induit par un gradient de pH, et inversement pour les protons (Accardi and Miller, 2004). Par la suite, chez l'Homme, des canaux (HsClC-1, HsClC-2, HsClCKa et

HsClCKb) mais aussi des échangeurs (HsClC-3, HsClC-4, HsClC-5, HsClC-6 et HsClC-7) ont ainsi été identifiés.

2. Identification de résidus essentiels au couplage proton/anion chez les ClCs échangeurs

L'existence d'un mécanisme d'échange chez ClC-ec1 et d'un canal chez ClC-0, HsClC-1 et HsClC-2 en dépit de leur grande proximité structurale suggère que de petites modifications ont pu être accumulées au cours de l'évolution et conduire au « switch » mécanistique observé (Accardi and Miller, 2004; Accardi, 2015).

a) Des résidus conservés impliqués dans le couplage des ClCs  
Le gating glutamate

Comme mentionné en paragraphe C1c, le gating glutamate est impliqué dans le contrôle de l'ouverture des ClCs (Figure 16). Ce glutamate est conservé chez ClC-ec1 et ClC-0. L'effet de sa mutation en alanine peut cependant être mimé chez le ClC-0 sauvage par une baisse du pH, ce qui suggère que les mouvements de la chaîne latérale du glutamate sont contrôlés par son état de protonation (Dutzler *et al.*, 2003). Une mutation du gating glutamate en alanine (E148A) chez ClC-ec1, active le courant associé au transport du chlorure en liposome et rend ce courant insensible au pH. Ceci indique que le gating glutamate est bien requis pour le couplage des protons et du chlorure (Accardi and Miller, 2004). De nombreuses études ont par la suite confirmé cette observation. L'expression de HsClC-4 et 5 mutés pour le gating glutamate (E211A) en ovocyte de Xenope montre la même conductance au chlorure en absence de transport de proton, mesuré grâce à une sonde pH (Picollo and Pusch, 2005), tout comme l'expression de ClC-7 E245A en vacuole de cellule du mésophylle (Costa *et al.*, 2012). Enfin l'expression d'AtClCa E203A en ovocyte de Xenope conduit à une conductance anionique découpée des protons et à une modification de la sélectivité au nitrate en faveur du chlorure (Bergsdorf *et al.*, 2009).

Les détails moléculaires de l'implication du gating glutamate dans le couplage proton/anion sont progressivement découverts, notamment par élucidation de la structure du ClC eucaryote CmClC, un échangeur chlorure/proton, présent chez l'algues rouge *Cyanidioschyzon merolae*. Si la structure de ce ClC est globalement proche de celle d'*E. coli*, son étude révèle la possibilité pour le résidu gating glutamate d'occuper le site central de conduction ionique quand les sites externes

et internes sont occupés par le chlorure (Feng *et al.*, 2010; Vien *et al.*, 2017). L'accès du glutamate au site central chez CmCIC a été démontré comme nécessaire au transport des protons au sein de l'échangeur. L'hypothèse formulée dans cette étude est que ce résidu transfère les protons de la solution extracellulaire vers le site central probablement via un mécanisme de protonation/déprotonation. Un tel cycle de protonation/déprotonation est couteux en énergie et plusieurs études suggèrent que la déprotonation du résidu est favorisée par une compétition/déstabilisation entre le chlorure et le groupement carboxyle du gating glutamate (Lee *et al.*, 2016; Feng *et al.*, 2012).

### *Le proton glutamate*

L'existence d'un résidu glutamate impliqué dans le transfert de proton depuis l'espace extracellulaire suggère la présence d'un résidu sur la face interne de l'échangeur et pouvant transférer les protons à l'espace intracellulaire. Chez ClC-ec1, le résidu glutamate 203 a été identifié enfoui à proximité de l'espace intracellulaire (Figure 17) et est indispensable au couplage chlorure-proton. Une mutation de ce résidu chez ClC-ec1 (E203Q) conduit à un découplage des transports de protons et de chlorure (Accardi *et al.*, 2005). De façon surprenante, la substitution du proton glutamate par un résidu non protonable chez ClC-4 et ClC-5 et AtClCa abolit complètement le transport des protons mais aussi du chlorure. La conductance au chlorure peut être restaurée par une mutation additionnelle du gating glutamate (Zdebik *et al.*, 2008; Bergsdorf *et al.*, 2009). Ceci suggère que le proton glutamate est impliqué, chez ces ClCs, dans le transfert des protons depuis l'espace intracellulaire vers le gating glutamate, dont la protonation est requise au transport du chlorure (paragraphe précédent). La mutation du gating glutamate engendre son mouvement hors de la voie de conduction, sans nécessité de protonation, et permet donc à nouveau le passage du chlorure (Zdebik *et al.*, 2008). La protonation du glutamate E203 n'étant requise que pour le transfert de proton alors que celle du résidu E148 est nécessaire pour le transfert de proton et de chlorure, ceci renforce l'idée que les voies de transport des proton et des chlorures puissent être communes jusqu'au site central puis bifurquer depuis le centre vers l'espace intracellulaire (Accardi *et al.*, 2005; Lim and Miller, 2009).

Contrairement au glutamate 148, exposé à la solution externe, le glutamate 203 est enfoui au sein de la protéine et donc difficile d'accès. Considérant que le gating glutamate échange des protons avec l'espace extracellulaire et le proton glutamate avec l'espace intracellulaire, comment les protons de la solution intracellulaire accèdent-ils au glutamate interne ? En 2012, Lim et collaborateurs identifient à l'interface entre la partie aqueuse et le proton glutamate, un résidu conservé : E202. Une mutation de ce résidu en tyrosine, résidu encombrant, empêche l'accès des protons au glutamate interne et limite le taux de transport de l'échangeur, il joue donc un rôle d'organisateur des molécules d'eau contrôlant l'accès des protons au glutamate 203 (Lim *et al.*, 2012).

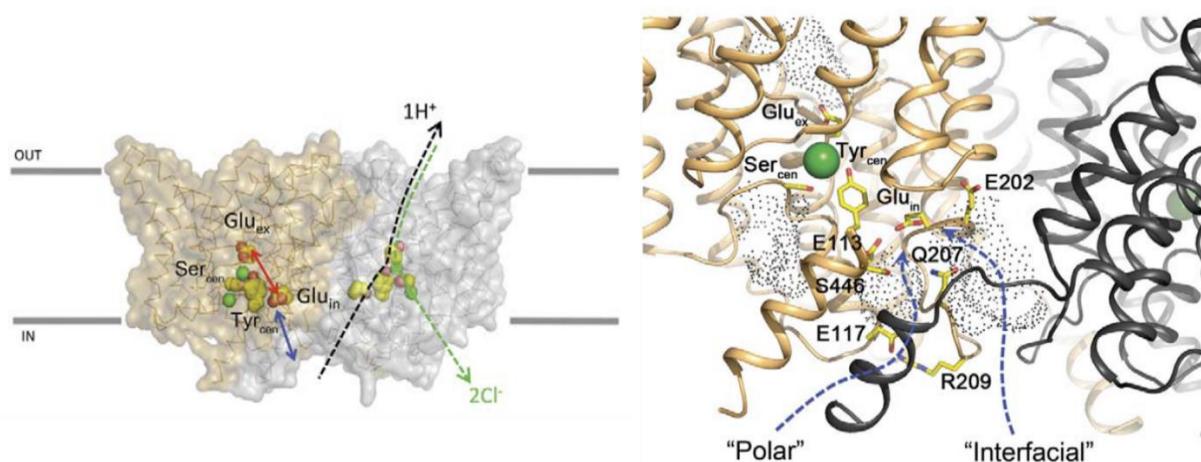


Figure 17: Représentation de la voie de transport des ions et de l'accessibilité à la solution interne chez CIC-ec1. Les deux dimères sont représentés de différentes couleurs, les distances entre résidus clés sont indiquées par des doubles flèches et les ions chlorures par des cercles verts (gauche). Agrandissement de la face intracellulaire à proximité du proton glutamate, les voies possibles d'accès des protons sont figurées par des flèches bleues (droite) (Lim *et al.*, 2012)

#### *Le gate interne : Tyrosine*

Le modèle présentant le gating glutamate comme l'unique gate de l'échangeur est problématique puisque cela suggère qu'à un moment du cycle les faces intracellulaires et extracellulaires sont en continuité. Or, cette configuration serait à l'origine d'une dissipation du gradient ionique en totale contradiction avec le mécanisme d'échange. Une barrière cinétique interne supposée serait constituée des résidus Ser107 (paragraphe C1c) et Tyr445 chez CIC-ec1 formant une constriction stérique limitant la vitesse de transport du chlorure et donc ne permettant le passage que de deux

ions durant le cycle de protonation/déprotonation du gating glutamate (Feng *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 2012). La substitution du résidu Tyr445 par des acides aminés chargés ou de petite taille (A, L, E ou H) provoque un découplage du transport d'intensité variable ainsi qu'une augmentation de la sélectivité au chlorure. Le mutant Y445A est fortement découplé ce qui se reflète par un potentiel d'inversion proche du potentiel de Nernst pour le chlorure mais un faible transport de proton est toujours mesuré (Accardi *et al.*, 2006). Ces mutants présentent toujours un fonctionnement de type échangeur avec une stœchiométrie  $2\text{Cl}^-:\text{1H}^+$  mais avec un flux de chlorure découplé additionnel. On peut supposer que la substitution de la tyrosine par des résidus de plus petite taille engendre une disparition de la constriction entre le site central et l'espace intracellulaire engendant une fuite de chlorure et/ou une baisse d'affinité pour ce dernier se reflétant par une plus faible occupation du site central (Walden *et al.*, 2007).

b) Hypothèses actuelles sur le cycle de transport des ClCs

Récemment Basilio et collaborateurs (2014) ont proposé un nouveau modèle basé sur leurs travaux ainsi que sur les études déjà publiées (Figure 18). Ce cycle débute par un changement de conformation provoquant la transition depuis l'état fermé à l'ouverture du gate interne (Tyr) permettant la pénétration de deux ions chlorures depuis l'espace intracellulaire (1→3). Ceci engendre le déplacement du gating glutamate (E148 chez ClC-ec1) et favorise sa protonation du côté externe puis la fermeture du gate interne (2→4). Le gating glutamate protonné pénètre à nouveau la voie de conduction ionique (5) et le proton est transféré au glutamate interne (6) (E203 chez ClC-ec1) puis à la solution intracellulaire (Basilio *et al.*, 2014; Accardi, 2015). Ce modèle repose sur plusieurs suppositions : une stœchiométrie  $2\text{Cl}^-/\text{1H}^+$ , l'existence de trois conformations pour le gating glutamate, les résidus E148 et Y445 forment les deux gates, l'ouverture concertée des gates est permise par un mouvement translationnel de l'hélice O transmis à Y445, les fixations des ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{H}^+$  sont synergiques et enfin le proton glutamate est responsable de l'échange des protons avec la solution intracellulaire. La nouveauté de ce modèle est le mouvement de l'hélice O, permettant une fixation simultanée des  $\text{Cl}^-$  et  $\text{H}^+$  tout en empêchant une fuite de chlorure grâce à la transmission du mouvement au gate interne (Y445) ici considéré comme physique. L'avantage de ce modèle est qu'il explique le maintien de la stœchiométrie quel que soit le pH, puisque la

tyrosine interne n'est pas modifiée en réponse au pH, ainsi que le découplage provoqué par substitution de la Tyr445 par un plus petit résidu (Accardi, 2015).

Récemment, Vien et collaborateurs (2017) ont décrit une conformation, non présente dans le modèle de Basilio et al (2014), dans laquelle le  $E_{gate}$  est piégé entre deux ions chlorures occupant les sites internes et externes (Vien *et al.*, 2017). De plus, une conformation ouverte vers l'extérieur mais occlue a été identifiée chez CIC-ec1 par RMN. En effet, suite à la protonation du gating glutamate, celui-ci sort de la voie de conduction mais ceci ne permet pas le passage des ions chlorures en raison d'une constriction, l'état est occlu. En réponse à la protonation, le réarrangement des hélices N et P permet alors le passage à un état ouvert vers l'extérieur (Khantwal *et al.*, 2016). Enfin, Park et collaborateurs ont récemment résolu la structure du canal CIC- $\kappa$  et observent, d'une part un remplacement du glutamate gate par une valine, ce qui engendre une ouverture de la voie de conduction ionique vers l'extérieur. D'autre part, la sérine centrale adopte une conformation, non plus en direction du site de fixation central, mais vers le cytoplasme. Ceci serait à l'origine de la conductance plus rapide aux ions chlorures de ce transporteur, car la barrière cinétique supposée, formé par les résidus serine et tyrosine est absente (Park *et al.*, 2017).

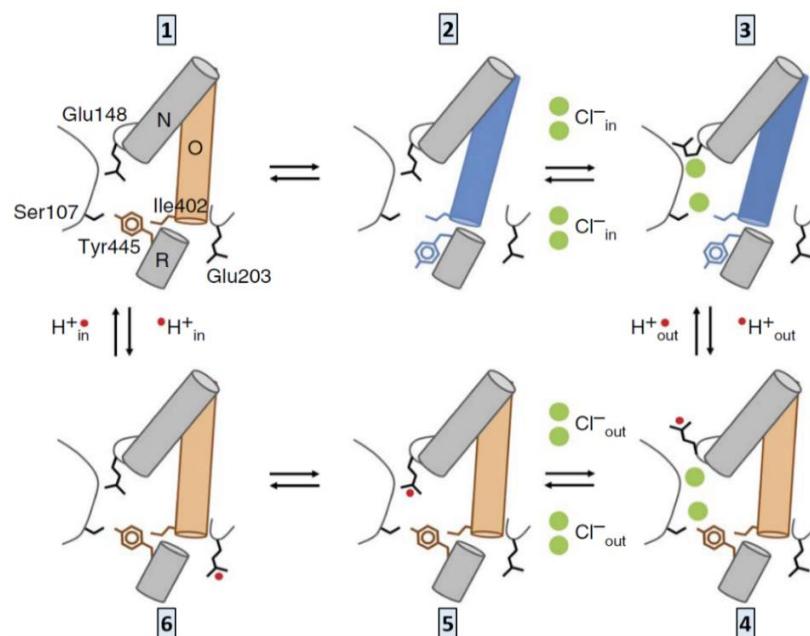


Figure 18: Modèle de transport chez les échangeurs ClCs. La chronologie utilisée dans le texte est indiquée par des chiffres, la modification de couleur de l'hélice O traduit son mouvement translationnel (modifié de (Accardi, 2015; Basilio *et al.*, 2014)).

c) Le canal, un échangeur dysfonctionnel ?

Les ClCs ont longtemps été considérés comme des canaux sélectifs au chlorure, c'est pourquoi la caractérisation de ClC-ec1 en tant qu'échangeur a été une surprise (Accardi and Miller, 2004). Le plus étonnant est que les canaux et échangeurs ne peuvent être distingués sur le plan structural quelle que soit la résolution dont on dispose. La distinction entre un canal et un échangeur peut être vue de façon schématique par le nombre de gate présent. Chez les canaux, le plus souvent, un gate est présent et s'ouvre en réponse aux signaux environnementaux, alors que dans un échangeur, deux gates, dont l'ouverture et la fermeture sont alternées, doivent être présents (Gadsby, 2009). Selon le modèle présenté précédemment, le premier gate serait le glutamate externe (E203 chez ClC-ec1) et le second la tyrosine 445, un gate physique (Basilio *et al.*, 2014). Dans leur étude, Basilio et al (2014) suggèrent qu'une mutation du gate interne pourrait être à l'origine des ClCs canaux (Figure 19).

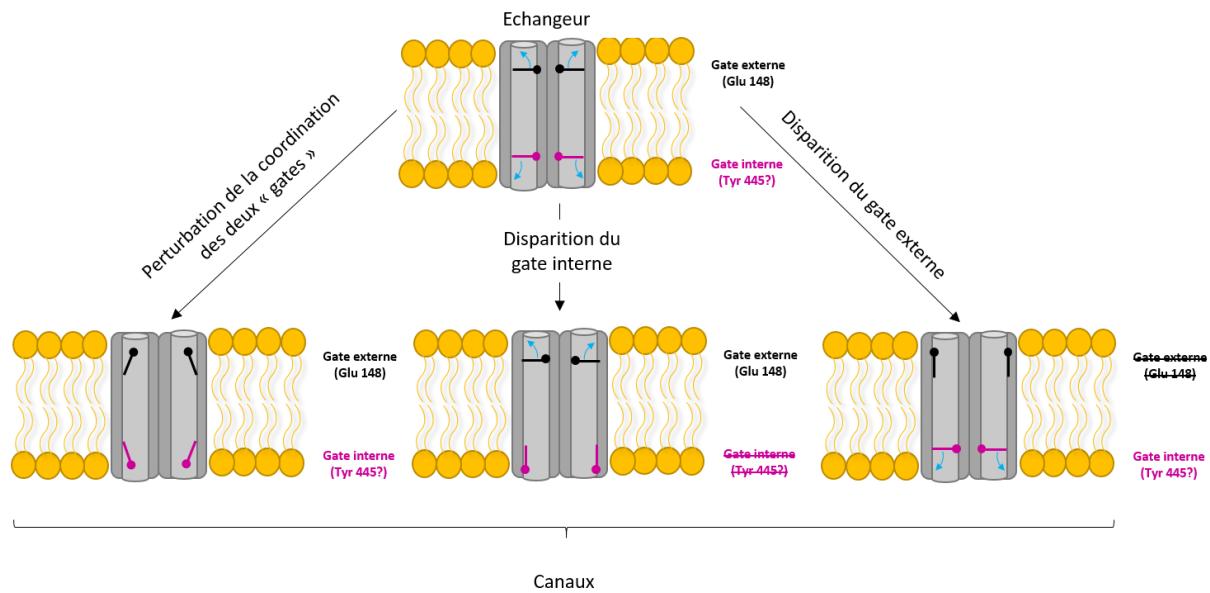


Figure 19: Représentation schématique des événements pouvant conduire au switch mécanistique entre échangeur et canal chez les ClCs. Les résidus sont numérotés considérant ClC-ec1.

Cependant la mutation simultanée de ces deux gates ne permet pas d'observer un taux de transport aussi important que dans le cas des canaux ClC-1 ou ClC-0. Il n'est donc pas exclu que le second gate soit une barrière cinétique due à un encombrement stérique formé de la sérine et de la tyrosine (Feng *et al.*, 2012). Il est tentant d'imaginer qu'une perturbation d'un des gates ou du timing d'ouverture des gates pourrait convertir un échangeur en canal. Les canaux seraient donc

issus d'échangeurs dans lesquels un gate est devenu incapable d'empêcher un flux passif de chlorure (Gadsby, 2009).

Une telle hypothèse est appuyée par le fait que les ClCs canaux transportent encore des protons et que leur gating est dépendant du pH. En effet, il est connu depuis longtemps que le gating chez ClC-0 est modulé par la concentration en proton (Hanke and Miller, 1983). De plus, comme mentionné précédemment (paragraphe C1b), les ClCs présentent trois niveaux de conductances, dûs à la présence de deux pores fermés individuellement par fast gating et collectivement par common gating. Contrairement à ce qui est attendu, ces inter conversions ne sont pas équiprobables (Richard and Miller, 1990), signe que le système n'est pas à l'équilibre. Pour maintenir un tel déséquilibre, une source d'énergie est requise. Par une approche d'électrophysiologie, réalisée en ovocyte de Xenope sur le canal ClC-0, cette source d'énergie a été identifiée comme étant le gradient électrochimique des protons (Lísal and Maduke, 2008). Ceci appuie le fait que la forme ancestrale de ClC-0 pouvait être un échangeur devenu perméable au flux passif de chlorure dans l'une de ses conformations (Lísal and Maduke, 2008; Chen and Hwang, 2008).

### 3. Les ClCs, des échangeurs ou des canaux ?

L'apparition des canaux à partir d'échangeurs ayant subi une altération au cours de l'évolution est donc une hypothèse séduisante. Si un tel switch mécanistique a eu lieu, chez quelle espèce peut-on l'observer ? Depuis la découverte du 1<sup>er</sup> ClC chez *Torpedo marmorata* (Jentsch *et al.*, 1990), de nombreuses protéines appartenant à la famille des ClCs ont été identifiées chez les procaryotes, les mammifères et les plantes (Figure 20).

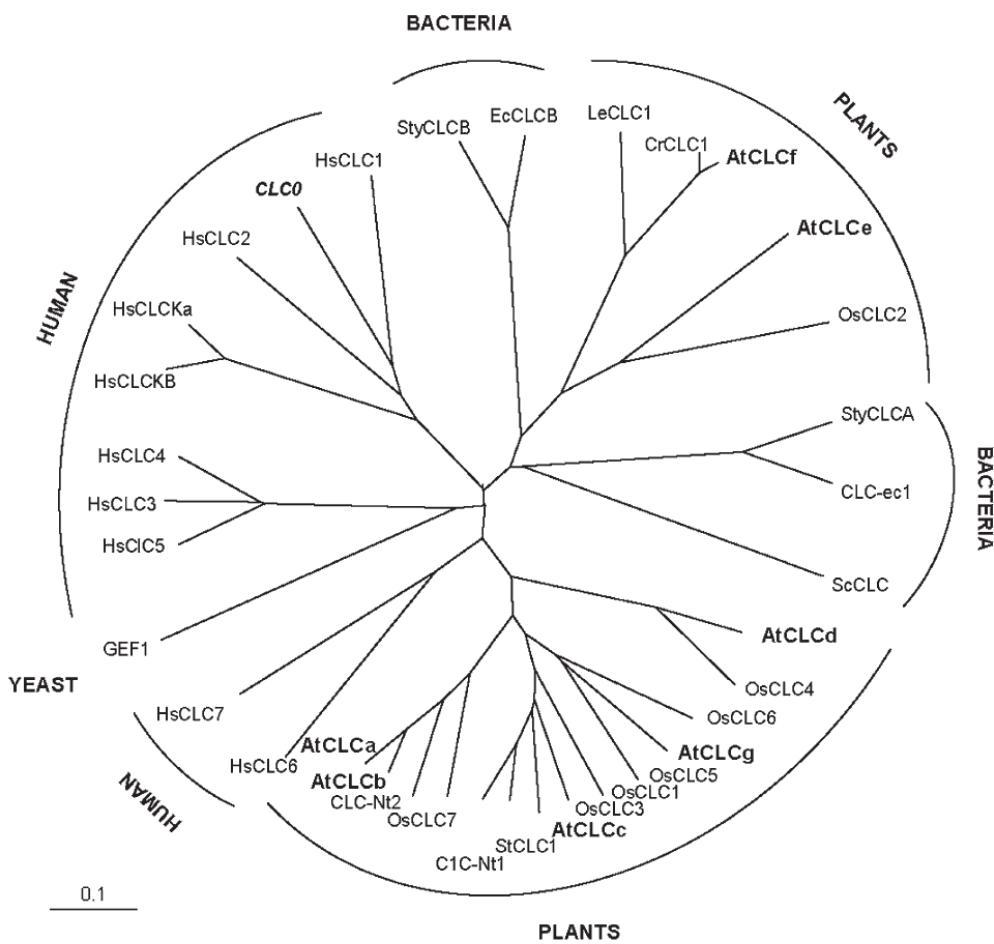


Figure 20: Dendrogramme représentant les degrés de similarité entre les membres de la famille des CLCs. CIC-0 : *Torpedo marmorata* ; Hs : *Homo sapiens* ; Sty : *Salmonella typhimurium* ; GEF1 : *Saccharomyces cerevisiae* ; CIC-ec1 et EcCLCB : *Escherichia coli* ; SCIC : *Synechocystis sp* ; Nt : *Nicotiana tabacum* ; At : *Arabidopsis thaliana* ; St : *Solanum tuberosum* ; Le : *Lycopersicon esculentum* ; Os : *Oryza sativa*. Les CLCs de l'espèce *Arabidopsis thaliana* sont en gras (Marmagne *et al.*, 2007).

a) Les CLCs procaryotes

Les CLCs procaryotes étant les plus simples à exprimer et purifier, ils ont été utilisés pour des études structures/fonctions. Chez *Escherichia coli*, comme vu dans les paragraphes précédents, des études d'électrophysiologie ont montré que le transport par CIC-ec1 est activé à faible pH (Abeyrathne *et al.*, 2016) et que cette protéine est un échangeur chlorure/proton (Accardi and Miller, 2004). Chez cette bactérie, un mécanisme de résistance au stress acide existe. L'acidité engendre un excès de charges positives dans la bactérie qui sera en partie contrebalancé par l'entrée de chlorure et la sortie de proton via CIC-ec1. En ce qui concerne les autres procaryotes,

si la structure du CIC de Salmonelle est connue, son mode de transport n'est pour l'instant pas connu.

b) Les ClCs des mammifères

Chez les mammifères, des canaux mais aussi des échangeurs ont été découverts (Poroca *et al.*, 2017; Jentsch, 2015; Abeyrathne *et al.*, 2016). Quatre canaux ont été identifiés, CIC-1, CIC-2, CIC-Ka et CIC-Kb, tous localisés sur la membrane plasmique. Ces protéines sont exprimées dans divers tissus. CIC-1 est présent sur les muscles squelettiques, où il participe à la stabilisation du potentiel de membrane. CIC-2 est très largement exprimé et participe notamment aux transports épithéliaux tout comme CIC-Ka et Kb exprimés au niveau du rein et de l'oreille. Cinq échangeurs ont été identifiés chez les mammifères, localisés dans les compartiments intracellulaires de type lysosomes ou endosomes. Les CIC-3 et 4 présentent une large localisation (cerveau, foie, rein) et sont impliqués dans l'homéostasie ionique des endosomes, tout comme CIC-5 (Picollo and Pusch, 2005; Novarino *et al.*, 2010) exprimé dans le rein et l'intestin et CIC-6 exprimé dans les endosomes neuronaux. Si leurs rôles dans le maintien de l'homéostasie ionique et leurs localisations intracellulaires sont similaires, des mutations dans ces divers ClCs aboutissent à des pathologies diverses corrélées avec leur expression tissulaire, comme la maladie de Dent pour CIC-5 (Novarino *et al.*, 2010). Enfin, CIC-7 est également un antiport (Costa *et al.*, 2012; Graves *et al.*, 2008) exprimé sur les lysosomes et largement répandu au niveau tissulaire participant à l'acidification de la zone de résorption osseuse (Weinert *et al.*, 2010). La présence de ces deux types de transporteur démontre que, si les canaux résultent d'une modification des échangeurs, un tel événement évolutif a pu avoir lieu chez les mammifères.

c) Les ClCs chez les plantes

Le premier CIC de plante cloné est le CIC de tabac, CIC-Nt1, dont les courants mesurés après expression en ovocyte de Xenope sont similaires à ceux mesurés pour CIC-0 et CIC-2, ce CIC est donc suggéré comme un canal sélectif pour le chlorure (Lurin *et al.*, 1996). Suite à cela, par homologie avec les autres ClCs, les premiers membres présents chez *Arabidopsis thaliana* sont clonés (a-d). Afin de cerner le ou les rôle(s) de chacun de ces ClCs, une approche rapide et efficace est la complémentation fonctionnelle d'un mutant de *Saccharomyces cerevisiae* déficient pour la

protéine ScClC, encore nommé GEF1, présentant un retard de croissance (Lv *et al.*, 2009; Hechenberger *et al.*, 1996; Gaxiola *et al.*, 1998). Dans les conditions testées, AtClCd et AtClCc complémentent le phénotype de croissance alors qu'AtClCa et AtClCb ne le font pas. De plus, dans certaines des conditions testées, ClCf complémente ce phénotype (Marmagne *et al.*, 2007), ceci indique une disparité fonctionnelle entre ces ClCs.

Chez *Arabidopsis thaliana*, sept membres de la famille des ClCs ont été identifiés et, à la différence des mammifères, ils sont tous exprimés au niveau des compartiments intracellulaires (vacuole, Golgi et chloroplaste) (Figure 21).

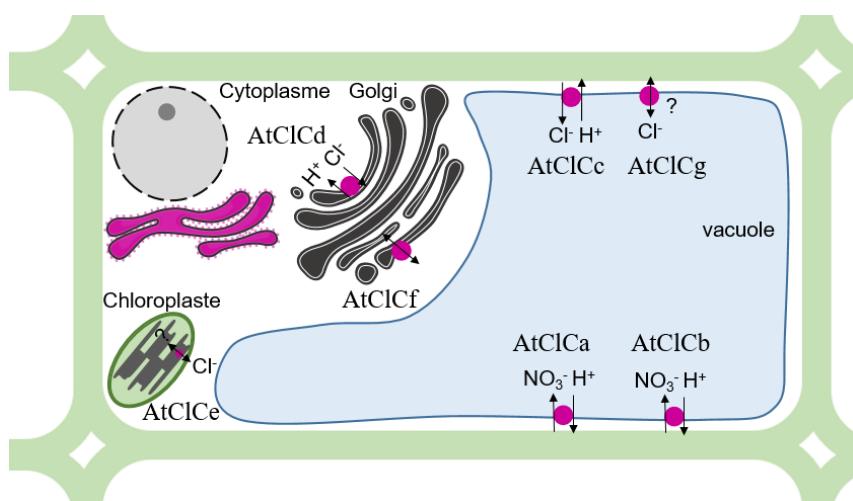


Figure 21: Localisation subcellulaire des ClCs chez *Arabidopsis thaliana*

AtClCb partage une homologie d'environ 80% avec AtClCa (paragraphe B), il s'agit également d'un échangeur vacuolaire  $2\text{NO}_3^-/\text{H}^+$ . Cependant à la différence de son homologue, il est exprimé durant les phases précoces de la croissance dans les racines et hypocotyles (Von Der Fecht-Bartenbach *et al.*, 2010) et montre un faible courant anionique entrant. Ceci suggère qu'il serait plutôt impliqué dans la sortie des anions de la vacuole. De façon surprenante, un mutant KO pour AtClCb ne montre aucun phénotype clair, ce qui suggère une redondance fonctionnelle avec AtClCa. L'analyse du contenu en nitrate chez le double mutant *clca clcb* a récemment confirmé cela (S. Filleur, données personnelles). Parmi les ClCs localisés sur la membrane vacuolaire, AtClCc et g sont impliqués dans la résistance au stress salin (Jossier *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2016). AtClCc est fortement exprimé dans les feuilles (Hechenberger *et al.*, 1996), plus précisément dans les cellules de garde, ainsi que dans le pollen. En accord avec sa localisation, il est impliqué dans

l'ouverture et la fermeture stomatique induite par l'ABA spécifiquement en présence de chlorure. Ceci se répercute à l'échelle de la plante entière par une température foliaire plus élevée. De plus, les plantes mutantes pour AtClCc présentent une hypersensibilité au NaCl, ce qui suggère une sélectivité pour les ions chlorures. D'autre part, la conservation des gating et proton glutamates (table ci-après) plaide en faveur d'un mécanisme de type antiport (Zifarelli and Pusch, 2010). AtClCg présente une analogie de 62% avec AtClCc, il est exprimé sur la membrane vacuolaire dans les cellules du mésophylle de jeunes plantules puis plus tardivement dans les tissus vasculaires et les hydathodes (Nguyen *et al.*, 2016). Lors d'un stress NaCl, un mutant KO pour AtClCg montre une diminution de la biomasse et une accumulation de chlorure dans les parties foliaires, ce qui suggère une implication dans l'homéostasie chlorure. Bien que remplissant des fonctions similaires, AtClCg et AtClCc ne présentent pas des profils d'expression similaires et le double mutant ne montre aucune amplification du phénotype de sensibilité au stress salin, ce qui indique qu'ils font tous deux partie d'un réseau de réponse au stress salin mais remplissent des rôles non redondants. Ces données renforcent l'idée d'une sélectivité pour le chlorure chez AtClCg, mais aucune donnée d'électrophysiologie ne permet de dire s'il s'agit d'un canal ou d'un échangeur sélectif pour cet ion. Cependant, au niveau de sa séquence AtClCg montre une absence de gating glutamate, remplacé par une alanine, et une sérine dans le filtre de sélectivité, ceci suggère un possible transport de type canal à chlorure (Zifarelli and Pusch, 2010) (Tableau 1).

Protéine	Localisation subcellulaire	Sélectivité supposée	Résidus dans le filtre de sélectivité	Gating glutamate (E203)	Proton glutamate (E270)
AtClCa	Vacuole	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	GPGIP	E	E
AtClCb	Vacuole	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	GPGIP	E	E
AtClCc	Vacuole	Cl <sup>-</sup>	GSGIP	E	E
AtClCd	Golgi	Cl <sup>-</sup>	GSGIP	E	E
AtClCe	Chloroplaste	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / Cl <sup>-</sup>	ESAGK	E	S
AtClCf	Golgi	Cl <sup>-</sup>	EILDQ	E	T
AtClCg	Vacuole	Cl <sup>-</sup> ?	GSGIP	A	E

Tableau 1: Vue d'ensemble de la localisation, du mode de transport et de la conservation des résidus importants chez les ClCs d'*Arabidopsis thaliana* (modifié de (Zifarelli et Pusch, 2010; Wege *et al.*, 2010)).

En plus d'AtClCb et a, un troisième membre a été identifié comme ayant un rôle dans l'homéostasie du nitrate, il s'agit d'AtClCe. A la différence des deux précédents ClCs, AtClCe est exprimé au niveau de la membrane des thylakoïdes dans les chloroplastes, par voie de conséquence son expression est forte au niveau des organes chlorophylliens mais aussi dans les siliques (Marmagne *et al.*, 2007; Monachello *et al.*, 2009). Ce dernier est plus fortement apparenté aux ClCs procaryotes. Les mutants KO pour ce gène présentent un phénotype photosynthétique, qui pourrait être dû au rôle d'AtClCe dans la dépolarisation des thylakoïdes. Ceci nécessite le mouvement d'ions chlorures entre le stroma et les thylakoïdes (Herdean *et al.*, 2016). Ainsi, en raison de ce phénotype et de sa séquence (pas de proton glutamate et absence du filtre de sélectivité), AtClCe est proposé comme étant un canal ayant une affinité pour le chlorure. Ces résultats remettent en perspective une précédente étude démontrant l'implication de ce ClC dans le métabolisme azoté: chez le KO la teneur en nitrate de plantules est diminuée de 56% et la teneur en nitrite augmentée de 74% (Monachello *et al.*, 2009). Un tel effet sur le nitrate pourrait résulter d'une altération indirecte de l'expression des ClCs impliqués dans l'échange nitrate/proton. A l'heure actuelle, aucune étude d'électrophysiologie n'a permis de confirmer cette hypothèse.

Parmi les ClCs adressés au Golgi, AtClCf présente une homologie avec AtClCe (41%). Son rôle reste incertain puisqu'aucune étude d'électrophysiologie n'a pu être effectuée en raison de sa localisation subcellulaire, mais sa séquence suggère qu'il pourrait s'agir d'un antiport  $2\text{Cl}^-/1\text{H}^+$  (Zifarelli and Pusch, 2010). AtClCd est exprimé dans les feuilles au niveau de la membrane du Golgi, un KO pour ce ClC ne montre aucun phénotype lié au chlorure ou au nitrate, ce qui suggère une absence d'implication ou une redondance fonctionnelle entre ClCs sur ce compartiment (Fecht-Bartenbach *et al.*, 2007). AtClCd co-localise avec VHA a1, une sous unité de la V-ATPase. Une inhibition de la V-ATPase, supposée inhiber l'elongation de l'hypocotyle, montre un phénotype amplifié chez le KO pour AtClCd, ce qui suggère une coopérativité fonctionnelle entre les deux protéines. De plus, AtClCd serait impliqué dans l'inhibition du système de reconnaissance des PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) lors de la réponse immunitaire (Guo *et al.*, 2014). Ceci se fait probablement de façon indirecte via une action sur le pH du réseau golgien dont on sait qu'il est impliqué dans le trafic membranaire du récepteur FLS2 reconnaissant les PAMPs.

Bien qu'aucune étude d'électrophysiologie n'ait été faite, la présence du proton et du gating glutamate suggère qu'il pourrait s'agir d'un échangeur et, son expression étant stimulée lors d'un stress salin (Jossier *et al.*, 2010), sa sélectivité pourrait être en faveur du chlorure.

### D. Objectif du travail de thèse

Chez *Arabidopsis thaliana*, tous les ClCs les mieux caractérisés sont des échangeurs anions/protons (Zifarelli and Pusch, 2010; Von Der Fecht-Bartenbach *et al.*, 2010; De Angeli *et al.*, 2006). Contrairement à ce qui est observé chez les mammifères, tous sont localisés sur les compartiments intracellulaires (Lv *et al.*, 2009). De façon intéressante, les ClCs impliqués dans le stockage de nitrate dans la vacuole (AtClCa et b) sont tous deux des transporteurs actifs secondaires nécessitant un couplage avec les protons pour faire entrer le nitrate dans la vacuole. Ceci s'explique notamment par la présence dans leur séquence du résidu gating glutamate externe (E203 chez AtClCa), du proton glutamate (E270 chez AtClCa) et de la tyrosine 563. Considérant l'importance de la constitution d'un stock de nitrate conséquent dans la vacuole sur le plan physiologique (McIntyre, 1997), il est intéressant de s'interroger sur la signification de la conservation d'un échangeur nitrate/proton au niveau de la membrane vacuolaire. Le transport actif secondaire est-il absolument requis pour le fonctionnement de la vacuole et son impact sur la physiologie de la plante ? Quelles auraient pu être les conséquences de l'évolution d'un canal au niveau de la membrane vacuolaire sur le transport du nitrate? Considérant le double rôle du nitrate en tant que nutriment et en tant qu'osmoticum, quelles sont les conséquences d'une telle modification sur l'homéostasie de l'azote mais aussi de l'eau ?

Afin de mieux comprendre la conservation d'un échangeur pour AtClCa, il nous faut générer des plantes au sein desquelles cet échangeur est converti en canal et en étudier la physiologie. La réalisation de ces plantes avec un canal à nitrate sur la membrane vacuolaire peut théoriquement être réalisée en mutant le résidu glutamate 203 (gating) en un résidu non protonable (Bergsdorf *et al.*, 2009) comme lalanine. C'est donc ce que nous avons effectué, et sur les plantes ainsi générées, des analyses physiologiques permettant de comprendre l'évolution de la gestion du nitrate et de l'homéostasie hydrique ont été effectuées. Cette partie nous a permis de mieux comprendre l'impact de la présence d'un échangeur, et non d'un canal, sur la membrane

vacuolaire et donne un début d'explication à la conservation d'un tel mécanisme au cours de l'évolution chez des êtres vivants, que sont les plantes, confrontés en permanence à des fluctuations environnementales.

Considérant les études effectuées sur les autres CICs et notamment sur le CIC eucaryote CmCIC, il est clair que le transport de protons, nécessaire au couplage au sein du transporteur, requiert la présence non seulement du gating glutamate mais aussi du proton glutamate E270 (Feng *et al.*, 2012; Accardi *et al.*, 2005; Lim and Miller, 2009). Ce résidu est conservé chez AtClCa et est probablement responsable du transport des protons du côté vacuolaire (Zifarelli and Pusch, 2010). Lors du cycle de transport, ces deux résidus subissent des modifications concertées qui sont probablement requises au transport du nitrate. Afin de comprendre l'implication respective de ces résidus dans le couplage chez AtClCa, une mutation du proton glutamate en résidu non protonable (alanine) a été effectuée. Ce mutant, ainsi que le double mutant pour les proton et gating glutamates, ont été sélectionnés et quelques analyses physiologiques préliminaires ont été réalisées.

# Résultats

# Chapitre I : Conséquences physiologiques d'une mutation du gating glutamate chez AtClCa

Dans ce premier chapitre de résultats, une analyse physiologique a été effectuée sur des plantes présentant une mutation du gating glutamate en alanine. L'objectif était de comprendre l'importance du mécanisme d'échange au sein du transporteur AtClCa pour la physiologie de la plante en condition standard ou de stress abiotique. Cette étude apporte donc des éléments permettant de supposer que l'absence d'évolution d'un canal sélectif pour le nitrate au niveau tonoplastique peut s'expliquer par la stabilité conférée par le mécanisme d'échange face à un environnement variable. Ce chapitre se divise en deux parties. La première est présentée sous forme de manuscrit proposé pour publication. Dans une seconde partie, des résultats complémentaires sont analysés afin d'approfondir la compréhension des différents phénotypes observés en A.

A. Physiological importance of the exchange mechanism conservation in AtClCa, a nitrate/proton vacuolar transporter in *Arabidopsis thaliana*

## Physiological importance of the exchange mechanism conservation in AtClCa, a nitrate/proton vacuolar transporter in *Arabidopsis thaliana*

Julie Hodin<sup>1,2</sup>, Christof Lind<sup>1</sup>, Alexis De Angeli<sup>1</sup>, Michele Bianchi<sup>1,3</sup>, Fadi Abou-Choucha<sup>4</sup>, Mick Bourge<sup>1</sup>, Sébastien Thomine<sup>1</sup> and Sophie Filleur<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Université Paris-Sud, F-91198 Gif-sur-Yvette, France; <sup>2</sup>Université Paris 7 Denis Diderot, UFR Sciences du Vivant, 35 rue Hélène Brion, F-75205 Paris Cedex 13, France; <sup>3</sup>Université Paris-Est-Créteil-Val-de-Marne, 61 avenue du Général de Gaulle, 94010 Créteil Cedex France; <sup>4</sup>Institute of Plant Sciences Paris-Saclay (IPS2), CNRS, INRA, Universités Paris-Sud, Evry and Paris-Diderot, Sorbonne Paris-Cité, University of Paris-Saclay, 91405 Orsay, France.

**Important note:** The electrophysiological characterization is not complete. Some experiments need to be repeated and complementary experiments will be performed as well. The preliminary results presented here and the additional experiment required will be discussed in a subsequent perspectives chapter. Please note that the figures are numbered independently from the rest of the thesis manuscript, starting by Figure 1.

### Summary

- Nitrate is a major nutrient and osmoticum for plants. To deal with its fluctuant availability in soils, plants store it into vacuoles. AtClCa is a  $2\text{NO}_3^-/\text{H}^+$  exchanger localized in the vacuolar membrane and mostly responsible for this storage. It belongs to the CIC (Chloride Channel) family including exchangers and channels. In some species, a mechanistic switch is likely responsible for the conversion of exchangers to channels during evolution. Surprisingly, in *Arabidopsis thaliana*, all CICs involved in nitrate management are exchangers.
- In heterologous systems, the conversion of AtClCa exchanger to channel was achieved with a mutation of a very conserved residue: the glutamate 203. To better understand the conservation of an exchange mechanism for AtClCa, we generated plants expressing *AtClCa<sub>E203A</sub>* and performed a physiological analysis.
- We show that the influx to efflux balance is shifted in favour of a nitrate efflux leading to a higher assimilation increasing protein content. Despite their higher nutritional value, those plants display a growth deficiency linked to water homeostasis disruption and are more sensitive to abiotic stresses. The exchange mechanism in AtClCa is then critical to buffer environmental fluctuations and optimize plant growth.

Key words: Nitrate, storage, AtClCa, vacuole, gating glutamate, water homeostasis, exchange mechanism, abiotic stress

## Introduction

As sessile organisms, plants are facing regular environmental fluctuations that constitute a challenge to ensure both their survival and growth. Nutrient availability fluctuation is one of the major limiting factor for plant growth. Among those nutrients, nitrate constitutes the major form of inorganic nitrogen taken up by plants in aerobic soil. As a critical nutrient for plant development, it is applied extensively in agriculture to sustain yields. However, because soil clay-humus complexes retain nitrate weakly, it is easily leached thereby inducing severe environmental pollutions (Strahm and Harrison, 2006).

Nitrate is absorbed by the roots, translocated to the shoot where it is assimilated into amino acids (Dechorganat *et al.*, 2011). At the cellular level, plants are able to adjust their cytosolic nitrate homeostasis between 1 and 6 mM according to nitrate availability in the environment (Miller and Smith, 2008; Dechorganat *et al.*, 2011; Cookson *et al.*, 2005). This regulation is mainly possible through the presence of the vacuolar intracellular compartment. When the external concentrations of this anion are high, plants store in their vacuole nitrate that can be remobilized in case of prolonged starvation period (Martinoia *et al.*, 1981; Miller and Smith, 2008).

To generate such an important nitrate storage, the presence of an active transport is required (Miller and Smith, 1992). It was early suggested that this transport is made possible by the presence of an antiporter energised by the two types of vacuolar proton pumps, V-type H<sup>+</sup>-Adenosintriposphates (V-ATPases) and H<sup>+</sup>-Pyrophosphatases (V-PPases), generating pH gradient through the vacuolar membrane (Schumaker and Sze, 1987). Later, a vacuole localized 2NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/H<sup>+</sup> exchanger called AtClCa was characterized by electrophysiological measurement performed on *Arabidopsis thaliana* isolated vacuoles (De Angeli *et al.*, 2006). A knock-out for AtClCa (*c/ca-2*) induces a decrease of up to 50% of the endogenous nitrate content, supporting its major role for nitrate storage into the vacuole and consequently in nitrate cytosolic homeostasis (Geelen *et al.*, 2000; Monachello *et al.*, 2009).

*AtClCa* gene is highly expressed in mesophyll cells and stomata. These latter, composed by a small pore, called ostiole, surrounded by two guard cells, are essential for gas exchanges in the shoot. The aperture of the stomata is highly controlled by the plant to facilitate photosynthesis

and water transport through the plant (Roelfsema and Hedrich, 2005). In presence of light, guard cells turgor increases and induces the opening of the ostiole to facilitate the entrance of CO<sub>2</sub> and release of O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O. In the same time, stomata are able to close rapidly in response to drought stress to limit water loss and to ensure plant survival (Bessey, 1898). In *c/ca-2* KO mutant, stomata opening is disturbed, supporting the role of AtClCa in anion translocation into the vacuole during light induced guard cell swelling (Wege *et al.*, 2014). Surprisingly, a dehydration experiment highlighted a higher hydric stress sensitivity of *c/ca-2* mutant compared to wild-type plants. In those plants, stomata closure in response to abscisic acid treatment was impaired, suggesting that AtClCa may be involved in anion efflux out of the vacuole during guard cells shrinking. This process is dependent on the activity of the OST1/SnRK2.6 kinase that phosphorylates AtClCa on its N-terminal domain. Altogether, these results show that AtClCa is a central exchanger for plant facing nutrient and water environmental fluctuations. Furthermore, they support the dual role of nitrate as a major nutrient for plant growth but also as an osmoticum involved in plant water homeostasis (McIntyre, 1997).

AtClCa is a member of a very conserved protein family widespread from prokaryotes to mammals (Mindell and Maduke, 2001). Despite their very close structure, CIC (Chloride Channel) members can be either anion channels or anion/proton exchangers. In human, five CICs are chloride/proton exchangers (HsCIC3 to 7) whereas the four others are chloride channels (HsCIC1, HsCIC2, HsCICKa, HsCICKb) (Poroca *et al.*, 2017). Interestingly, most of the exchangers share a highly conserved glutamate residue (E203 in AtClCa), the “gating glutamate”. This residue, initially identified in CIC-ec1 from *E.coli* (Dutzler *et al.*, 2002), is located in CICs selectivity filter and projects its side chain in the ion pathway. When deprotonated, this residue blocks the anion transport but, upon protonation, it is moving out of the pathway thereby allowing anion access (Dutzler *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2017). During a protonation/deprotonation cycle of this residue, two anion can be transported by the exchanger. The mutation of this glutamate in a non-protonable residue in bacteria (CIC-ec1), human (CIC-5 and CIC-7) (Novarino *et al.*, 2010; Weinert *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2012) and plant CICs (AtClCa) (Bergsdorf *et al.*, 2009) uncouples the anion transport from the proton transport, leads to an open anion pathway and converts the exchanger into a channel.

Surprisingly, CIC channels still transport protons and display a pH dependant gating (Lísal and Maduke, 2008), which suggest that channels could have evolved from exchangers in which one of the conformation became leaky for chloride transport (Gadsby, 2009). In mammals, this putative evolution from exchanger to channel seems to have happened and all the channels resulting from this event are localized in the plasma membrane (Poroca *et al.*, 2017). In plants, all the CICs are localized in intracellular compartments. In addition to AtClCa, three other CICs are located in the vacuolar membrane in *A. thaliana*. Among them, AtClCb, the closest homologous protein of AtClCa, is also a  $2\text{NO}_3^-/\text{H}^+$  exchanger (Von Der Fecht-Bartenbach *et al.*, 2010; Lv *et al.*, 2009). Nevertheless, knock-out mutants for this gene contain as much nitrate as wild-type genotype suggesting that the effect of the mutation is compensated by AtClCa (Von Der Fecht-Bartenbach *et al.*, 2010). The other vacuolar CICs in Arabidopsis, AtClCc and AtClCg, are involved in chloride transport as the knock-out mutants are more sensitive to NaCl stress but their electrophysiological properties are unknown to date (Jossier *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2016). AtClCa is then an essential transporter for the exchange of nitrate and proton through the vacuolar membrane and it is involved in controlling nitrate and water cytosolic homeostasis. We can wonder if the exchange mechanism for AtClCa is absolutely required for plant to stabilize water and nitrate status whatever the external environmental fluctuations and if there is a physiological meaning of CICs exchange mechanism conservation for AtClCa. With an anion channel, nitrate fluxes in and out the vacuole will be driven by nitrate electrochemical potential and so partly by nitrate concentration. How the change from a nitrate/proton exchanger to an anion channel will modify nitrogen metabolism and plant water status? We investigated this question by analysing the physiological consequences of a conversion of AtClCa exchange mechanism into a channel mechanism. To uncouple proton and anion transports by AtClCa, we disrupted the gating glutamate by mutating it into alanine, a non-protonable residue (E203A) and introduced it in a knock-out for *AtClCa*. The physiological consequences of such a mutation should give insight on the explanation of the conservation of an exchanger rather than a channel for AtClCa.

## Material and methods

### Plant material

Experiments were performed on *Arabidopsis thaliana* (accession Wassilewskija WS) wild-type plants and T-DNA insertion mutant *clca-2* (De Angeli *et al.*, 2006). The *clca-2/35S:AtClCa* complemented line was produced in a previous work (Wege *et al.*, 2010). *AtClCa<sub>E203A</sub>* point mutation was introduced in *AtClCa* cDNA using the QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) into the Gateway vector pH2GW7.0 (Karimi *et al.*, 2002) under the control of the 35S promoter or into the Gateway pMDC43 vector (Curtis and Grossniklaus, 2003) allowing the fusion of GFP and the N-terminal part of *AtClCa*. For *pAtClCa:AtClCa* and *pAtClCa:AtClCa<sub>E203A</sub>* lines generation, a 1.9-kb fragment of *AtClCa* promoter was produced by PCR amplification on genomic DNA ([WS] accession) using purified primer pair: 5'- nnnnncccgggggtttgcactcatacttt-3' and 5'- nnnnnactagttgggtggatgggtaccatat-3'. The PCR fragment was cloned into pH2GW7.0 between *Sma*/ and *Spe*/ restriction sites upstream *AtClCa* or *AtClCa<sub>E203A</sub>* cDNA sequences. Those constructs were used to transform T-DNA knockout plant for *AtClCa* (*clca-2*) by floral-dipping (Clough and Bent, 1998). The seeds were selected on hygromycine B (20 µg.mL<sup>-1</sup>) and two T3 homozygous lines were chosen.

### Plant growth conditions

All experiments were performed on plants grown under short days conditions (8h light, 16h dark) at 22°C, 60% relative humidity, 75 µmol photon m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> light intensity. Water content experiments, stomata assays and dehydration tests were performed in plants grown for five to seven weeks in Jiffy® peat pellets. For fresh weight and anion, amino acids and proteins content determination, plants were grown hydroponically for four to five weeks. Seeds were sterilized and sown on seed-holders (Araponics, Liège, Belgium) filled with half-strength MS medium containing 0.60% phytoagar. The boxes were filled with milliQ water, put at 4°C for four days for seeds stratification, and then transferred in the culture room. Once roots have emerged in water solution, the medium is replaced by a modified Hoagland nutrient solution (1.5 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1.25 mM KNO<sub>3</sub>, 0.75 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.28 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, micronutrients [KCl 50 µM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 25 µM, ZnSO<sub>4</sub> 1 µM, CuSO<sub>4</sub> 0.5 µM, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 0.1 µM, MnSO<sub>4</sub> 5 µM], chelated iron Fe-HBED 20 µM and MES 2 mM pH 5.7 with KOH.

Nutrient solutions were replaced twice a week. For nitrate starvation experiments, five weeks plants roots grown in hydroponic system were rinsed twice in the nitrate starvation medium (CaNO<sub>3</sub> replaced by CaSO<sub>4</sub> 1.5 mM and KNO<sub>3</sub> by KCl 1.25 mM) and plants were put on the starvation medium for 120h. For nitrate storage experiment, four weeks plants were nitrate starved for ten days, then nitrate starvation medium was replaced by complete Hoagland nutrient solution for 120 h.

### *RT-qPCR analysis*

Total plants RNA were extracted from four weeks plants using the RNeasy kit (Qiagen, Germany) and two micrograms of RNA was reverse-transcribed using SuperScript IV™ Reverse Transcriptase according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific). Real-time PCR was performed on cDNAs in a final volume of 10 µL using SYBR Green I master mix (Roche Life Science) and primers for *AtClCa* gene : AtClCa qsens 5'-atcaaatggagatggctcg-3' (Forward) and AtClCa qantisens 5'-cctcaagagcgaaaagtactc-3' (Reverse) and *Actin2* reference gene : Actin sens 5'-ggtaacattgtgctcagtggtgg-3' (Forward) and Actin antisens 5'-aacgacctaattctcatgct-3' (Reverse). The reactions were performed in a LightCycler® 96 Real-Time PCR system (Roche Life Science). Samples were subjected to ten minutes of pre-incubation at 95°C, then 45 amplification cycles with 15 seconds at 95°C, 15 seconds at 60°C and 15 seconds at 72°C. A high resolution melting was performed to assess amplification specificity and several cDNA dilutions were tested to perform primers efficiency calculation. The results were analysed using the LightCycler® Software (Roche Life Science) and normalized with the *Actin2* gene expression.

### *Microscopy*

AtClCa<sub>E203A</sub> localization was checked with a confocal microscope Leica TCS SP8 (Imagerie Gif, Gif-sur-Yvette) using the fusion of GFP and the N-terminal part of AtClCa. The GFP was excited at 488 nm and its fluorescence emission signal was analysed between 500 and 525 nm.

### *Electrophysiological experiments*

Currents were induced by five seconds pulses from -77 to 43 mV in 20 mV increments as described in (De Angeli et al., 2006). Reference solution contained : (cytosolic) 15 mM BTP Cl<sup>-</sup>, 15 mM MES

pH 7, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>; (vacuolar) 200 mM BTP NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MES pH 5.5,  $\pi= 590$  mOsm adjusted with sorbitol

### *Plants nitrogen compound content measurements*

For nitrate content measurement, shoot and root were harvested separately, weighted and fast frozen in liquid nitrogen. Plants material was grounded, homogenized in 1 ml (shoot) or 500  $\mu$ l (root) of milliQ water and exposed to three successive freeze-thaw cycles. After the last thawing, plants material was centrifuged 10 minutes at full speed to pellet cell debris and recover the supernatant that will be used for nitrate colorimetric assay (Miranda *et al.*, 2001). For anion content determination, the shoot samples were used for HPLC analysis (ICS5000, ThermoFisher) or for malate determination using the Biovision<sup>TM</sup> kit.

For amino-acids quantification, plants shoots were fast frozen in liquid nitrogen and lyophilized overnight, the amount is then normalized with dry weight. Sample preparation and analysis were performed as described in previous studies (Noctor *et al.*, 2007; Vivancos *et al.*, 2011).

For soluble protein content determination, 100 mg of each plant was harvested and grounded in liquid nitrogen. Then, 350  $\mu$ l of extraction buffer (50 mM Hepes/NaOH pH 7.2, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA 0.2M, 10% glycerol, 1% Triton, 2 mM PMSF, 150 mM NaCl, antiprotease-EDTA) were added before vortex homogenization. Samples were incubated under agitation for 30 minutes at 4°C. After centrifugation, supernatant were recovered and used for total soluble protein content determination using a standard Bradford assay (Bradford, 1976).

### *Plants water content measurements*

For water content analysis, plants rosettes were harvested and weighted, rosettes were dried for three days at 65°C and relative water content was calculated as : (FreshWeight-DryWeight)/FreshWeight. Relative water contents were determined similarly during the dehydration tests performed under a laminar flow hood on seven weeks plants as described by Wege *et al* (2014).

### *Cell size determination*

Flow cytometry was used to determine relative cell size of plants leaves. On five weeks old plants, seven leaves of three plants per genotype were harvested and digested with an enzymatic mix (1

% cellulase R-10, 0.2 % Macerozyme R-10, 0.4 M Mannitol, 20 mM KCl, 20 mM MES/KOH pH 5.7, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% w/v BSA) for three hours. Protoplasts were retrieved by centrifugation at low speed (100 g) for two minutes. Protoplasts were re-suspended in an appropriate solution (1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MES pH 5.3 (KOH), 594 mOsm with sorbitol). Then, they were filtered through a 50- $\mu$ m nylon filter, and analysed on a MoFlo Astrios cytometer, driven by Summit 6.3 (Beckman-Coulter). Chlorophyll was excited by a 488 nm solid-state laser (150 mW), taking emission at 664/22 nm. Forward Scatter (FSC, size) and Side Scatter (SSC, granularity) were taken on the 488 nm laser. The first region of interest (gate) was focused on events with high homogenous fluorescence in chlorophyll. Then, mean values of FSC-Area and SSC-Area parameters were taken with the same gating strategy for each sample. Each histogram comprised  $\geq 10000$  protoplasts.

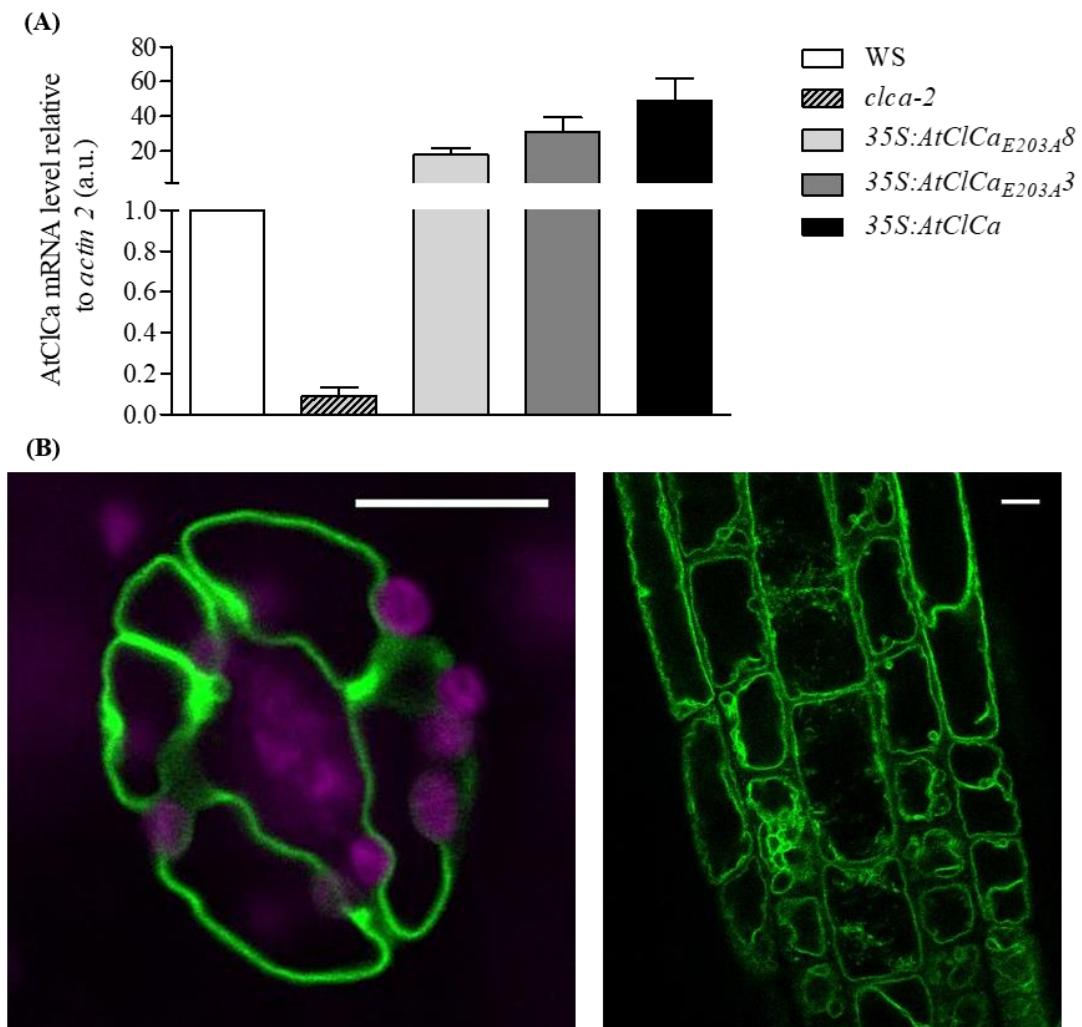
### *Stomata dynamics and dehydration sensitivity measurements*

Stomata bioassay were performed as described in Jossier et al (2010). Two hours before the beginning of the light period, plants were collected and two plant leaves per genotype were glued on cover slides with surgical glue (Hollister Medical Adhesive, Adapt<sup>TM</sup> 7730) to peel the epidermis. Those cover slides were immediately immerged in MES/KCl buffer (50 mM, pH 6.15 with KOH) and kept in dark for 1 hour. After this dark period, initial stomata aperture was measured and then the aperture was monitored after opening induction by light with a light intensity of 60  $\mu$ mol photon  $m^{-2} \cdot s^{-1}$  for 4h30 at 22°C. For stomata closing experiment, after 4h30 exposition to light, the epidermis were incubated for 3 hours with 50  $\mu$ M of Abscisic acid and the aperture area was determined. Images acquisition was performed with a wide field inverted microscope DMI (Leica, Imagerie Gif, Gif-Sur-Yvette) coupled with a Hamamatsu camera. To capture stomata images, Z-stacks were performed to get a clear image of all cells. Ostiole area determination was performed using an home-made macro running with ImageJ (Michele Bianchi). Those experiments were performed on 86-150 stomata per genotype per treatment (two leaves) and repeated three times.

## Results

## Uncoupling AtClCa exchanger with a gating glutamate mutation

To analyse the physiological consequences of the mutation E203A in AtClCa, *AtClCa<sub>E203A</sub>* under the control of the 35S promoter or the AtClCa native promoter was introduced in *ccla-2* knockout mutant (De Angeli *et al.*, 2006). Different lines were selected based on 3:1 resistance to hygromycin B and a qRT-PCR was performed to quantify AtClCa expression (Fig. 1A and Fig. S1A).



**Fig. 1. Level of expression of AtClCa in *ccla-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* transgenic lines and sub-cellular localization of AtClCa<sub>E203A</sub>**

(A) RT-qPCR quantification of AtClCa expression in WS, *ccla-2* and *ccla-2* plant lines stably transformed with 35S:AtClCa and 35S:AtClCa<sub>E203A</sub> using *Actin-2* or AtClCa specific primers. Plants were grown for five weeks on soil under short day conditions. Data represent the means  $\pm$  SEM of three biological replicates.

(B) Confocal observation of 35S:AtClCa<sub>E203A</sub>-GFP fusion protein expression in guard cells (left) and apical root cells (right). Scale bars represent 10  $\mu$ m. Chloroplasts are in magenta.

As a positive control, we used the complemented line, *cica-2/35S:AtClCa*, already analysed in previous studies (Wege *et al.*, 2010; Wege *et al.*, 2014) and two control lines *cica-2/pAtClCa:AtClCa* generated in this study. The *cica-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* 3 and 8 lines were selected because they overexpress AtClCa as strongly as *cica-2/35S:AtClCa* complemented plants (20 to 40 fold WS) whereas *cica-2/pAtClCa:AtClCa<sub>E203A</sub>* 1 and 4 lines and the *cica-2/pAtClCa:AtClCa* 6 and 2 lines were selected as they display an expression level 0.5 to 2 fold compared to WS. In parallel, we checked that the mutation in AtClCa does not change the sub-cellular localization of the protein by transforming *cica-2* mutant with *cica-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>-GFP*. The fluorescence was observed on plants from two different independent lines in guard cells and apical root cells (Fig. 1B). As expected, the mutated form of AtClCa is localized in the vacuolar membrane in both cell types.

Previous study, using Xenopus oocytes, shows that the mutation of E203A converts AtClCa from  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$  exchanger to  $\text{NO}_3^-$  channel (Bergsdorf *et al.*, 2009). To assess the transport mechanism of *AtClCa<sub>E203A</sub>* we measured ionic currents in mesophyll cells vacuoles from *cica-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* plants by patch-clamp. We performed patch-clamp experiments in whole vacuole configuration under bi-ionic conditions (i.e.  $\text{NO}_3^-$  in the vacuole,  $\text{Cl}^-$  in the cytosolic side) and using the non-permeable cation BisTrisPropane (De Angeli *et al.*, 2006). A first observation on the current traces is the absence of activation and deactivation kinetics in the *AtClCa<sub>E203A</sub>* compared to AtClCa WT (Fig. 2A). This is similar to what happens in the case of hsClC-7 (Costa *et al.*, 2012) and suggests that the mutation E203A affects a voltage dependent transition occurring at in AtClCa upon stimulation at positive potentials. In *cica-2* vacuoles, we measured a current density of  $2.8 \pm 0.6 \text{ pA.pF}^{-1}$  at +43mV corresponding to a decrease of  $77 \pm 2\%$  of WS current density (Fig. 2B) and of  $83 \pm 2\%$  of *cica-2/35S:AtClCa* current density. However, in *cica-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* vacuoles, we measured a current density of  $4.9 \pm 0.5 \text{ pA.pF}^{-1}$  at +43mV that is almost two times higher than in *cica-2*. When compared to WS, the current density in *cica-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* vacuoles is reduced by 45% (Fig. 2A and B). Interestingly, the difference in current density between the genotypes goes together with differences in reversal potentials ( $E_{\text{rev}}$ ). The reversal potential of *AtClCa<sub>E203A</sub>* is more negative of 40 mV than that of AtClCa WT. This indicates the presence of

different transport systems with different transport mechanisms in the vacuoles from the different genotypes. Altogether, these data show that *AtClCa<sub>E203A</sub>* is able of mediate anion currents.

The analysis of the reversal potential measured from I-V curves shows that, in *caca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>*, the Erev is  $-90 \pm 13$  mV while in vacuoles overexpressing AtClCa WT the Erev =  $-50 \pm 6$  mV. This difference of 40 mV suggest that, in the *AtClCa<sub>E203A</sub>* mutant, the anion/H<sup>+</sup> coupling is defective. The reversal potential for an Anion/H<sup>+</sup> exchanger can be calculated from the following equation (Eq 1):

$$E_{\text{exchanger}} = \frac{1}{1+r} [E_{A^-} + rE_{H^+}] \quad (1)$$

Where the stoichiometric ratio is  $r=0.5$  for AtClCa, and  $E_x$  is the Nernst potential of each transported ion X.

According to published data on CIC exchangers (Picollo and Pusch, 2005; Bergsdorf *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2012), the mutation E203A should transform AtClCa into a Nernstian conductance. In that case, reversal potential of *AtClCa<sub>E203A</sub>* should follow the Nernst equation:

$$E_{\text{channel}} = E_{A^-} = \frac{RT}{zF} \ln \left( \frac{[X]_{\text{out}}}{[X]_{\text{in}}} \right) \quad (2)$$

Where X is the anion transported.

However, in our experimental conditions we used bi-ionic conditions (Cl<sup>-</sup> cytosolic side, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> vacuolar side) preventing the calculation of a Nernst potential. This limits the quantitative analysis of the expected difference between the Erev of a CIC exchanger and a CIC ion channel.

Nonetheless, if we calculate  $\Delta = E_{\text{exchanger}} - E_{\text{channel}}$ :

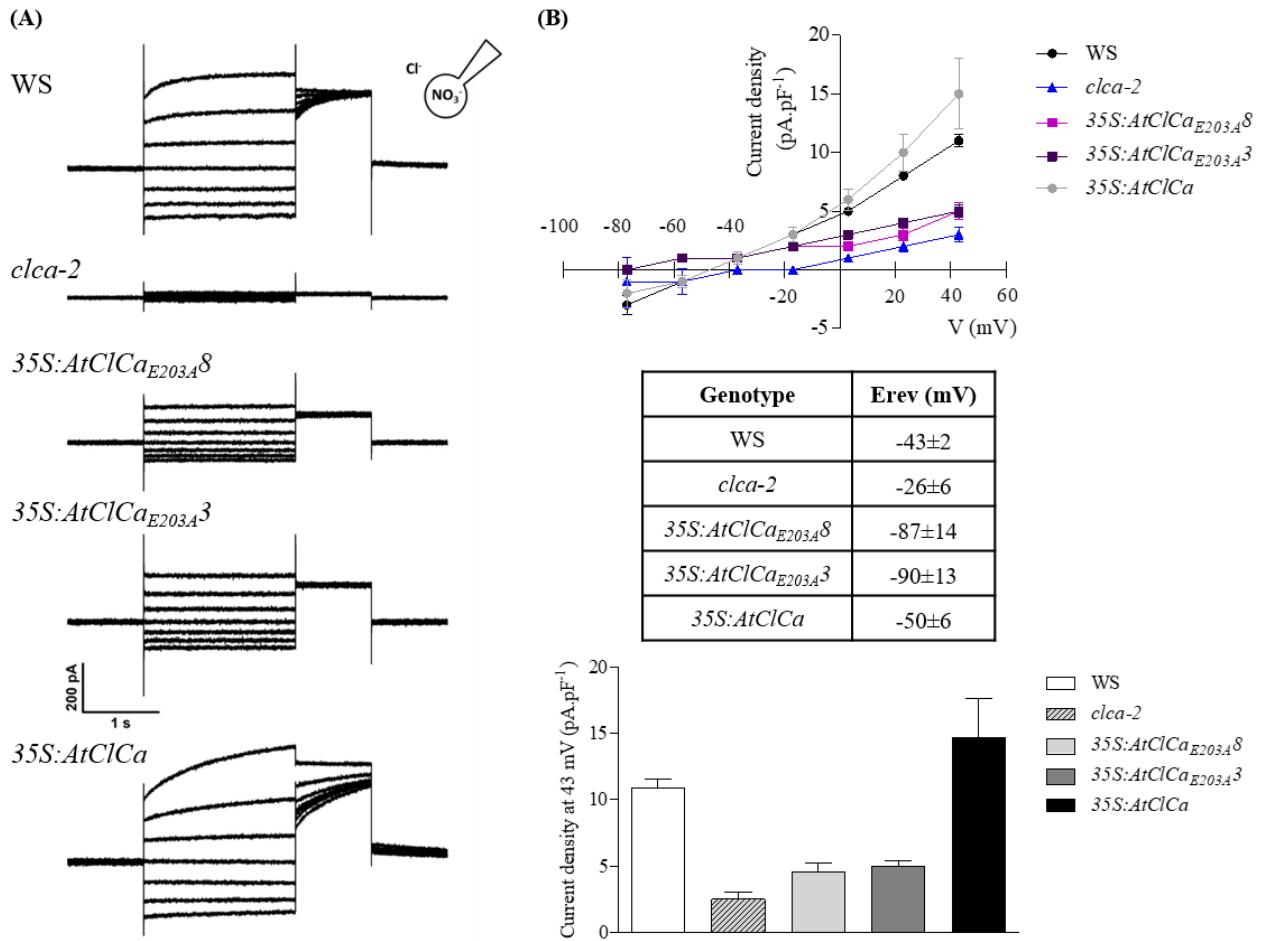
$$\Delta = E_{\text{exchanger}} - E_{\text{channel}} \quad (3)$$

$$\Delta = \frac{1}{1+r} [E_{A^-} + rE_{H^+}] - E_{A^-}$$

$$\Delta = \frac{2}{3} E_{A^-} + \frac{1}{3} E_{H^+} - E_{A^-}$$

$$\Delta = -\frac{1}{3} E_{A^-} + \frac{1}{3} E_{H^+}$$

We found that the difference in the  $E_{rev}$  is at least 1/3 of the Nernst potential of  $H^+$ . In our conditions  $E_{H^+} = +90$  mV, and then we can expect a difference of at least -30 mV. Interestingly, our data show that  $AtClCa_{E203A}$   $E_{rev}$  is 40 mV more negative than WT that is in line with what expected from Eq 3.



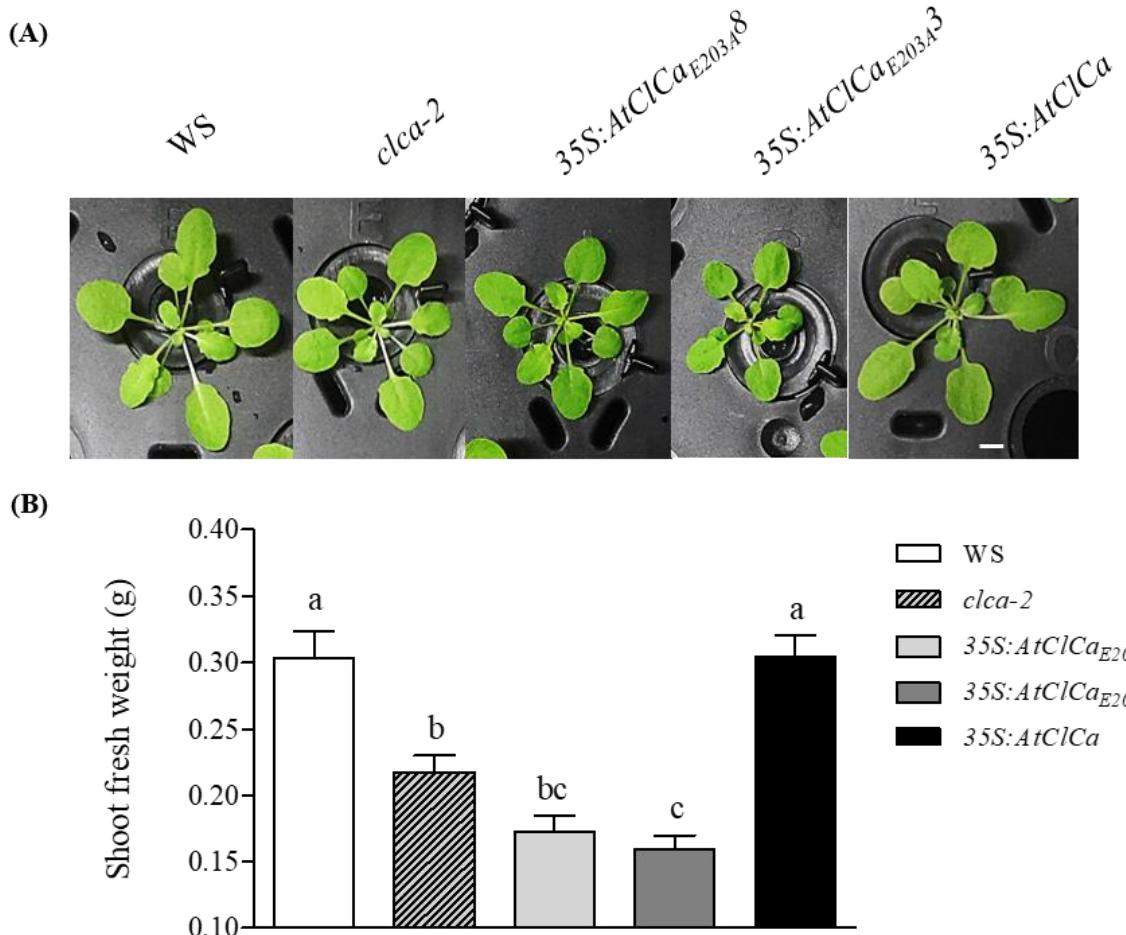
**Fig. 2.  $AtClCa_{E203A}$  overexpression partially complement anion current but display a reversal potential modification**

Anion current (A) and steady-state I-V curves with deduced current density and reversal potential (B) in WS,  $clca-2$  and  $clca-2$  plant lines stably transformed with  $35S:AtClCa$  and  $35S:AtClCa_{E203A}$ . Results obtained with 200 mM of vacuolar  $NO_3^-$  pH 5.5 and 20 mM of cytosolic  $Cl^-$  pH 7. Data represent means  $\pm$  SD of two to four vacuoles.

#### *AtClCa<sub>E203A</sub>* expression in *clca-2* plants does not complement biomass production

Nitrate has been known for decades to be a crucial nutrient for plant growth, notably because of its involvement in nitrogen metabolism (Crawford, 1995; Brouwer, 1962; Chen *et al.*, 2004). We then first analysed the consequences of the introduction of the mutation  $AtClCa_{E203A}$  on the plant

biomass. The different genotypes were grown on hydroponic and shoot fresh weight was measured after six weeks of growth on 4.25 mM  $\text{NO}_3^-$  under short days conditions (Fig. 3 and Fig. S1B). The biomass of *clca-2* mutant is statistically lower ( $28\pm4\%$  decreased) than that of WS plants and *clca-2/35S:AtClCa* plants. Surprisingly, *clca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>3* plants biomass is decreased by up to  $47\pm3\%$  (line 3) or compared to WS plants and by up to  $26\pm4\%$  compared to *clca-2* (Fig. 3).



**Fig. 3. *AtClCa<sub>E203A</sub>* does not complement *clca-2* biomass production deficiency**

Plants of WS, *clca-2*, *clca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* lines 8 and 3 and complemented line *clca-2/35S:AtClCa* were grown in hydroponics on 4.25 mM  $\text{NO}_3^-$  under short day conditions. After four weeks, photographs were taken (A) and after six weeks shoot fresh weight were measured (B). Data represent the means  $\pm$  SEM of three biological replicates. One-way ANOVA analysis with Bonferroni comparison post-test ( $p<0.05$ ), different letters indicate significant difference. Scale bar represent 0.5 cm.

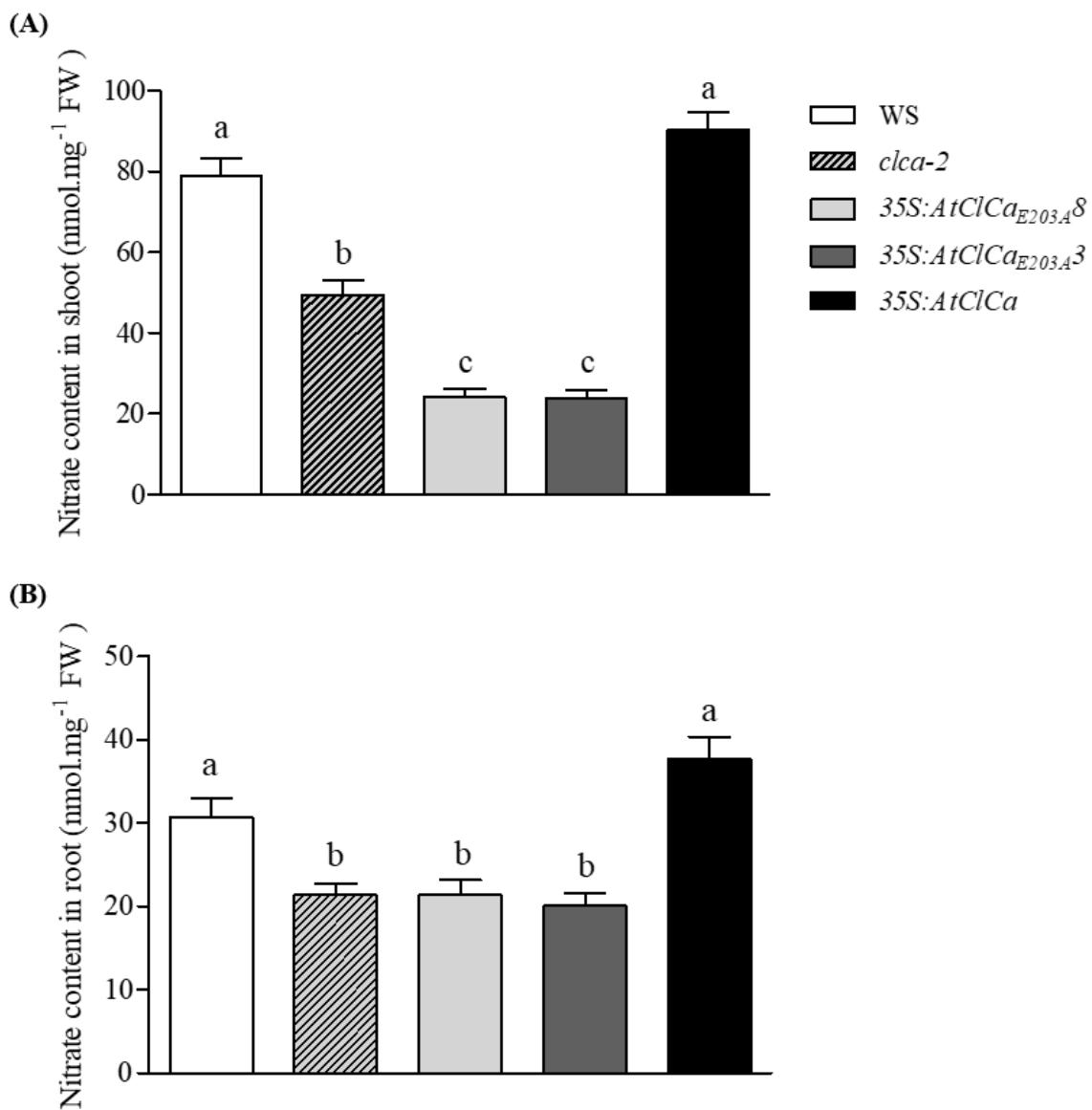
Under the control of the endogenous promoter, the non-mutated form of AtClCa partially (*clca-2/pAtClCa:AtClCa* 6) or fully (*clca-2/pAtClCa:AtClCa* 2) restores the wild-type phenotype (Fig. S1B). *AtClCa<sub>E203A</sub>* expression under the control of the same promoter induces a decrease of plant

biomass by up to  $44\pm3\%$  compared to WS. However, only *c/ca-2/pAtClCa:AtClCa<sub>E203A</sub> 4* line induces a statistically significant decrease ( $20\pm3\%$ ) compared to *c/ca-2* plants. In conclusion, *AtClCa<sub>E203A</sub>* expression in *c/ca-2* is not able to rescue the growth deficiency phenotype in the tested conditions and the decrease of biomass production is even more important when *AtClCa<sub>E203A</sub>* is over-expressed ubiquitously.

**Uncoupling  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{H}^+$  transports in AtClCa induces an under-accumulation of nitrate in the plant**

To better understand the difference of plant growth between the different genotypes, we investigated plant nitrate status. First, we measured nitrate endogenous content in plants expressing *AtClCa<sub>E203A</sub>* under the control of the 35S promoter or the endogenous promoter (Fig. 4 and Fig. S1C.) In agreement with previous works (Geelen *et al.*, 2000; Monachello *et al.*, 2009), there is a decrease of  $37\pm4\%$  and  $30\pm4\%$  of the nitrate content in *c/ca-2* shoot and root respectively compared to WS. Surprisingly, when *AtClCa<sub>E203A</sub>* is overexpressed, it induces a decrease of  $70\pm3\%$  in shoot compared to WS and of  $52\pm4\%$  compared to *c/ca-2* (Fig. 4A). In roots, *c/ca2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* plants show  $35\pm5\%$  less nitrate than WS but present similar nitrate content compared to *c/ca-2* (Fig. 4B).

When expressed under the control of its own promoter, *AtClCa<sub>E203A</sub>* still induces a reduction of nitrate content by up to  $46\pm5\%$  and  $28\pm4\%$  in shoot and root respectively compared to WS but no significant difference is found when compared to *c/ca-2* (Fig. S1C). The results, obtained on over-expressors, seem to be specific of the nitrate as the contents of the other major inorganic anions in the plant are similar in the different genotypes (Fig. S2A). Nevertheless, we can observe an increase of malate content as previously shown (Geelen *et al.*, 2000) that is intensified in *c/ca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* lines (Fig. S2B). Altogether, these results show that *AtClCa<sub>E203A</sub>* is not able to restore wild-type phenotype for nitrate contents and indicate that AtClCa uncoupling strongly alters nitrate storage efficiency into vacuoles. Interestingly, *AtClCa<sub>E203A</sub>* overexpression even amplifies nitrate endogenous content decrease thereby leading to a lower storage than in *c/ca-2* plants.



**Fig. 4.** *AtClCa<sub>E203A</sub>* expression induces a decrease of endogenous nitrate content

Endogenous nitrate contents were determined in WS, *clica-2*, and *clica-2* expressing *AtClCa<sub>E203A</sub>* under the control of the 35S promoter in shoot (A) and root (B). Plants were grown as described in Fig 3. Data represent the means  $\pm$  SEM of three biological replicates. Statistical analysis is the same as in Fig 3.

**Uncoupling  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{H}^+$  transports in AtClCa modifies fluxes through the vacuolar membrane and enhances nitrate assimilation**

Nitrate endogenous content in plants is the outcome of nitrate assimilation, nitrate efflux and influx in the cell and the exchanges of nitrate through the vacuolar membrane. In cells, 90% of the nitrate is stored in the vacuole (Cookson *et al.*, 2005), then the nitrate endogenous content decrease observed in the plants expressing *AtClCa<sub>E203A</sub>* could be due to an increased efflux rate

from the vacuole and/or a decreased influx rate. To gain insight into this, we measured plant nitrate storage and remobilization out of the vacuole in response to nitrate availability fluctuation in the environment. When nitrate concentrations are high in the external medium, nitrate is accumulated into the vacuoles to maintain nitrate cytosolic homeostasis. However, when nitrate is limited, nitrate is remobilized from the vacuoles to sustain nitrate assimilation (Huang *et al.*, 2012; Miller and Smith, 2008). We decided to investigate nitrate storage and remobilization on plants overexpressing *AtClCa<sub>E203A</sub>* in which nitrate content is particularly low compared to WS, *c/ca-2*. This strong phenotype due to overexpression is particularly convenient to reveal more subtle differences of storage and remobilization. First, the ability of plants with uncoupled AtClCa to cope with nitrate depletion was tested. Plants were grown for five weeks in hydroponics on complete Hoagland medium (4.25 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) and then submitted to nitrogen starvation for 120 hours. In *c/ca-2*, WS and *c/ca-2/35S:AtClCa* shoots, only 10 to 23% of the nitrate has been remobilized for assimilation after 72 hours of starvation and still 46-52% of nitrate is left after 120h on a medium deprived of nitrogen (Fig. 5A). Interestingly a very strong and fast nitrate remobilization is observed for plants overexpressing *AtClCa<sub>E203A</sub>*: the two *c/ca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* transgenic lines have already mobilized 61 to 73% of the nitrate initially present after 72 h and less than 10% of nitrate is left in the shoot after 120h of starvation. In roots, plants overexpressing *AtClCa<sub>E203A</sub>* show the same fast and high remobilization in response to starvation than *c/ca-2*. This remobilization looks faster than in shoots, probably because of a low nitrate storage in this part of the plant (Fig. 4). Because of this very fast kinetic, it is likely that we cannot detect any difference between *c/ca-2* and *c/ca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* plants. Then, the decreased nitrate content in *c/ca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* plants is likely to be partially due to a higher nitrate efflux rate from the vacuole.

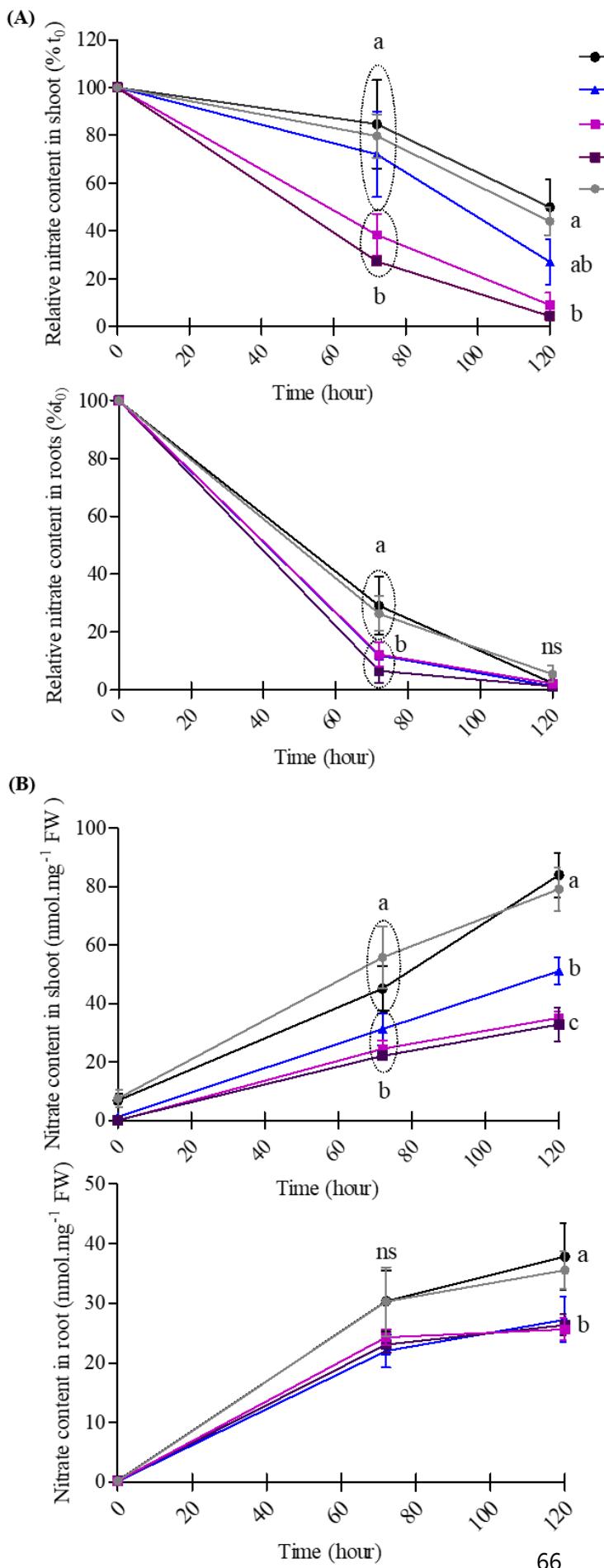


Fig. 5. *ccla-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* plants have a slow nitrate storage and a fast nitrate remobilization in response to nitrate supply in the medium

(A) Plants were cultivated for five weeks as described in Fig 3 and then nitrogen was removed from the medium for 120h. Nitrate content was determined after 0, 72h and 120h of starvation.

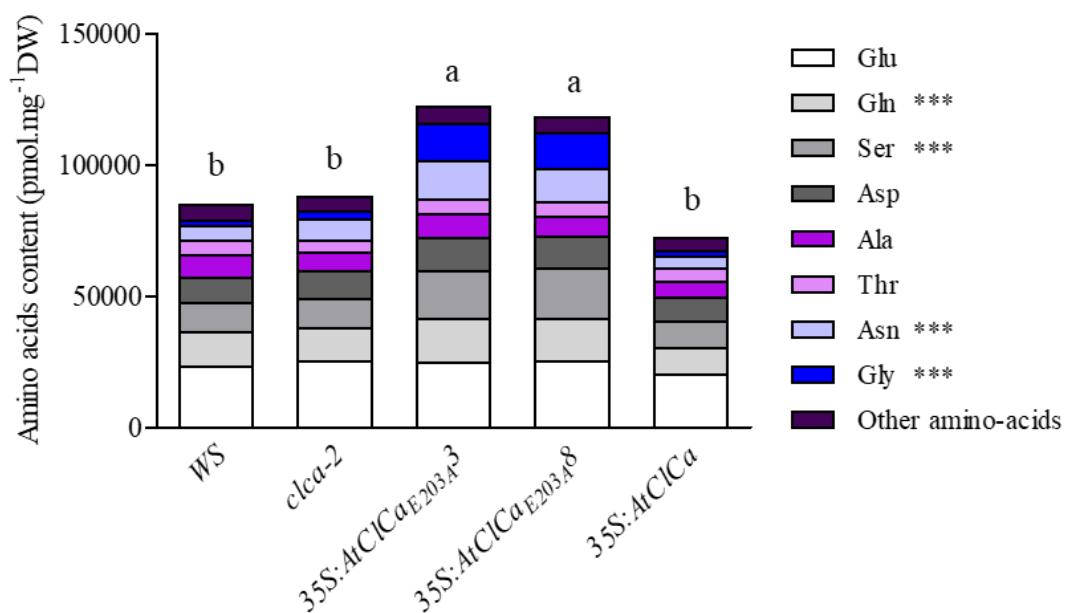
(B) Plants were submitted to ten days of nitrogen starvation, and nitrate was supplied again, the content was determined after 0, 72h and 120h.

In both experiments, data represent the means  $\pm$  SEM of three biological experiments ( $n=6$  plants per experiment). Nitrate content is quantified in shoots (top) and in roots (bottom) separately. Two-way ANOVA analysis with Bonferroni comparison post-test ( $p<0.05$ ), different letters indicate significant difference between genotypes at each time point.

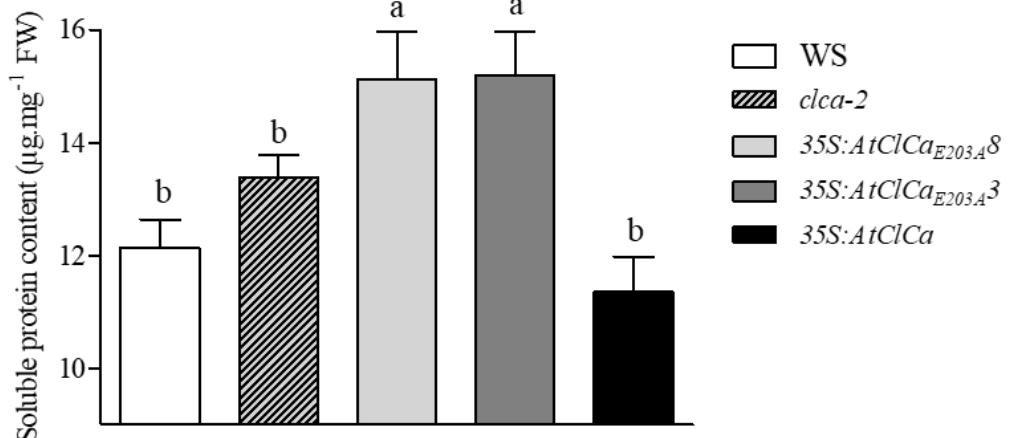
To investigate nitrate influx in the vacuole, a starvation was performed for ten days and then 4.25 mM nitrate was resupplied to the plants. In shoots, plants overexpressing *AtClCa<sub>E203A</sub>* have a slow nitrate storage in response to nitrate supply. During the first 72h after nitrate addition, the storage speed is 25±4% lower compared to WS but similar to *c/ca-2*. Then, *AtClCa<sub>E203A</sub>* expression is not complementing *c/ca-2* phenotype, which indicates that its ability to transport nitrate in the vacuole is very low. After 120h, a significant difference of nitrate accumulation between *c/ca-2* and *c/ca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* lines was measured. The decrease of nitrate content in plants over-expressing *AtClCa<sub>E203A</sub>* could be a consequence of an increased nitrate efflux from the vacuole when nitrate concentrations inside the vacuole is getting high. In roots, the storage speed is decreased by up to 8±4% compared to WS but is similar to the one measured in *c/ca-2* (Fig. 5B). These results indicate that, not only the nitrate efflux from the vacuole is increased but also nitrate influx into the vacuole is decreased. The unbalance of nitrate influx and efflux in the vacuole give insight into the nitrate content depletion measured previously.

The inefficiency of nitrate storage into the vacuole in the plants expressing *AtClCa<sub>E203A</sub>* is likely to unbalance the nitrate cytosolic homeostasis and to change consequently nitrate assimilation in the cytoplasm. To test this hypothesis, we indirectly estimated nitrate assimilation rate by amino acids and total soluble protein contents quantifications in *c/ca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* plants in which nitrate storages are the most reduced (Fig. 6). In these two transgenic lines, the amount of free amino-acids increases by up to 42±2% compared to WS, *c/ca-2/35S:AtClCa*, and *c/ca-2* (Fig. 6A). Interestingly, asparagine (Asn), serine (Ser), glutamine (Gln) and glycine (Gly) are significantly accumulated in the gating glutamate mutant, indicating a modification of amino acid spectrum (Fig. 6A and S3). In parallel, *c/ca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* plants have a significantly increased protein content (25±5%) compared to WS and *c/ca-2/35S:AtClCa* plants (Fig. 6B). Those results suggest that inefficient vacuolar nitrate storage due to *AtClCa<sub>E203A</sub>* overexpression leads to an increased nitrate assimilation into amino acids and proteins. Then, plants expressing AtClCa in which nitrate translocation is uncoupled from proton transport display a higher protein content thereby increasing the potential nutritional benefit of those plants.

(A)



(B)



**Fig. 6. *clca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* plants have an increased nitrate assimilation**

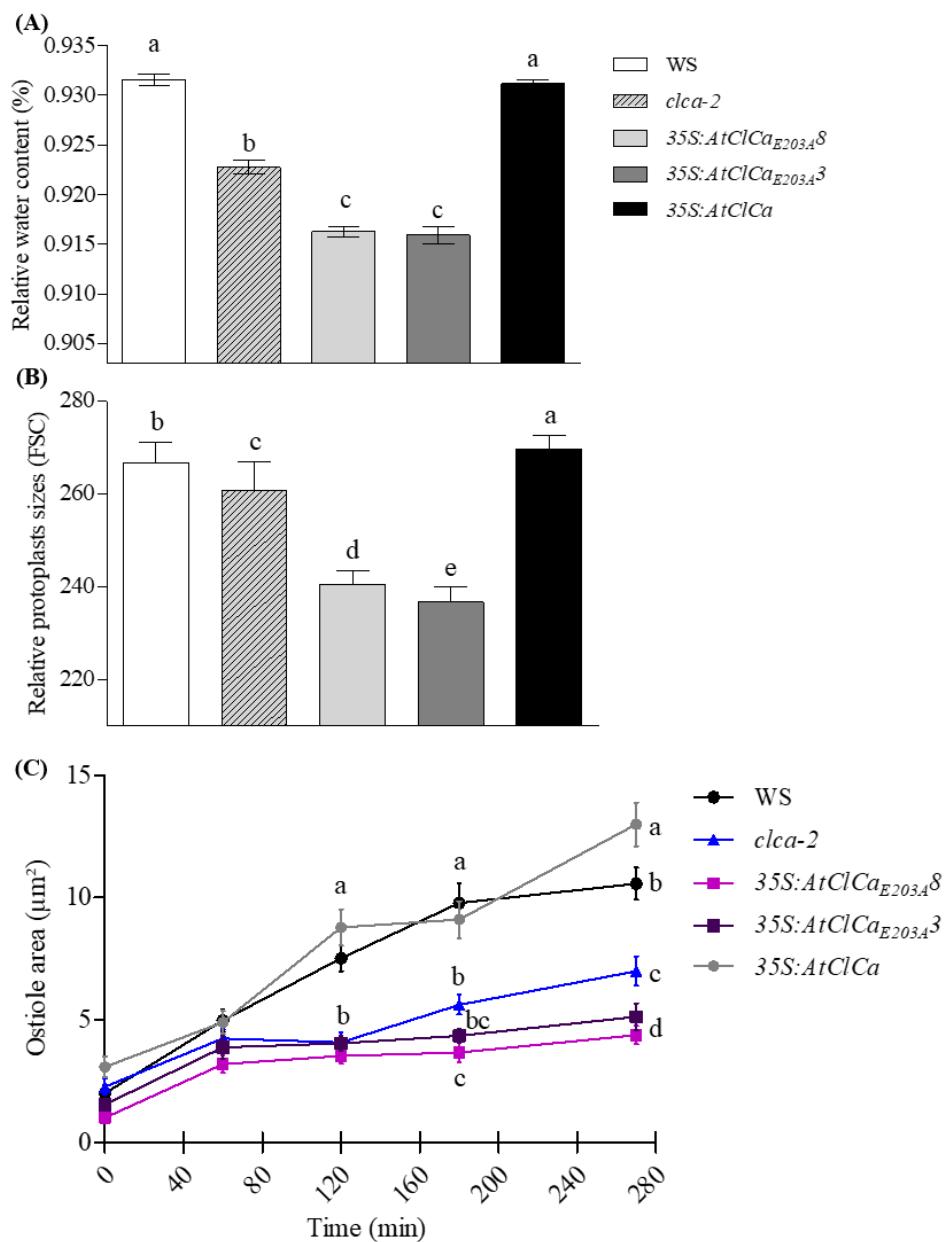
Plants of WS, *clca-2*, *clca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* line 8 and 3 and *clca-2/35S:AtClCa* were grown as described in Fig 3. Total free amino-acids and individual amino-acids content were measured by HPLC (A) as well as soluble protein content by Bradford standard assay (B). For amino-acids content, four plants were analysed, stars represent significant differences of absolute amino acid content between *clca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* and WS, *clca-2* and *clca-2/35S:AtClCa*. For soluble protein content, three biological replicates including three plants in each replicate were performed. Data represent the means  $\pm$  SD, statistical analysis is the same as in Fig 3.

### Nitrate depletion of plants expressing *AtClCa<sub>E203A</sub>* leads to water homeostasis disruption

In plants, enhancement of nitrate assimilation often leads to an increase of biomass (Zhong *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2002; Urriola and Rathore, 2015; Han *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2016). Amazingly, plant growth is strongly decreased in plants over-expressing the uncoupled version for ions transport of AtClCa even if this mutation boosts nitrate assimilation. To attempt to explain this discrepancy, we decided to explore the impact of AtClCa uncoupling on plant water homeostasis as nitrate is not only an essential nutrient but also a major signalling molecule and an important osmoticum for plant cells (McIntyre, 2001; Wege *et al.*, 2014).

Plants were grown on Jiffy® substrate under short days conditions. In these conditions, the biomass measurement revealed the same differences between the genotypes compared to hydroponic culture. In plant overexpressing *AtClCa<sub>E203A</sub>* the water content is decreased by up to  $1.7 \pm 0.1\%$  compared to WS and by approximately  $0.75 \pm 0.05\%$  compared to *c/ca-2* (Fig. 7A). When *AtClCa<sub>E203A</sub>* is under the control of its own promoter, the water content is decreased by up to  $1.2 \pm 0.1\%$  compared to WS (Fig. S1D). However, only the line 4 is significantly different from *c/ca-2* thereby demonstrating that the overexpression may be responsible for the aggravation of the *c/ca-2* growth phenotype in *c/ca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>*. Those results demonstrate that the expression of *AtClCa<sub>E203A</sub>* does not restore *c/ca-2* water content depletion and AtClCa nitrate and proton transports coupling is required for plant proper water homeostasis.

As the importance of water for plant cells enlargement is well known (Boyer, 1968), we decided to investigate plant cell size in plants over-expressing *AtClCa<sub>E203A</sub>*. Cell size determination was performed by flow cytometry on protoplasts produced by enzymatic digestion of plant leaves. A chlorophyll detection allowed us to analyse specifically mesophyll cells. The cells overexpressing *AtClCa<sub>E203A</sub>* were significantly (up to  $12 \pm 1.3\%$ ) smaller than those of WS and *c/ca-2* (up to  $8.4 \pm 1\%$ ) (Fig. 7B). This result is consistent with the previous one, the introduction of the mutated form of AtClCa in *Arabidopsis thaliana* leads to a reduced cell size due a decrease of water accumulation in the vacuole.



**Fig. 7. *AtClCa<sub>E203A</sub>* plants have a water homeostasis disruption leading to impaired cell enlargement and stomatal aperture impairment**

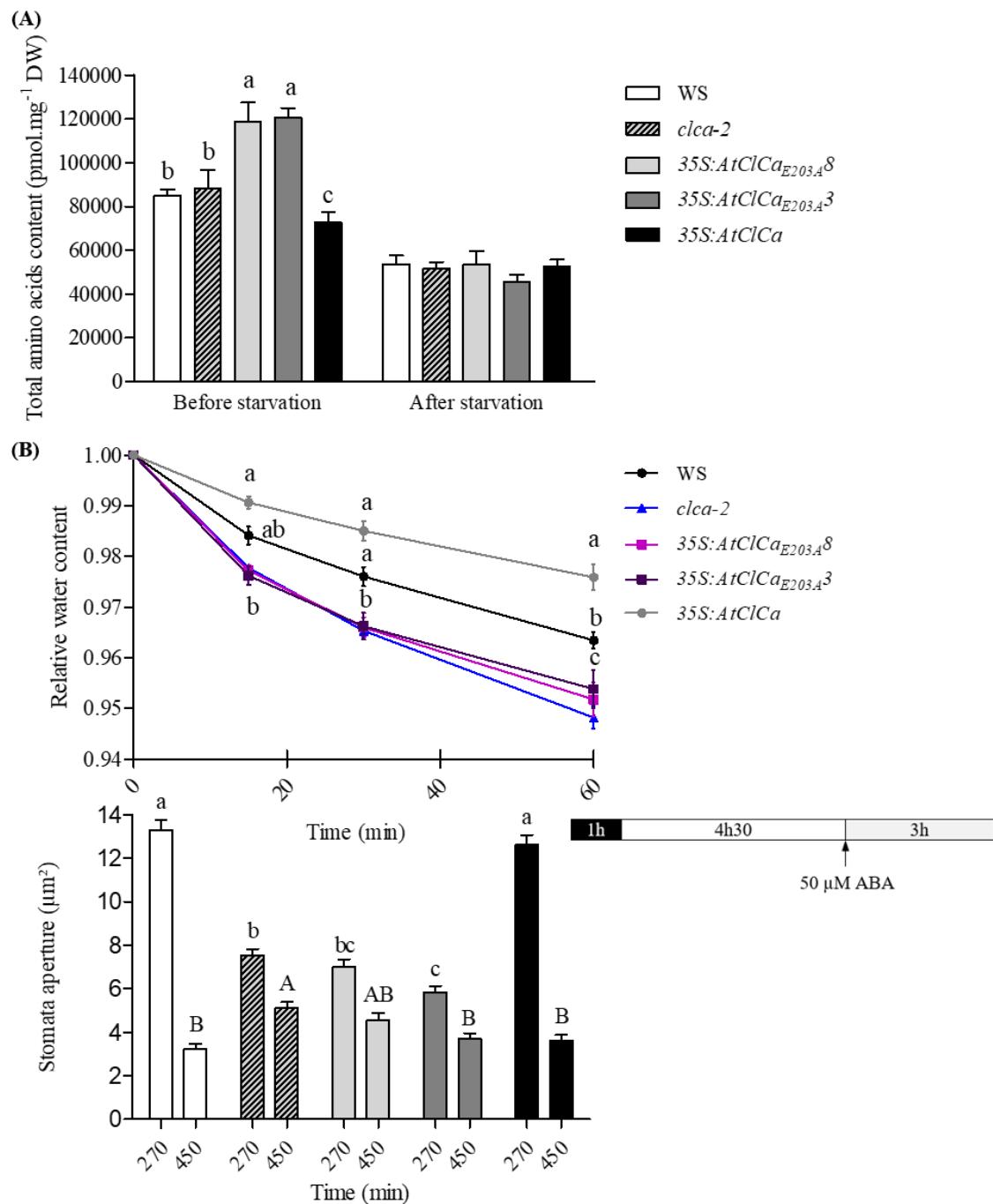
- (A) Relative water content of six weeks plants, grown as in Fig 1, expressing *AtClCa<sub>E203A</sub>* under the control of the 35S promoter. Three biological replicates (25 < n < 30 by replicate). Statistical analysis as in Fig 3.
- (B) Relative cell size determination by FACS (flow cytometry) of protoplasts generated by leaves enzymatic digestion of five weeks old plants grown as in A. Two biological replicates (n=3 plants per replicate, protoplasts > 30 000). Statistical analysis as in Fig 3.
- (C) Kinetics of stomata opening in response to light. Experiments were performed on epidermal peels of five weeks plants grown as in A. Three biological replicates (n=60 by replicate). Statistical analysis as in Fig 5.

Data represent the means  $\pm$  SEM.

AtClCa is not only expressed in mesophyll cells but also in guard cells where it is required for proper stomata movements (Wege *et al.*, 2014). In this particular cell type, cell turgor changes can be indirectly assessed by stomata movement measurement. Stomata movements are optimising gas exchanges required for photosynthesis while avoiding water loss. We then measured stomata opening in response to light incubation in plants over-expressing *AtClCa<sub>E203A</sub>* (Fig. 7C). Stomata opening is impaired in *c/ca-2* as shown previously (Wege *et al.*, 2014). In plants overexpressing *AtClCa<sub>E203A</sub>*, the opening is decreased by up to 58±3% compared to WS and up to 37±5% compared to *c/ca-2*. Interestingly, we observe two phases, first the opening follows the same kinetics in plants overexpressing *AtClCa<sub>E203A</sub>* compared to *c/ca-2*. After 120 minutes, the stomata opening kinetics become significantly lower in *c/ca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* compared to *c/ca-2*. When *AtClCa<sub>E203A</sub>* is introduced in *c/ca-2* under the control of its own promoter, it is not able to rescue the wild-type phenotype but no difference of stomata aperture in response to light is observed between the two *c/ca-2/pAtClCa:AtClCa<sub>E203A</sub>* transgenic lines and *c/ca-2* (Fig. S1E). Then, AtClCa exchange mechanism is required for efficient stomata opening in response to light.

#### **Plants expressing *AtClCa<sub>E203A</sub>* are more sensitive to abiotic stresses**

As an uncoupling unbalances both nitrate metabolism and nitrate driven water content, how plants with an uncoupled exchanger will deal with environmental fluctuation of water or nitrate? As previously mentioned, in response to a nitrate starvation, nitrate remobilization is faster in plants over-expressing *AtClCa<sub>E203A</sub>*. Those results demonstrate that uncoupling AtClCa facilitates nitrate exit from the vacuoles in response to nitrate depletion. As an outcome of this result combined to the low amount of nitrate storage, after 120h, the entire nitrate available has been already remobilized. During nitrate starvation, plants remobilize the nitrate stored into vacuoles but if the deleterious conditions last, then other sources of nitrate like amino acids are degraded (Davies and Humphrey, 1978; Hildebrandt *et al.*, 2015; Krapp *et al.*, 2011).



**Fig. 8.** *cica-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* plants are more sensitive to nutrient and water stress

- (A) Amino-acids content revealed by HPLC on six weeks plants grown as described in Fig 3 and 5 before and after a nitrate starvation. Data represent the means  $\pm$  SD of one biological replicate (n=4 plants by replicate). Statistics as in Fig 3 (p<0.001).
- (B) Response to dehydration (top figure) and ABA-induced stomata closure experiment (bottom figure) of WS, *cica-2*, *cica-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* and *cica-2/35S:AtClCa* plants grown as described in Fig 1. Data represent the means  $\pm$  SEM of three biological replicates (n=3 plants by replicate for dehydration test and 100< n <300 stomata for ABA experiment). Statistics as in Fig 5 for dehydration test and as in Fig 3 for ABA experiment. Different lower cases and upper letters indicate significant differences after light treatment and ABA treatment respectively.

We measured the amino acids content before and after a nitrate starvation (Fig. 8A). As already shown in previous studies, amino acids content decreases after nitrogen starvation in all the different analysed lines. Nevertheless, after 120h without nitrate, plants overexpressing *AtClCa<sub>E203A</sub>* display a decreased of up to  $62\pm2.5\%$  of amino acids content whereas *clca-2* and *WS* have a decrease of  $41\pm2.8\%$  and  $37\pm5\%$  respectively. The amounts of the four amino acids over-accumulated in the *clca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* *Asn*, *Ser*, *Gln* and *Gly*, are decreasing even faster than the others as their levels become similar to the ones observed in the other genotypes after the nitrogen starvation (Fig. S4). Taken together, those experiments suggest that uncoupling *AtClCa* render plant more sensitive to nitrate environmental fluctuations compared to wild-type plants. As the plants overexpressing the uncoupling *AtClCa* display a water content even lower than *clca-2*, we investigated the response to a hydric stress in *clca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* plants. The fresh weight of cut rosettes was measured over 60 min under a laminar flow and used to determine the relative water content evolution reflecting plant dehydration speed (Fig. 8B). The dehydration rates of *clca-2* and *clca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* are not significantly different and go up to  $41\pm5\%$  faster than of *WS* at the end of the kinetics. We know that, in *clca-2*, vacuolar nitrate storage diminution induces stomata movements impairment in response to abscisic acid (ABA) signals (Wege *et al.*, 2014). Thus, to gain insight into the origin of dehydration initial speed differences, we investigated stomata movement in response to ABA on epidermis peels coming from plants overexpressing *AtClCa<sub>E203A</sub>*. Both *clca-2* and plants expressing *AtClCa<sub>E203A</sub>*, under the control of the 35S or its own promoter, are not able to fully close their stomata after ABA treatment, except for the overexpressor line 8 (Fig. 8B and S1F). Thus, *AtClCa<sub>E203A</sub>* expression is not able to restore a complete stomata closure in response to ABA.

## Discussion

Here we demonstrated that the conversion of *AtClCa* from exchanger to channel is disrupting plant nitrate content and, consequently, water homeostasis inducing a limited plant growth. Plants overexpressing *AtClCa<sub>E203A</sub>* are enable to accumulate nitrate and display a strong nitrate efflux out of the vacuole. This leads to an increased assimilation thereby increasing plant amino acids and protein contents. Concomitantly, the low nitrate storage also induces a decreased water content

probably due to an osmotic effect. In mesophyll cells, the consequence is a decreased cell size likely due to limited cell enlargement whereas in guard cells, this induces stomata movements' impairment.

Our results demonstrate that mutating the 203 glutamate of AtClCa *in planta* leads to a partial complementation of the anion current compared to *c/ca-2* plants. This finding demonstrates that *AtClCa<sub>E203A</sub>* is able to transport anions. However, the current measured in vacuoles extracted from *c/ca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* plants mostly corresponds to an anion efflux in physiological conditions (ie, with a tonoplast potential of -30 mV) (Cookson *et al.*, 2005). Furthermore, we measured a shift of reversal potential in line with an anion transport uncoupled from protons, this is in agreement with a previous work performed in *Xenopus* oocytes (Bergsdorf *et al.*, 2009).

In plants, the mutation of the glutamate 203 creates a modification of the anion fluxes through the vacuolar membrane. As in continuous nitrate-supplied conditions, *AtClCa<sub>E203A</sub>* overexpressing plants have a lower nitrate content than *c/ca-2* plants. After nitrate starvation, nitrate remobilization from the compartment is faster in those plants compared to WS and *c/ca-2* indicating that *AtClCa<sub>E203A</sub>* seems to favour nitrate efflux from the vacuole to the cytosol. This is consistent with the outward current measured by electrophysiology. When nitrate is supplied after starvation or during stomata opening, two steps are detected in the kinetics. In the first phase, the response in *c/ca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* lines is similar to the one observed in *c/ca-2*. This initial step suggests that the entry of nitrate into the vacuoles in these different genotypes is mainly due to other transporters such as AtClCb (Monachello *et al.*, 2009; von der Fecht-Bartenbach *et al.* 2010) and that *AtClCa<sub>E203A</sub>* does not contribute much to this process. In the second phase, plants over-expressing *AtClCa<sub>E203A</sub>* have amplified response compared to the KO *AtClCa* mutant. This result implies that the mutation E203A in AtClCa stimulates nitrate efflux from the vacuole when a certain threshold is reached for nitrate content inside this compartment. It is consistent with a channel behaviour in which the ion flux is driven by the ions electrochemical potential. Altogether, the characterization of the plants *c/ca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* sustains that the gating glutamate is essential for the entry of anions in the vacuole and its mutation leads to favour anion efflux from this compartment in physiological conditions.

The short distance transport modification between cytoplasm and vacuole enhances plant nitrate assimilation. In *c/ca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* plants, the decrease of a big vacuolar storage pool of inorganic nitrogen leads to bigger amount of amino acids and proteins that constitute an organic storage. Interestingly, among the accumulated amino acids, asparagine and glutamine are amongst the ones preferentially transported through the plant (Havé *et al.*, 2017). Serine and glycine, also strongly accumulated in the over-expressors. They are mainly produced by photorespiration, a metabolic pathway that supplies reductants such as NADPH necessary for nitrate assimilation in C3 plants (Migge *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2002; Bloom, 2015). The increase of nitrate assimilation in *c/ca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* lines could stimulate the photorespiratory pathway and thereby induce a high production of serine and glycine. In plants, over expressing *AtClCa<sub>E203A</sub>*, we also observe a fourfold increase of the malate content. This increase is complex to explain, as malate is a charged anion that could compensate nitrate depletion but is also a substrate of photorespiratory pathway producing reductants. Finally, malate might be able to compensate the alkalinisation due to nitrate metabolism (Monachello *et al.*, 2009; Krapp *et al.*, 2011; Bloom, 2015). A previous study showed that a decrease of the nitrate vacuolar sequestration in roots induces a higher translocation to the shoot and a higher assimilation and biomass (Han *et al.*, 2016). Our results are in partial agreement with this as we observe a high assimilation in shoots and a low storage in roots. However, we observe a biomass decrease in plants over-expressing *AtClCa<sub>E203A</sub>*. The discrepancy could be due to the consequences of the gating glutamate mutation on the water homeostasis as nitrate participates to the hydric potential maintenance as a major osmoticum and as a signalling molecule controlling the expression of gene encoding aquaporins (McIntyre, 1997; Cramer *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). AtClCa is mostly expressed in leaves and particularly in mesophyll and guard cells; interestingly the mutation of the gating glutamate in AtClCa has different consequences according to the cell type considered. In mesophyll cells, the decreased vacuolar storage of nitrate induces a decreased cell hydric potential and enlargement probably participating to the lower growth rate that we observe. In guard cells, this effect on the hydric potential leads to impaired stomata movement. Consequently, gas exchanges, and particularly carbon dioxide fixation, are likely to be disrupted, which in turn could reduce

photosynthesis efficiency and plant growth. The respective contribution of each cell type to the water content and growth decrease is unknown. Furthermore, a mutation of the gating glutamate is reducing the amount of negative charges in the vacuole. In mammals, it has been suggested that this charge balance is required for proper V-ATPase function and intra-compartment pH maintenance. Consequently, such a pH homeostasis disruption could be one of the reason leading to plant growth deficiency (Krebs *et al.*, 2010).

In response to a nutrient stress, such as a nitrogen starvation, plants with a mutated form of AtClCa for the gating glutamate show a very fast nitrate remobilization due to a limited amount stored in vacuoles. This limitation likely explains the strong decrease of amino acids observed after 120h of N starvation. Such a decrease is also likely to be due to a higher remobilization of those amino acids from the shoots to the roots to support root growth (Krapp *et al.*, 2011). This is supported by the stronger decrease of the contents of Asn and Gln, two of the most exported amino acids through the plant, in *c/ca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* lines upon N starvation compared to other genotypes. In the case of a hydric stress, plants overexpressing *AtClCa<sub>E203A</sub>* are as sensitive as *c/ca-2* to drought. As already described, stomata closure in response to ABA is impaired in *c/ca-2* (Wege *et al.*, 2014). The expression of *AtClCa<sub>E203A</sub>* is apparently not able to restore stomata closure efficiency in response to ABA, but this could also be linked to the very limited stomata opening measured. The higher dehydration sensitivity could then be due to the stomata closure in response to ABA but also to the decreased water content in mesophyll cells.

In conclusion, although a mutation of the gating glutamate leads to a higher plant nutritional value, it also induces a decrease of plant growth due to water homeostasis disruption and a higher sensitivity to abiotic stresses. The conservation of the exchange mechanism of AtClCa is then likely to be correlated to the maintenance of the nitrate and water homeostasis whatever the external fluctuations. All the closest homologs of AtClCa, based on peptide sequence analysis, from algae, lycophytes, bryophytes and spermatophytes have conserved the gating glutamate residue in their sequence (Fig. S5). This conservation supports the very strong importance of this residue. Finally, we could wonder if a specific expression of AtClCa, for example in roots, would provide plants with high protein level (Chope *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2016) but without the growth disruption probably

## Résultats

---

inferred to mesophyll and guard cells expression. This may produce plants with high nutritional value without any trade off with grain yield.

## References

- De Angeli A, Monachello D, Ephritikhine G, Frachisse JM, Thomine S, Gambale F, Barbier-Brygoo H. 2006. The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* 442: 939–942.
- Bergsdorf E, Zdebik AA, Jentsch TJ. 2009. Residues Important for Nitrate / Proton Coupling in Plant and Mammalian CLC Transporters \*. *284*: 11184–11193.
- Bloom AJ. 2015. Photorespiration and nitrate assimilation: A major intersection between plant carbon and nitrogen. *Photosynthesis Research* 123: 117–128.
- Boyer JS. 1968. Relationship of Water Potential to Growth of Leaves '. *1*: 1056–1062.
- Boyer JS. 1982. Plant Productivity and Environment. *Science* 218: 443–448.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- Brouwer R. 1962. Nutritive influences on the distribution of dry matter in the plant. *Netherlands Journal of Agricultural Science* 10: 399–408.
- Chen BM, Wang ZH, Li SX, Wang GX, Song HX, Wang XN. 2004. Effects of nitrate supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate concentration and nitrate reductase activity in three leafy vegetables. *Plant Science* 167: 635–643.
- Chope GA, Wan Y, Penson SP, Bhandari DG, Powers SJ, Shewry PR, Hawkesford MJ. 2014. Effects of Genotype, Season, and Nitrogen Nutrition on Gene Expression and Protein Accumulation in Wheat Grain. *Journal of agricultural and food chemistry* 62: 4399–4407.
- Clough SJ, Bent AF. 1998. Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16: 735–743.
- Cookson SJ, Williams LE, Miller AJ. 2005. Light-dark changes in cytosolic nitrate pools depend on nitrate reductase activity in *Arabidopsis* leaf cells. *Plant physiology* 138: 1097–1105.
- Costa A, Vijay Kanth Gutla P, Boccaccio A, Scholz-Starke J, Festa M, Basso B, Zanardi I, Pusch M, Lo Schiavo F, Gambale F, et al. 2012. The *Arabidopsis* central vacuole as an expression system for intracellular transporters: Functional characterization of the Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> exchanger CLC-7. *Journal of Physiology* 590: 3421–3430.
- Cramer MD, Hawkins H-J, Verboom GA. 2009. The importance of nutritional regulation of plant. *Oecologia* 161: 15–24.
- Crawford NM. 1995. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *The Plant cell* 7: 859–68.
- Curtis MD, Grossniklaus U. 2003. A Gateway cloning vector set for high-hhroughput hunctional hnalysis of genes in planta. *Breakthrough technologies* 133: 462–469.
- Davies DD, Humphrey TJ. 1978. Amino Acid Recycling in Relation to Protein Turnover. *Plant Physiology* 61: 54–58.
- Dechorganat J, Nguyen CT, Armengaud P, Jossier M, Diatloff E, Filleur S, Daniel-Vedele F. 2011. From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. *Journal of Experimental Botany* 62:

1349–1359.

Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. 2002. X-ray structure of a CIC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* **415**: 287–294.

Dutzler R, Campbell EB, MacKinnon R. 2003. Gating the selectivity filter in CIC chloride channels. *Science (New York, N.Y.)* **300**: 108–112.

Von Der Fecht-Bartenbach J, Bogner M, Dynowski M, Ludewig U. 2010. CLC-b-mediated no<sub>3</sub><sup>-</sup>/H<sup>+</sup> exchange across the tonoplast of arabidopsis vacuoles. *Plant and Cell Physiology* **51**: 960–968.

Gadsby DC. 2009. Ion channels versus ion pumps: The principal difference, in principle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**: 344–352.

Geelen D, Lurin C, Bouchez D, Frachisse JM, Lelièvre F, Courtial B, Barbier-Bryggo H, Maurel C. 2000. Disruption of putative anion channel gene AtCLC-a in Arabidopsis suggests a role in the regulation of nitrate content. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **21**: 259–267.

Han Y-L, Song H-X, Liao Q, Yu Y, Jian S-F, Lepo JE, Liu Q, Rong X-M, Tian C, Zeng J, et al. 2016. Nitrogen use efficiency is mediated by vacuolar nitrate sequestration capacity in roots of Brassica napus. *Plant Physiology* **170**: pp.01377.2015.

Havé M, Marmagne A, Chardon F, Masclaux-Daubresse C. 2017. Nitrogen remobilization during leaf senescence: Lessons from Arabidopsis to crops. *Journal of Experimental Botany* **68**: 2513–2529.

Hildebrandt TM, Nunes Nesi A, Araújo WL, Braun HP. 2015. Amino Acid Catabolism in Plants. *Molecular Plant* **8**: 1563–1579.

Huang Y, Drengstig T, Ruoff P. 2012. Integrating fluctuating nitrate uptake and assimilation to robust homeostasis. *Plant, Cell and Environment* **35**: 917–928.

Jossier M, Kroniewicz L, Dalmas F, Le Thiec D, Ephritikhine G, Thomine S, Barbier-Bryggo H, Vavasseur A, Filleur S, Leonhardt N. 2010. The Arabidopsis vacuolar anion transporter, AtCLCc, is involved in the regulation of stomatal movements and contributes to salt tolerance. *The Plant Journal* **64**: 563–576.

Karimi M, Inze D, Depicker A. 2002. GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* **7**: 193–195.

Krapp A, Berthome R, Orsel M, Mercey-Boutet S, Yu A, Castaings L, Elftieh S, Major H, Renou J-P, Daniel-Vedele F. 2011. Arabidopsis Roots and Shoots Show Distinct Temporal Adaptation Patterns toward Nitrogen Starvation. *Plant Physiology* **157**: 1255–1282.

Lísal J, Maduke M. 2008. The CIC-0 chloride channel is a 'broken' Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Nature structural & molecular biology* **15**: 805–10.

Lv Q dan, Tang R jie, Liu H, Gao X shu, Li Y zhou, Zheng H qiong, Zhang H xia. 2009. Cloning and molecular analyses of the Arabidopsis thaliana chloride channel gene family. *Plant Science* **176**: 650–661.

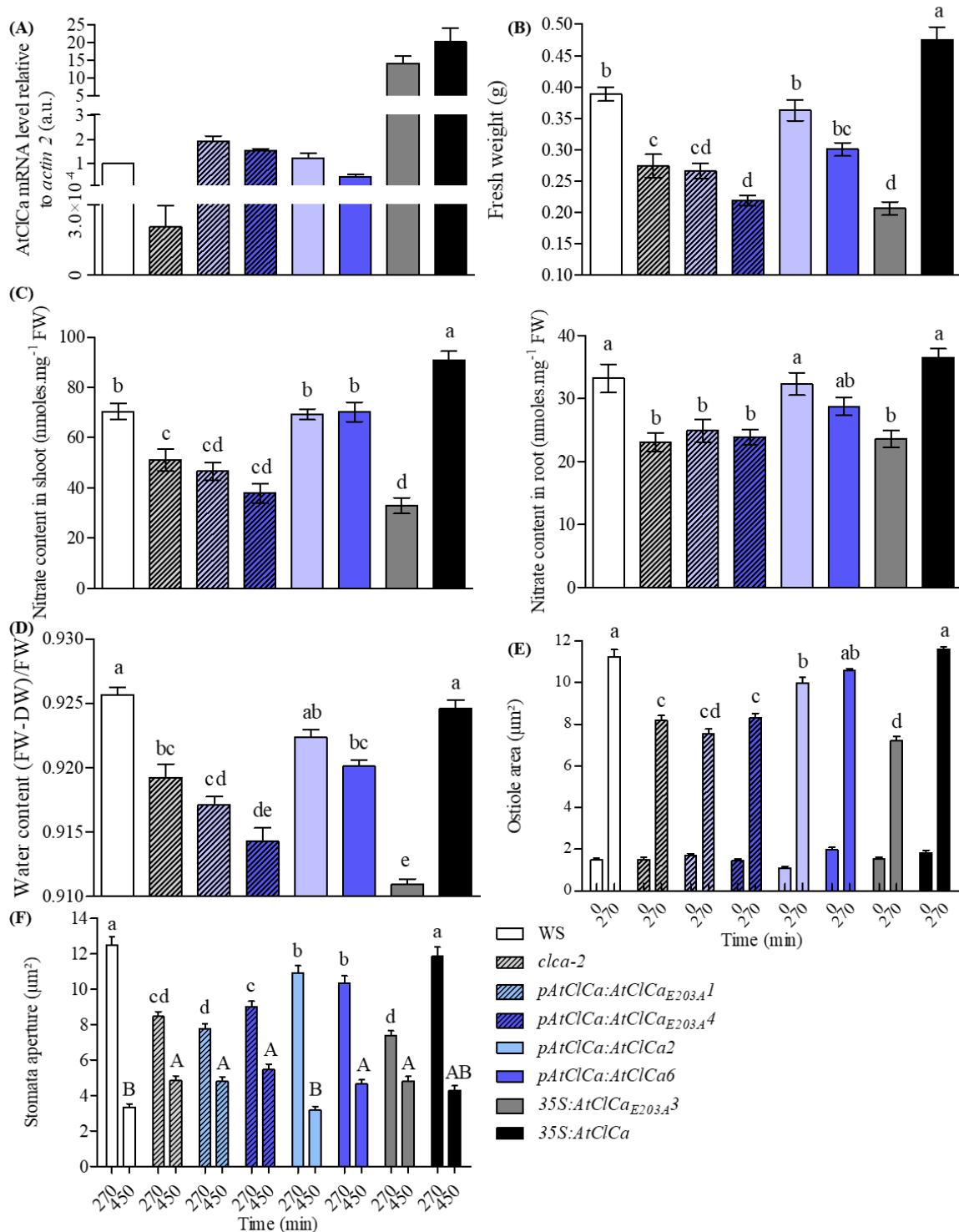
- Martin A, Lee J, Kichey T, Gerentes D, Zivy M, Tatout C, Dubois F, Balliau T, Valot B, Davanture M, et al.** 2006. Two Cytosolic Glutamine Synthetase Isoforms of Maize Are Specifically Involved in the Control of Grain Production. *the Plant Cell Online* 18: 3252–3274.
- Martinoia E, Heck U, Wiemken A.** 1981. Vacuoles as storage compartments for nitrate in barley leaves. *Nature* 289: 292–294.
- McIntyre GI.** 1997. The Role of Nitrate in the Osmotic and Nutritional Control of Plant Development. *Australian Journal of Plant Physiology* 24: 103–118.
- McIntyre GI.** 2001. Control of plant development by limiting factors: A nutritional perspective. *Physiologia Plantarum* 113: 165–175.
- Migge A, Carayol E, Hirel B, Becker TW.** 2000. Leaf-specific overexpression of plastidic glutamine synthetase stimulates the growth of transgenic tobacco seedlings. *Planta* 210: 252–260.
- Miller AJ, Smith SJ.** 1992. The mechanism of nitrate transport across the tonoplast of barley root cells. *Planta* 187: 554–557.
- Miller AJ, Smith SJ.** 2008. Cytosolic nitrate ion homeostasis: Could it have a role in sensing nitrogen status? *Annals of Botany* 101: 485–489.
- Mindell JA, Maduke M.** 2001. CIC chloride channels. *Genome biology* 2.
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA.** 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Biology and Chemistry* 5: 62–71.
- Monachello D, Allot M, Oliva S, Krapp A, Daniel-Vedele F, Barbier-Brygoo H, Ephritikhine G.** 2009. Two anion transporters AtClCa and AtClCe fulfil interconnecting but not redundant roles in nitrate assimilation pathways. *New Phytologist* 183: 88–94.
- Nguyen CT, Agorio A, Jossier M, Dépré S, Thomine S, Filleur S.** 2016. Characterization of the chloride channel-like, AtCLCg, involved in chloride tolerance in *arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 57: 764–775.
- Noctor G, Bergot G, Mauve C, Thominet D, Lelarge-Trouverie C, Prioul JL.** 2007. A comparative study of amino acid measurement in leaf extracts by gas chromatography-time of flight-mass spectrometry and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Metabolomics* 3: 161–174.
- Novarino G, Weinert S, Rickheit G, Jentsch TJ.** 2010. Endosomal Chloride-Proton Exchange. *Science* 328: 1398–1402.
- Oliveira IC, Brears T, Knight TJ, Clark A, Coruzzi GM.** 2002. Overexpression of cytosolic glutamine synthetase. Relation to nitrogen, light, and photorespiration. *Plant physiology* 129: 1170–1180.
- Park E, Campbell EB, MacKinnon R.** 2017. Structure of a CLC chloride ion channel by cryo-electron microscopy. *Nature* 541: 500–505.
- Picollo A, Pusch M.** 2005. Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins CLC-4 and CLC-5. *Nature* 436: 420–423.
- Poroca DR, Pelis RM, Chappe VM.** 2017. CLC channels and transporters: Structure, physiological

- functions, and implications in human chloride channelopathies. *Frontiers in Pharmacology* 8: 1–25.
- Roelfsema MRG, Hedrich R.** 2005. In the light of stomatal opening: New insights into 'the Watergate'. *New Phytologist* 167: 665–691.
- Schumaker KS, Sze H.** 1987. Decrease of pH Gradients in Tonoplast Vesicles by NO(3) and Cl: Evidence for H-Coupled Anion Transport. *Plant physiology* 83: 490–6.
- Strahm BD, Harrison RB.** 2006. Nitrate Sorption in a Variable-Charge Forest Soil of the Pacific Northwest. *Soil Science* 171: 313–321.
- Urriola J, Rathore KS.** 2015. Overexpression of a glutamine synthetase gene affects growth and development in sorghum. *Transgenic Research* 24: 397–407.
- Vivancos PD, Driscoll SP, Bulman CA, Ying L, Emami K, Treumann A, Mauve C, Noctor G, Foyer CH.** 2011. Perturbations of Amino Acid Metabolism Associated with Glyphosate-Dependent Inhibition of Shikimic Acid Metabolism Affect Cellular Redox Homeostasis and Alter the Abundance of Proteins Involved in Photosynthesis and Photorespiration. *Plant Physiology* 157: 256–268.
- Wang M, Ding L, Gao L, Li Y, Shen Q, Guo S.** 2016. The Interactions of Aquaporins and Mineral Nutrients in Higher Plants. *International journal of molecular sciences* 17.
- Wege S, De Angeli A, Droillard M., Kroniewicz L, Merlot S, Cornu D, Gambale F, Martinoia E, Barbier-Brygoo H, Thomine S, et al.** 2014. Phosphorylation of the vacuolar anion exchanger AtCLCa is required for the stomatal response to abscisic acid. *Science Signaling* 7.
- Wege S, Jossier M, Filleur S, Thomine S, Barbier-Brygoo H, Gambale F, De Angeli A.** 2010. The proline 160 in the selectivity filter of the Arabidopsis NO<sub>3</sub><sup>–</sup>/H<sup>+</sup> exchanger AtCLCa is essential for nitrate accumulation in planta. *The Plant Journal* 63: 861–869.
- Weinert S, Jabs S, Supanchart C, Schweizer M, Gimber N, Richter M, Rademann J, Stauber T, Kornak U, Jentsch TJ.** 2010. Lysosomal pathology and osteopetrosis upon loss of H<sup>+</sup>-driven lysosomal Cl<sup>–</sup> accumulation. *Science* 328: 1401–1403.
- Yu LH, Wu J, Tang H, Yuan Y, Wang SM, Wang YP, Zhu QS, Li SG, Xiang C Bin.** 2016. Overexpression of arabidopsis NLP7 improves plant growth under both nitrogen-limiting and-sufficient conditions by enhancing nitrogen and carbon assimilation. *Scientific Reports* 6: 1–13.
- Zhong PJ, Gallardo F, Pascual MB, Sampalo R, Romero J, De Navarra AT, Cánovas FM.** 2004. Improved growth in a field trial of transgenic hybrid poplar overexpressing glutamine synthetase. *New Phytologist* 164: 137–145.

### Acknowledgements

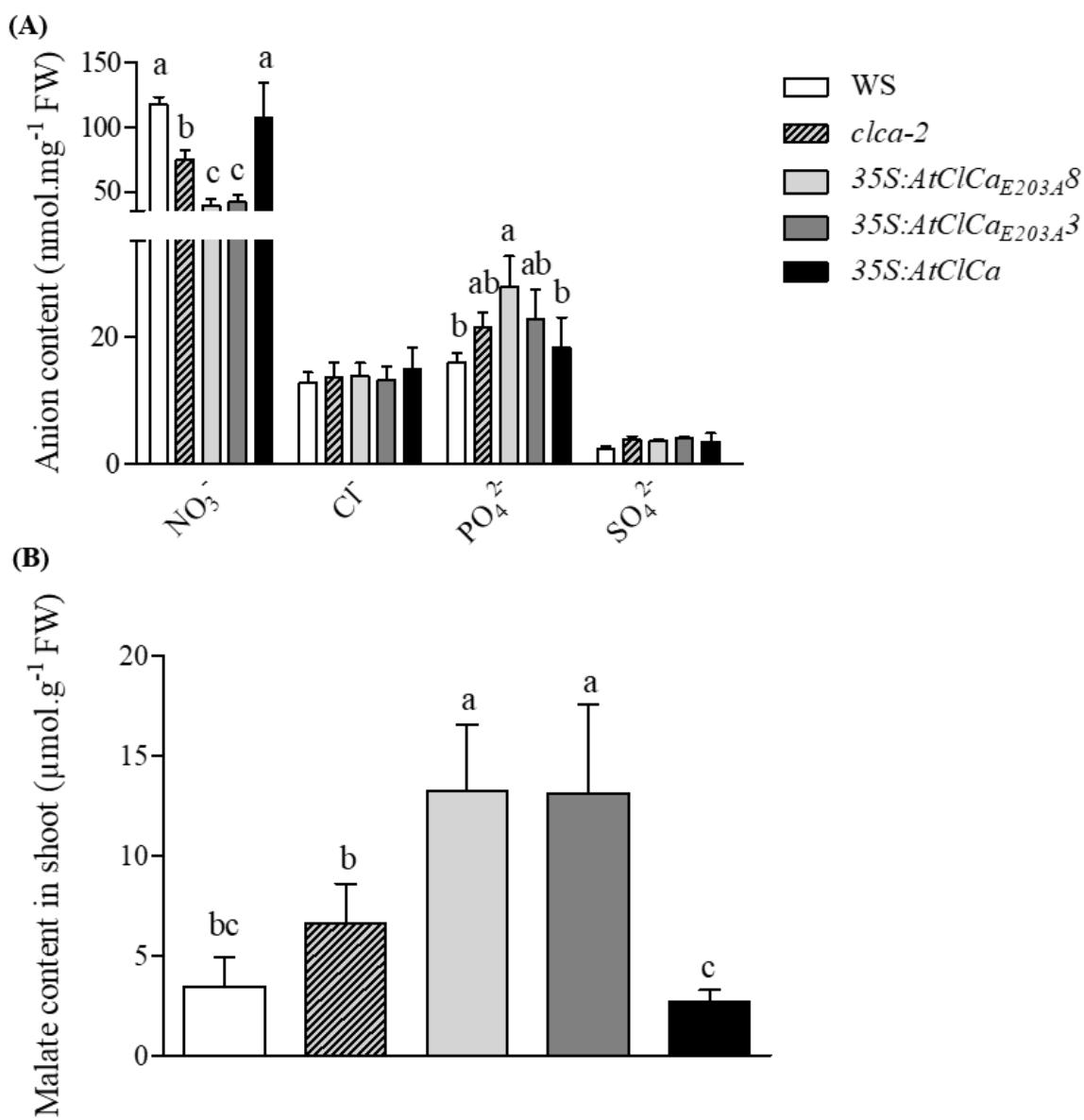
We thank R. Le bars and L. Besse for their help with microscopy acquisitions and analyses (I2BC, Imagerie Gif, Gif sur Yvette) and C. Mauve for her help with amino acids and anions HPLC quantification (IPS2, Metabolomic platform, Gif sur Yvette). **Funding:** This research was financially supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) **Author contributions:** C. Lind and A. De Angeli performed electrophysiology measurements, M. Bianchi created an ImageJ program for stomatal aperture measurement, F. Abou-Choucha generated the *AtC/Ca<sub>E203A</sub>* overexpressing plants, M. Bourge performed the flow-cytometry measurements, S. Filleur designed the research, helped wrote the manuscript and supervised all experiments. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests.

Supplementary data



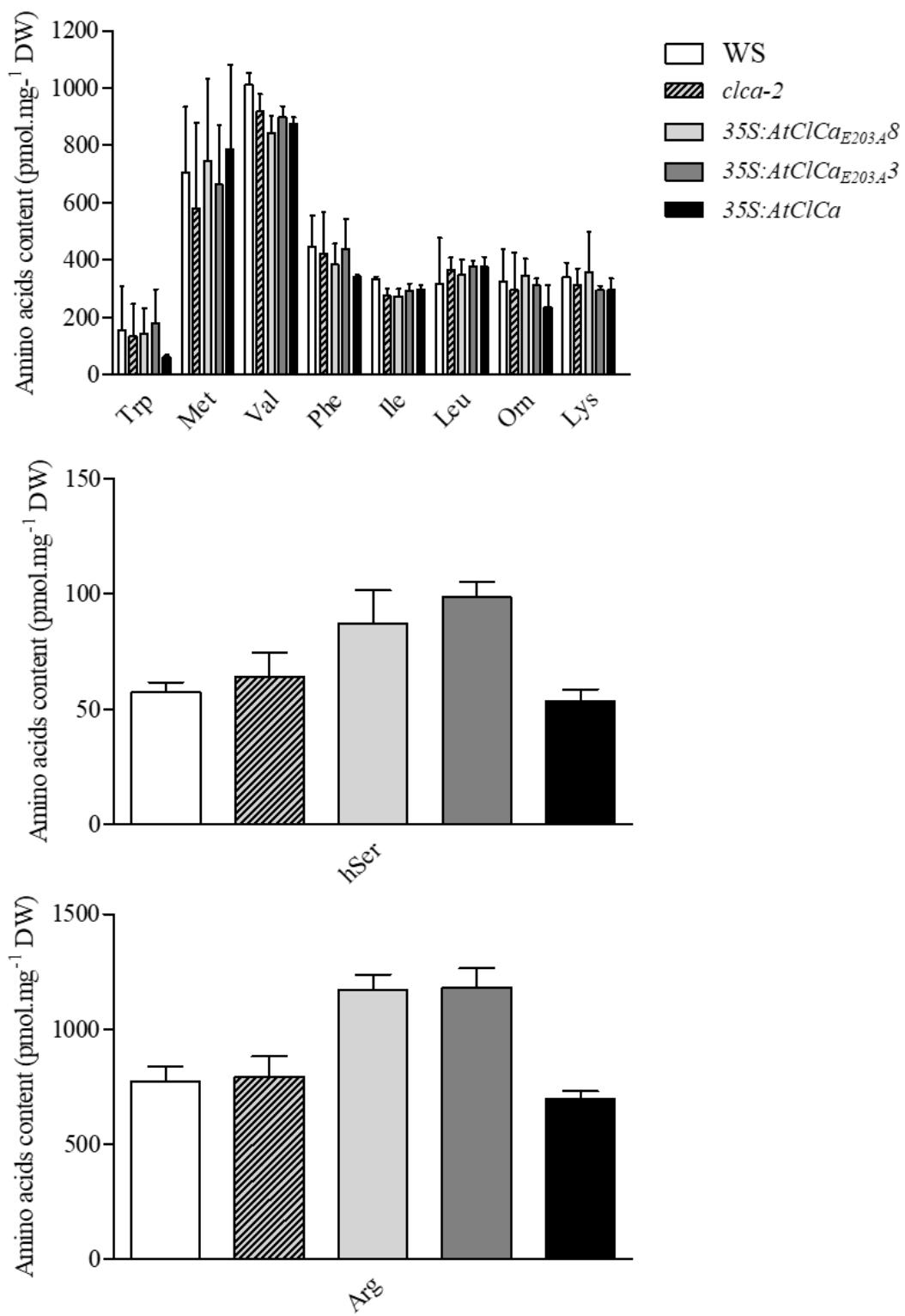
**Fig. S1. Physiological consequences of pAtClCa:AtClCa<sub>E203A</sub> expression in clca-2**

(A) RT-qPCR quantification of AtClCa expression, (B) Shoot fresh weight, (C) Endogenous nitrate content, (D) Relative water content, (E) Stomata opening in response to light and closure in response to ABA of *clca-2* plant lines stably transformed with pAtClCa:AtClCa and pAtClCa:AtClCa<sub>E203A</sub>. Experiments conditions are the same as previously described with the 35S promoter as well as statistical analysis, P<0.01 for (F).



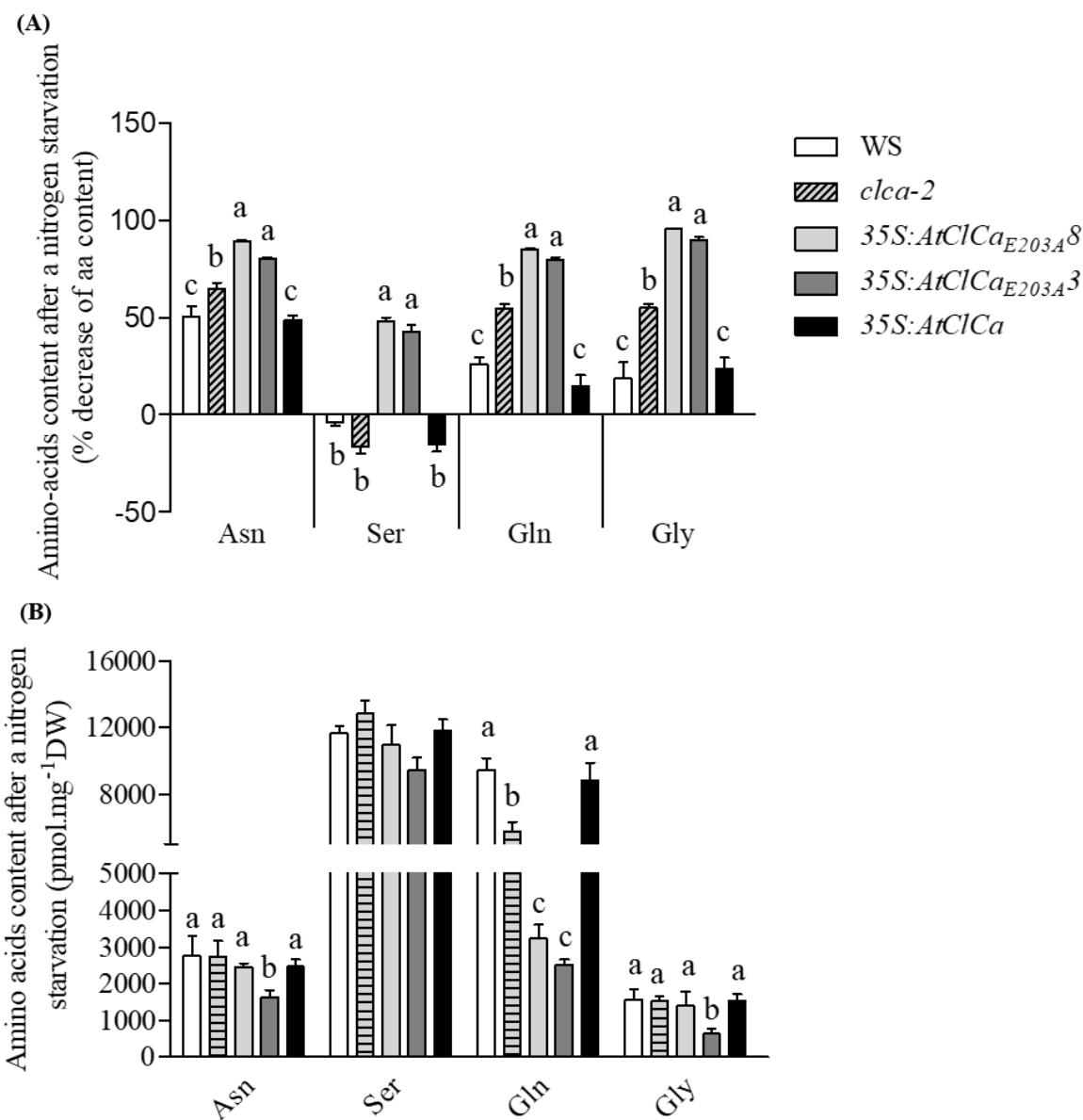
**Fig. S2.** *clca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* plants do not over accumulate inorganic anions appart from nitrate but accumulate malate

Endogenous inorganic anion (A) and malate (B) content of WS, *clca-2*, *clca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* and *clca-2/35S:AtClCa* plants shoots grown in hydroponics as described in legend of Fig 3. Data represent the means  $\pm$  SD of two experiments (with  $2 < n < 9$  by experiment). Statistical analysis as in Fig 3.



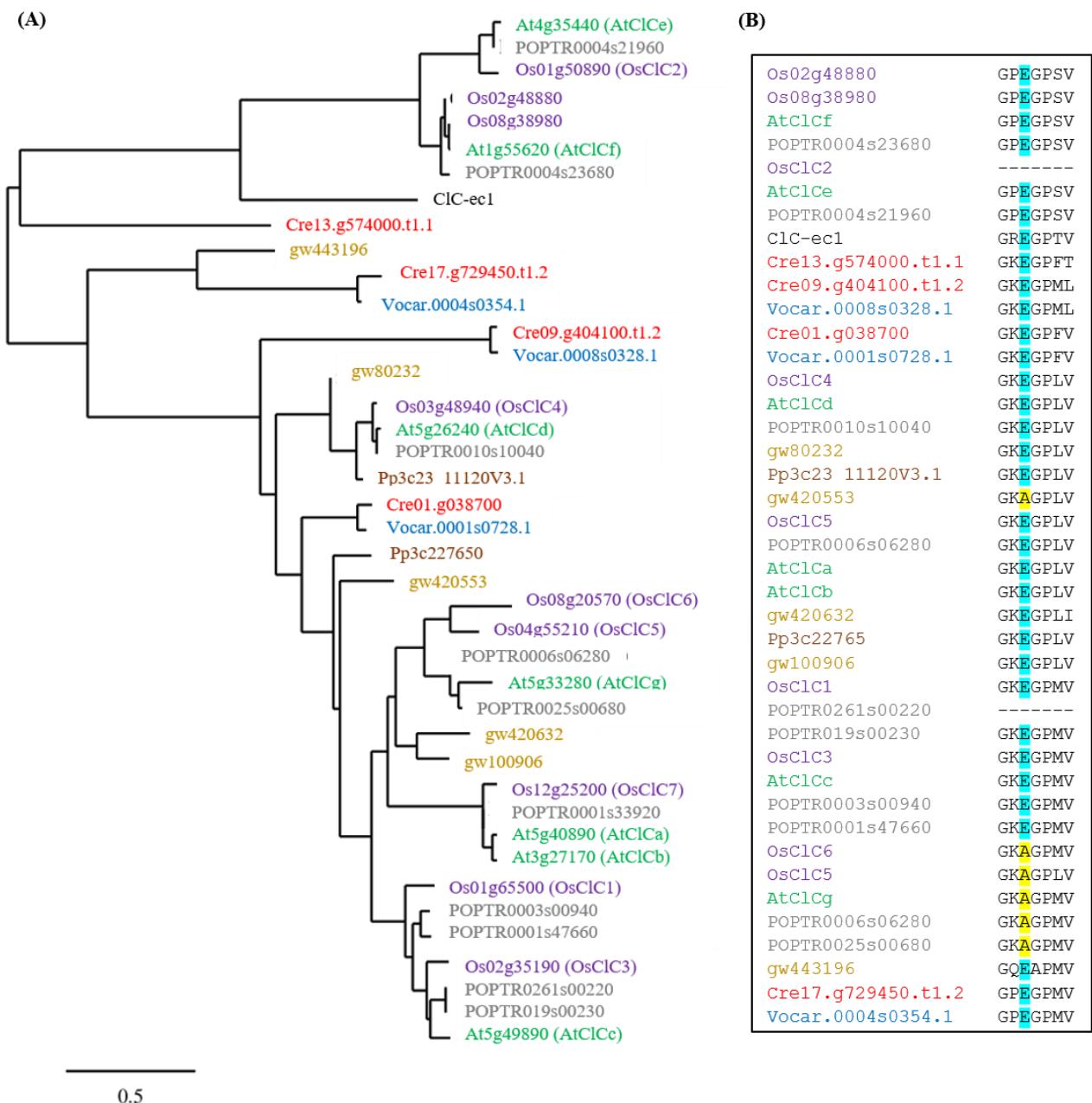
**Fig. S3. Contents of the amino-acids not modified in *clca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* plants**

Modification of individual amino-acids content revealed by HPLC on five weeks plants grown as described in Fig 3. Data represent the means  $\pm$  SD of one biological replicate (n=4).



**Fig. S4.** Nitrate starvation leads to amino acid spectrum modification in plants overexpressing *AtClCaE203A*

Percentage of individual amino-acids content decrease (A) and absolute amino-acid content (B) after a nitrogen starvation revealed by HPLC on five weeks plants grown as described in Fig 3. Data represent the means  $\pm$  SD of one biological replicate (n=4). Statistical analysis as in Fig 5.



**Fig. S5. The gating glutamate is highly conserved in AtClCa closest homologs**

(A) Dendrogram of the CIC family in different plant species: *Arabidopsis thaliana* (green), the rice (purple), the poplar (grey), two green algae (*Chlamydomonas reinhardtii* in red and *Volvox carteri* in blue), a lycophyte (*Selaginella moellendorffii* in yellow) and a bryophyte (*Physcomitrella patens* in brown). The protein sequences with homology to AtClCa were retrieved from databases described in Barbier-Brygoo *et al* (2011) and phytozome using Blast homology searches and aligned with phylogeny. The sequence of the bacterial CIC from *Escherichia coli* (*ClC-ec1*) was added as a reference.

(B) Protein sequence alignment in the region of the gating glutamate

### Perspectives

As mentioned before, the electrophysiological characterization of *clca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* plants is not complete. The results presented here indicate that *AtClCa<sub>E203A</sub>* is able to transport anions, as demonstrated by the higher current density found in *clca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* compared to *clca-2* vacuoles. Furthermore, the reversal potential difference between *clca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* and *clca-2* confirms the presence in the complemented line of a transport system absent in *clca-2*. However, some question are still open and need further experiments to conclude. First, we need to understand if *AtClCa<sub>E203A</sub>* is converted into a channel. For this, we need to measure the reversal potential while changing the H<sup>+</sup> gradient across the membrane in symmetric anion conditions. A modification of the reversal potential would indicates that the transport reaction catalysed by *AtClCa<sub>E203A</sub>* is still coupled to H<sup>+</sup>, even if with a lower coupling ratio. Differently, if the *AtClCa<sub>E203A</sub>* is a channel, then no reversal potential variation in response to a H<sup>+</sup> gradient should be measured. A second aspect is to investigate if the mutation E203A has modified the anion selectivity of the channel. In *Xenopus* oocytes Bergsdorf et al (2009) found that E203A mutation leads to a modification of the selectivity of AtClCa. They observed a higher selectivity for chloride over nitrate. However, *Xenopus* oocytes does not allow the control of the ionic conditions on both sides of the membrane. Thus, to see if we can observe a modification of the selectivity, the chloride solution will be replaced by a nitrate solution in the cytosolic side. The measurement of the current density and reversal potential will give insight into a possible selectivity change. If *AtClCa<sub>E203A</sub>* has a Nernstian conductance, it will be possible to use GHK (Goldman-Hodgkin-Katz) equation to estimate the permeability of the different ionic species.

### B. Résultats complémentaires

#### 1. Recherche de conditions permettant une complémentation de la teneur en nitrate chez *AtClCa<sub>E203A</sub>*

Lors de la partie précédente, nous avons mis en évidence une diminution très importante de la teneur en nitrate chez les plantes exprimant AtClCa converti en canal. Nous avons été surpris d'observer qu'une mutation ponctuelle dans le gating glutamate, non seulement engendre une absence de complémentation du phénotype observé chez *c/ca-2*, mais aussi une aggravation de ce phénotype lorsque cette protéine est surexprimée. Par définition, le transport au sein d'un canal est contrôlé par le gradient de potentiel électrochimique de l'ion transporté de part et d'autre de la membrane. L'approvisionnement en nitrate est donc un paramètre crucial pour les quantifications de nitrate endogène chez les plantes surexprimant *AtClCa<sub>E203A</sub>*. Nous avons donc cultivé ces plantes dans différentes conditions d'approvisionnement en nitrate afin de voir si une de ces conditions pouvait conduire à une complémentation totale ou partielle de la teneur en nitrate chez ce mutant. Comme mentionné précédemment, le métabolisme du nitrate et particulièrement l'équilibre entre le stockage et l'assimilation est lié à la photopériode. C'est pourquoi nous avons cultivé nos plantes présentant la forme mutée de l'échangeur dans différentes conditions de photopériode afin de voir si l'une d'elle pouvait mener à une complémentation du phénotype de stockage en nitrate et donc peut être de croissance.

a) La sous-accumulation du nitrate chez les plantes surexprimant *AtClCa<sub>E203A</sub>* est conservée quelle que soit la teneur en nitrate dans le milieu de culture

L'effet de la concentration en nitrate dans le milieu de culture sur la teneur en nitrate endogène des plantes surexprimant *AtClCa<sub>E203A</sub>* a été testé sur une culture *in vitro* (voir matériel et méthodes). Dans un premier temps, une culture sur milieu ½ MS a permis de vérifier si le phénotype observé en hydroponie pouvait être obtenu *in vitro*, avec un apport en nitrate important (19 mM) (Figure 22). Dans ces conditions, l'expression d'*AtClCa<sub>E203A</sub>* conduit dans les parties aériennes à une baisse de la teneur en nitrate d'au plus 54±3% par rapport au WS et 34±4% par rapport au KO *c/ca-2*. Au niveau racinaire, les plantes sur exprimant *AtClCa<sub>E203A</sub>* ont une teneur en nitrate diminuée de

48±3% par rapport au WS. Le phénotype observé est qualitativement le même que lorsque les plantes sont cultivées en hydroponie sur milieu Hoagland modifié.

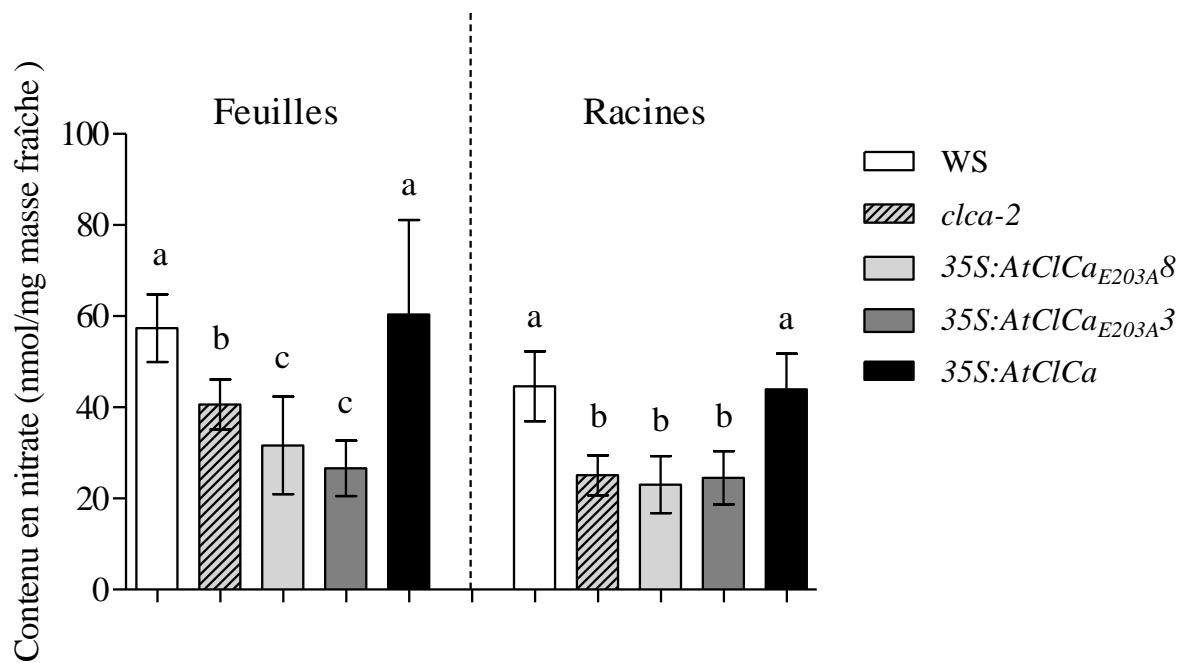


Figure 22: La mutation du gating glutamate engendre une diminution de la teneur en nitrate endogène. La teneur en nitrate a été déterminée chez WS, *clca-2* et *clca-2* sur exprimant *AtClCa<sub>E203A</sub>* ou *AtClCa* dans les feuilles et les racines âgées de 21 jours. Les plantes ont été cultivées *in vitro* sur milieu ½ MS. Les valeurs représentent la moyenne ± l'écart type calculés sur trois réplicats biologiques. La significativité statistique est calculée par une analyse de la variance (One-way ANOVA) suivie d'un test de Bonferroni ( $p<0.05$ ), les différences significatives sont figurées par des lettres distinctes.

Afin de voir si *AtClCa<sub>E203A</sub>* peut compléter le phénotype observé chez *clca-2* en conditions d'approvisionnement en nitrate élevée ou faible, les plantes ont été cultivées *in vitro* sur milieu Hoagland modifié contenant 0,75 mM, 1,5 mM ou 3 mM de nitrate (voir matériel et méthodes) (Figure 23).

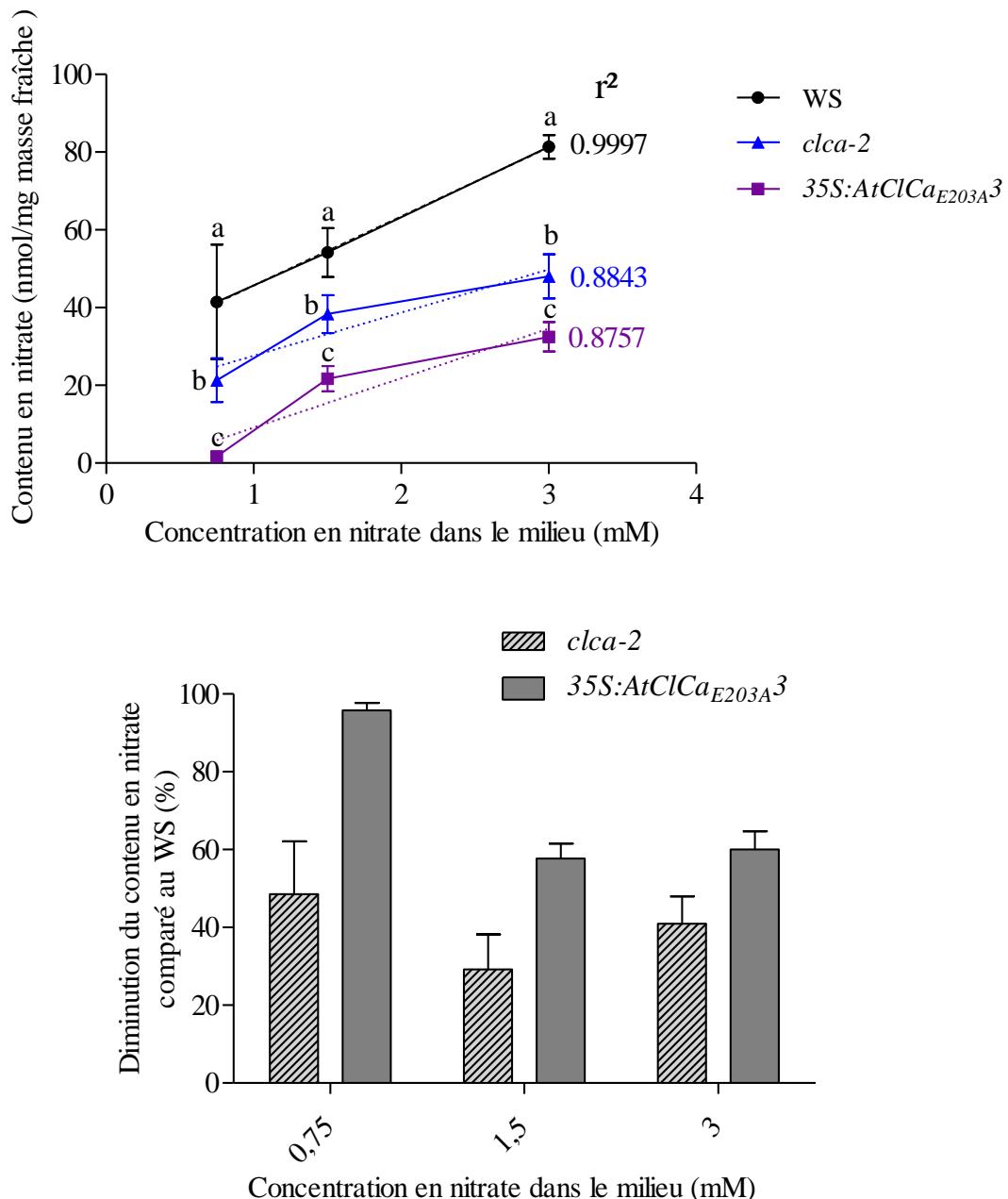


Figure 23: Les plantes surexprimant *AtClCaE203A* n'accumulent plus le nitrate en conditions limitantes. La teneur en nitrate a été déterminée chez WS, *clca-2* et *clca-2* surexprimant *AtClCaE203A* dans les feuilles. Les plantes ont été cultivées *in vitro* sur milieu Hoagland modifié pendant 21 jours (voir matériel et méthodes). Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  l'écart type calculés sur un réplicat biologique. La significativité statistique est calculée par une analyse de la variance (Two-way ANOVA) suivie d'un test de Bonferroni ( $p < 0.05$ ), les différences significatives sont figurées par des lettres distinctes. Un test de linéarité a été effectué, les droites sont représentées en pointillés ainsi que le coefficient de corrélation ( $r^2$ ).

Dans le cas d'une très faible teneur en nitrate dans le milieu (0,75 mM), la teneur en nitrate foliaire est  $96 \pm 1\%$  plus faible chez les mutants pour le gating glutamate par rapport au WS et  $88 \pm 4\%$  par rapport au *c/ca-2*. Si l'approvisionnement en nitrate est de 1,5 mM, cette différence diminue à  $60 \pm 5\%$  par rapport au WS et  $43 \pm 7\%$  par rapport au *c/ca-2*. En présence de 3 mM, les résultats sont similaires à ceux observés avec 1,5 mM. En conditions limitantes, le mutant présentant un canal ne semble plus stocker de nitrate du tout, c'est l'augmentation de la teneur en nitrate dans le milieu extérieur qui permet de visualiser un stockage chez ces plantes. Par ailleurs, en réponse à un approvisionnement croissant en nitrate, la teneur en nitrate endogène du WS augmente de façon proportionnelle, alors que chez le KO pour AtClCa ou chez le mutant pour le gating glutamate cette évolution n'est pas linéaire. Le test de linéarité donne un coefficient de corrélation  $r^2$  de 0.9997 chez le WS et 0.8757 pour les plantes surexprimant *AtClCa<sub>E203A</sub>*.

- a) La photopériode n'impacte pas le stockage du nitrate chez les plantes surexprimant *AtClCa<sub>E203A</sub>*

Comme mentionné dans l'introduction (paragraphe A1), la photosynthèse et le métabolisme azoté sont interconnectés. De plus, l'assimilation du nitrate dépend de l'activité de la nitrate réductase, elle-même activée à la lumière. C'est pourquoi, nous avons décidé d'observer l'effet de la photopériode sur le phénotype nitrate des plantes surexprimant *AtClCa<sub>E203A</sub>* dans lesquelles l'assimilation de l'azote est modifiée. Les plantes ont été cultivées sur substrat Jiffy® dans des conditions de jours courts, longs ou continus. Dans chacune des expériences, les analyses ont été effectuées sur des plantes au même stade de développement (voir matériel et méthodes).

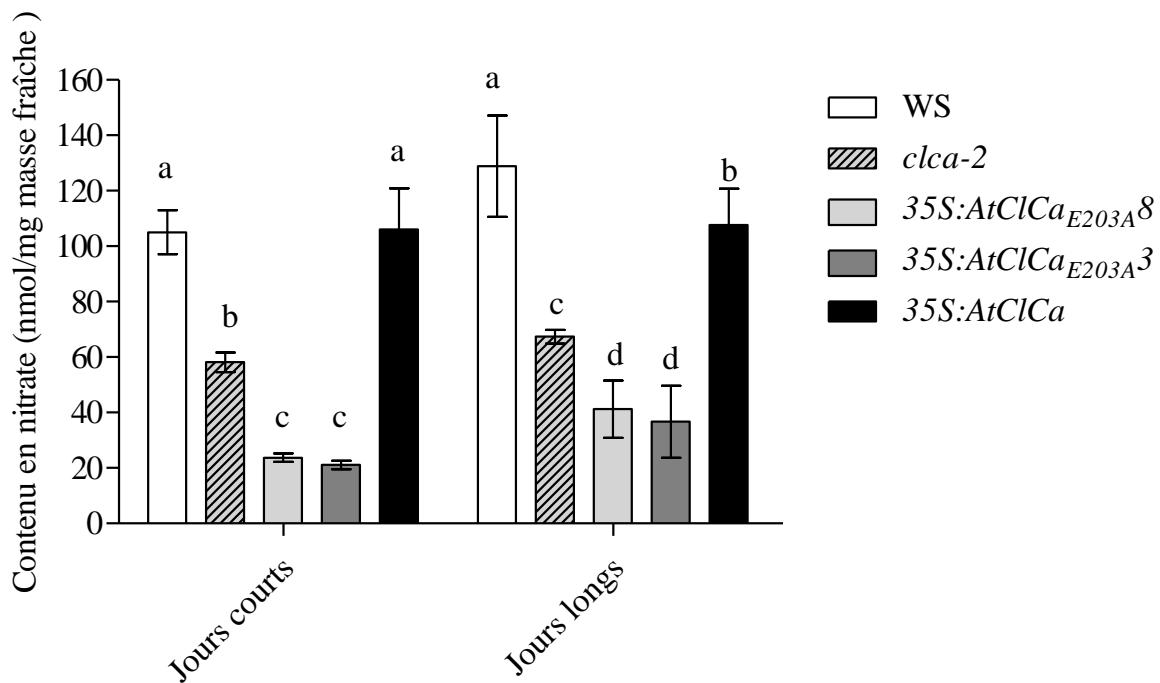


Figure 24: La déplétion en nitrate chez les plantes surexprimant *AtClCa<sub>E203A</sub>* n'est pas modifiée en jours longs. La teneur en nitrate a été déterminée chez WS, *clca-2* et *clca-2* sur exprimant *AtClCa<sub>E203A</sub>* ou *AtClCa* dans les feuilles de plantes âgées de cinq semaines en jours courts et trois en jours longs (stade huit feuilles). Les plantes ont été cultivées sur substrat Jiffy®. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  l'écart type calculés sur un réplicat biologique. L'analyse statistique est telle que décrite en figure 23.

Sur ce substrat, en jours courts, la quantité de nitrate dans les rosettes de plantes mutées pour le gating glutamate est diminuée de  $80 \pm 2\%$  par rapport au WS et  $64 \pm 3\%$  par rapport à *clca-2* (Figure 24). L'allongement de la durée du jour augmente la teneur en nitrate absolue d'environ 13-18 % chez *clca-2* et WS et 42% chez les plantes sur exprimant *AtClCa<sub>E203A</sub>*. Cela dit, la diminution de la teneur en nitrate observée chez les plantes *AtClCa<sub>E203A</sub>* comparée au WS semble inchangée : elle est de  $79 \pm 1,5\%$  en jours courts et de  $71 \pm 10\%$  en jours longs. En revanche, chez les plantes sur exprimant *AtClCa<sub>E203A</sub>*, la diminution de la teneur en nitrate par rapport à *clca-2* est de 39-45% en jours longs et 59-63% en jours courts. L'augmentation de la durée du jour ne permet donc pas de complémentation du phénotype observée chez *clca-2*, ni une réduction de l'aggravation du phénotype chez le surexpresso de la forme mutée de l'échangeur, cette dernière semble même aggravée par l'allongement de la durée du jour.

Lorsque l'on se place en jours continus (Figure 25), les mutants exprimant la forme mutée du gating glutamate montrent une diminution de  $73 \pm 2\%$  de la teneur en nitrate des rosettes comparé au WS contre  $76 \pm 3\%$  en jours courts dans cette expérience. Ceci confirme que la photopériode n'a pas d'influence sur le phénotype observé.

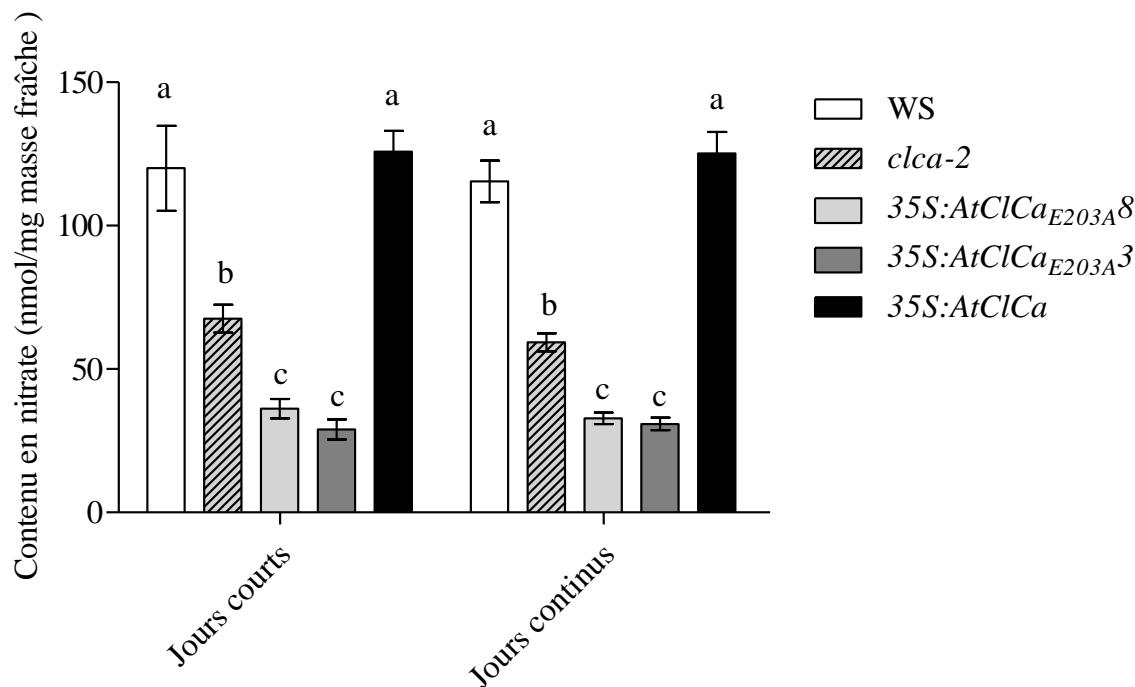


Figure 25: La déplétion en nitrate chez plantes surexprimant *AtClCa<sub>E203A</sub>* n'est pas modifiée en jours continus. La teneur en nitrate a été déterminée chez WS, *clca-2* et *clca-2* sur exprimant *AtClCa<sub>E203A</sub>* ou *AtClCa* dans les feuilles âgées de quatre semaines en jours courts et dix-huit jours en jours continus (stade huit feuilles). Les plantes ont été cultivées sur substrat Jiffy® en jours courts ou en jours continus (voir matériel et méthodes). Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  l'écart type calculés sur un réplicat biologique. L'analyse statistique est telle que décrite en figure 23.

## 2. La perturbation des mouvements stomatiques est-elle nitrate-dépendante ?

Les mesures stomatiques présentées précédemment ont été réalisées dans un tampon KCl. Afin de s'assurer du fait que la défaillance d'ouverture et fermeture stomatique est bien due à un défaut de transport du nitrate par la forme mutée pour le gating glutamate, les expériences ont été effectuées dans une solution présentant du nitrate de potassium (voir matériel et méthodes). Dans ces conditions, l'ouverture stomatique en réponse à la lumière est ralentie chez le mutant et aboutie à une ouverture partielle à l'issue de la cinétique. L'ouverture stomatique est diminuée de

26±4% chez le mutant surexprimant la forme mutée de AtClCa pour le gating glutamate par rapport au sauvage. Cette diminution est identique à celle observée chez le KO *c/ca-2* (Figure 26). L'aggravation du phénotype d'ouverture stomatique des plantes exprimant *AtClCa<sub>E203A</sub>* en présence de chlorure (voir Figure 9, paragraphe A) n'est plus observée quand la source anionique est le nitrate.

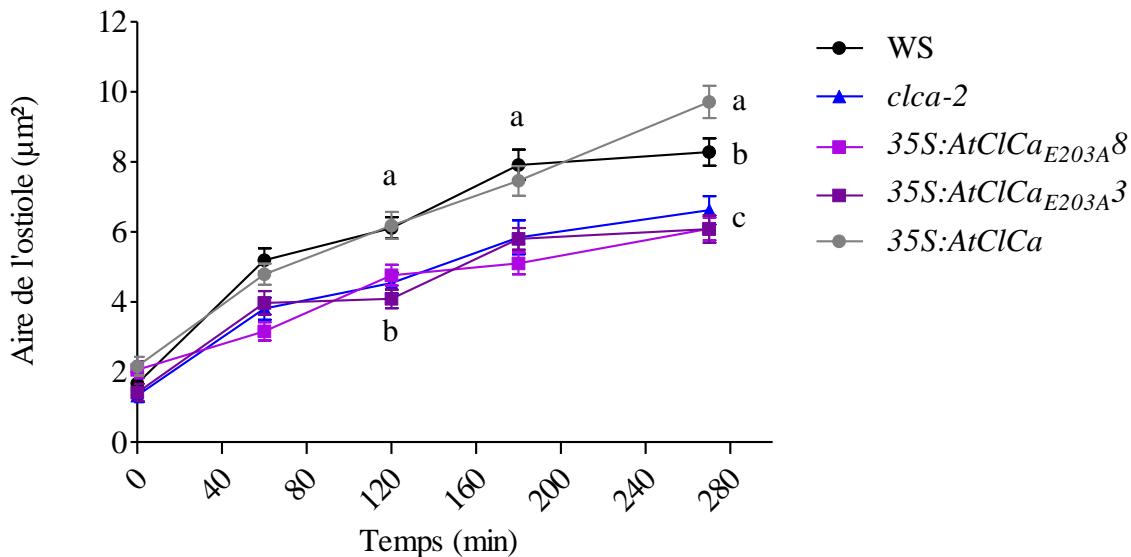


Figure 26: Les plantes surexprimant *AtClCa<sub>E203A</sub>* ne complémentent pas le défaut d'ouverture stomatique observé chez *c/ca-2* en présence de nitrate. Cinétique d'ouverture des stomates en réponse à la lumière en présence d'une solution contenant du nitrate. Les plantes ont été cultivées sur substrat Jiffy® en jours courts pendant cinq semaines puis des épidermes ont été obtenus par « collage » sur une lamelle (voir matériel et méthodes, paragraphe A). Les valeurs représentent la moyenne ± l'écart à la moyenne de deux réplicats biologiques. L'analyse statistique est telle que décrite en figure 23.

Une manipulation similaire à celle présentée en figure 8 du paragraphe A a été réalisée, mais en solution de nitrate de potassium, afin de tester la fermeture stomatique en réponse à l'ABA. En présence de nitrate, la fermeture stomatique en réponse à l'ABA est diminuée de 27±4% chez les plantes KO pour AtClCa par rapport au WS (Figure 27). Cependant, chez les plantes surexprimant *AtClCa<sub>E203A</sub>* aucune différence significative n'est observée avec le sauvage et avec le KO. Le phénotype observé est donc le même que celui mesuré en présence de chlorure dans la solution (Figure 8, paragraphe A).

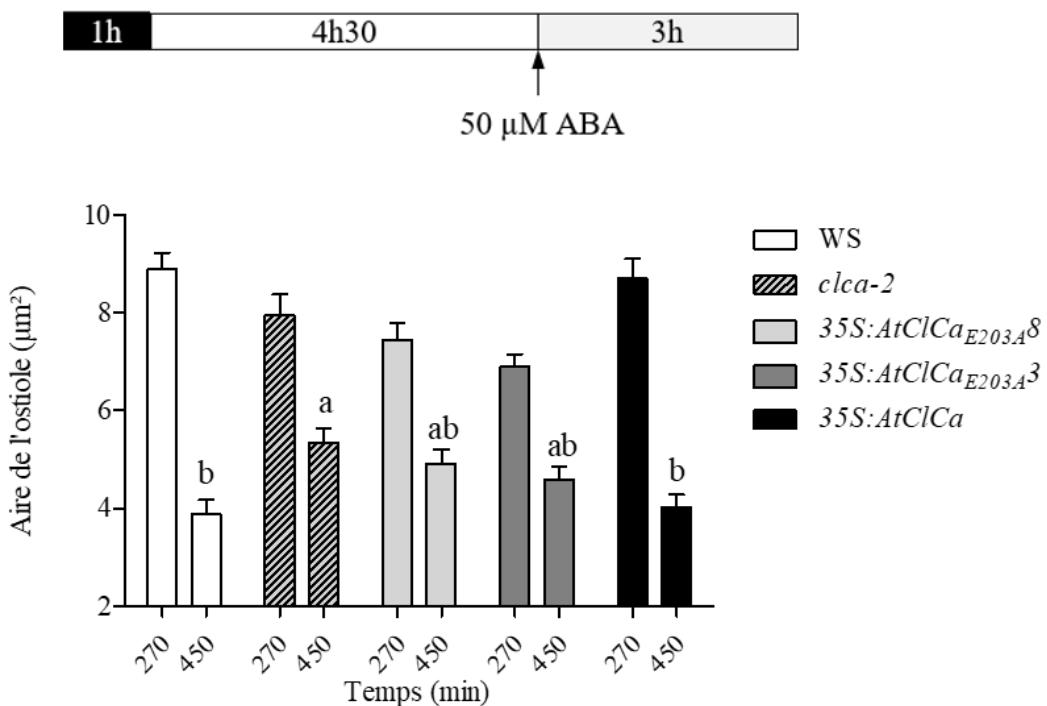


Figure 27: Les plantes surexprimant *AtClCa<sub>E203A</sub>* ne complémentent pas entièrement le défaut de fermeture stomatique observé chez *clca-2* en présence de nitrate. Fermeture stomatique induite par l'ABA (voir publication paragraphe A). Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  l'écart à la moyenne de deux réplicats biologiques. L'analyse statistique est telle que décrite en figure 23.

### 3. Impact du profil d'expression d'*AtClCa<sub>E203A</sub>* sur les phénotypes observés

Chez les plantes surexprimant *AtClCa<sub>E203A</sub>*, une diminution de la teneur en eau est mesurée par rapport au WS mais aussi par rapport à *clca-2* (Figure 7, paragraphe A). Cette diminution pourrait être due à une diminution du potentiel osmotique cellulaire dans les cellules du mésophylle, conduisant à une entrée d'eau diminuée. Dans les cellules de garde, cette baisse de potentiel osmotique conduit très probablement également à une diminution de l'influx d'eau. Cependant dans ce type cellulaire particulier, ceci à une conséquence supplémentaire qui est le défaut d'ouverture et peut être de fermeture stomatique. Afin de comprendre la participation respective de ces deux types cellulaires (mésophylle et cellule de garde) à la diminution de la teneur en eau des rosettes, l'expression de la forme mutée d'*AtClCa* doit être limitée à un de ces types cellulaires. Nous avons donc généré des plantes exprimant la forme mutée *AtClCa<sub>E203A</sub>* uniquement dans les cellules de garde grâce à l'utilisation d'un promoteur spécifique de ce type cellulaire (Rusconi *et al.*, 2013) (voir matériel et méthodes).

A l'issu des étapes de sélection, deux plantes homozygotes de lignées (7 et 4) distinctes exprimant AtClCa sous le contrôle du promoteur *pmyb60*, stomate spécifique, ont été sélectionnées pour quantification de l'expression du transgène ainsi que trois plantes des lignées 3,6 et 9 exprimant *AtClCa<sub>E203A</sub>*. Des données préliminaires de quantification de l'ARNm d'AtClCa montrent qu'aucune des lignées sélectionnées n'expriment le transgène à hauteur du WS (Figure 28). Or le niveau d'expression du gène *myb60* dans les parties aériennes est normalement similaire à celui de *AtClCa* quand les plantes sont cultivées sur sol pendant six semaines (données non montrées). La sélection d'autres lignées sera donc requise pour effectuer les analyses physiologiques.

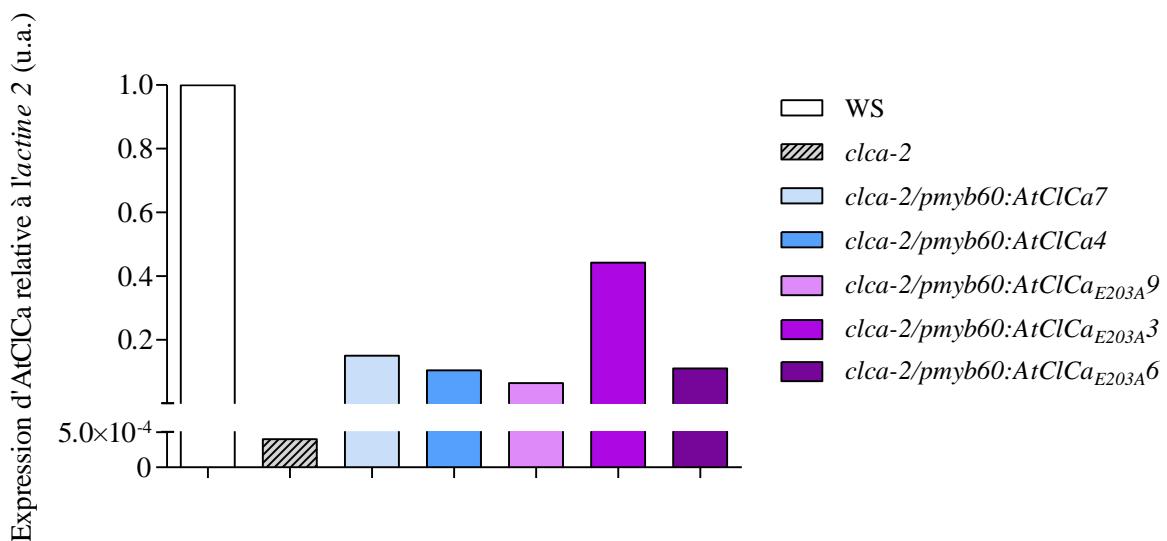


Figure 28: Niveau d'expression d'AtClCa chez les lignées transgéniques *clca-2/pmyb60:AtClCa* et *clca-2/pmyb60:AtClCa<sub>E203A</sub>*. Quantification de l'expression d'AtClCa chez WS et *clca-2* transformé avec *pmyb60:AtClCa<sub>E203A</sub>* ou *pmyb60:AtClCa* avec des amorces spécifiques de l'*Actine 2* ou AtClCa. Les données représentent une valeur obtenue par échantillonnage de cinq plantes cultivées sur substrat Jiffy® en jours courts pendant cinq semaines.

#### 4. La mutation E203A, une mutation gain de fonction ?

L'amplification du défaut de stockage de nitrate observé chez le surexpresso d'*AtClCa<sub>E203A</sub>*, comparé à *clca-2*, nous a amené à nous interroger sur la possible inhibition des autres ClCs par cette forme mutée. Afin d'obtenir plus d'information sur cela, les plantes sauvages WS ont été transformées avec la construction *35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* (voir matériel et méthodes).

L'idée est que si la teneur en nitrate est diminuée chez les plantes *WS/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* alors cela signifie que : (1) *AtClCa<sub>E203A</sub>* est potentiellement capable d'inhiber les autres ClCs impliqués dans

l'homéostasie nitrate et/ou, (2) que l'allèle E203A est dominant sur l'allèle sauvage et donc inhibe l'effet de l'allèle sauvage, par exemple via une stimulation de l'efflux au niveau de la vacuole. Si aucune modification de la teneur en nitrate n'est observée chez les plantes *WS/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* comparé au WS, cela pourrait signifier qu' *AtClCa<sub>E203A</sub>* n'exerce aucune inhibition sur les autres ClCs.

Le niveau d'expression du transgène a été mesuré par RT-qPCR (Figure 29) sur cinq plantes *WS/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* homozygotes de lignées indépendantes et trois plantes *WS/35S:AtClCa*. Seule la lignée *WS/35S:AtClCa2* surexprime le transgène à un niveau proche de celui observé chez le contrôle *clca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>3*. Par conséquent, d'autres lignées devront être testées pour les plantes *WS/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* afin d'effectuer les mesures physiologiques (dosage nitrate notamment).

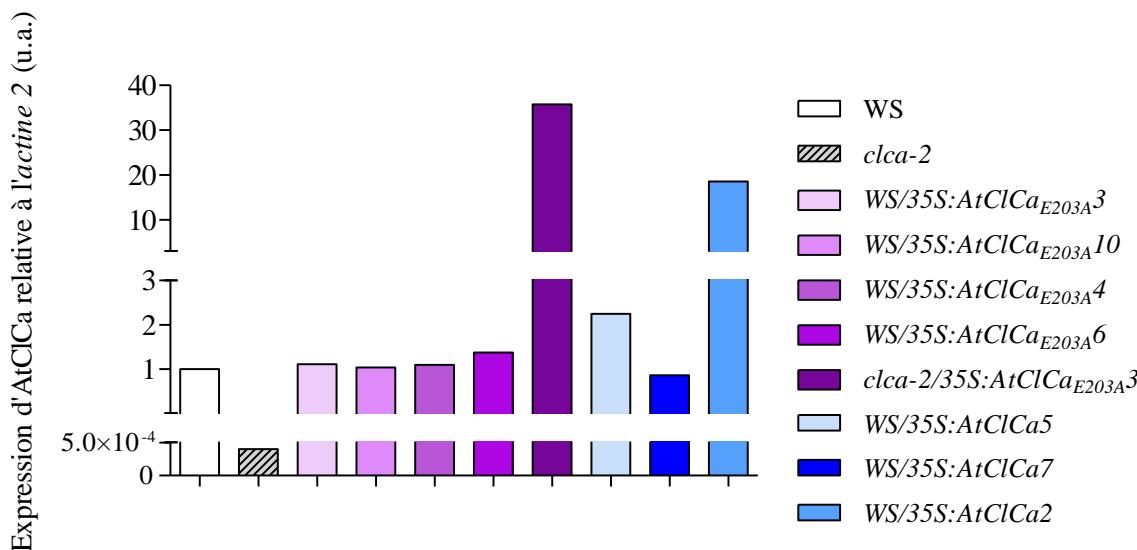


Figure 29: Niveau d'expression d'AtClCa chez les lignées transgéniques *WS/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* et *WS/35S:AtClCa*. Quantification de l'expression d'AtClCa chez WS et *clca-2* transformés avec *WS/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* ou *WS/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* avec des amorces spécifiques de l'*Actine 2* ou AtClCa selon le protocole décrit en figure 28.

C. Discussion complémentaire

Les conditions de culture des plantes, en terme de photopériode et de teneur en nitrate, ne permettent jamais d'observer une complémentation du phénotype chez le surexpresso d'*AtClCa<sub>E203A</sub>*. Cependant, plus la disponibilité en nitrate est faible plus la défaillance de stockage du nitrate semble être marquée (Figure 23). Ce phénotype peut s'expliquer par le mécanisme de transport de cette forme mutée de l'échangeur. La mutation engendre un découplage partiel de l'échangeur, ce qui signifie que l'entrée et la sortie du nitrate au niveau de la vacuole sont davantage impactées par le potentiel électrochimique de l'ion nitrate. Or, en condition limitante pour le nitrate, la différence de potentiel entre la vacuole et le cytoplasme va tendre en faveur d'un efflux de nitrate depuis la vacuole vers le cytoplasme. Ceci pourrait expliquer les différences observées d'accumulation de nitrate entre des conditions limitantes ou non entre les plantes sauvages et *clca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>*. Il serait intéressant d'étudier la même chose après culture en hydroponie afin d'observer une aggravation éventuelle de la biomasse et des contenus en acides aminés et protéines.

Le phénotype de croissance, sur des cultures en hydroponie, observé chez le mutant présentant un échangeur découplé peut être expliqué d'une part, par un métabolisme azoté modifié et, d'autre part, par une homéostasie hydrique déstabilisée. La teneur en eau chez ce mutant est en effet diminuée par rapport au sauvage et au *clca-2*. Ceci peut résulter d'une baisse de l'osmolarité dans les vacuoles des cellules du mésophylle, ce qui engendre un plus faible entrée d'eau dans ces cellules, mais aussi dans les cellules de garde des stomates conduisant à des mouvements stomatiques altérés et donc à une transpiration modifiée à ce niveau. Il est intéressant de noter qu'en condition de croissance *in vitro*, aucune différence significative de masse n'est observée entre les différents génotypes (données non montrées). Or, *in vitro*, les stomates sont constitutivement ouverts et ne répondent plus à l'ABA (Koshuchowa *et al.*, 1990; Blanke and Belcher, 1989) alors que dans nos expériences, en terre ou en hydroponie, en chambres de culture, les mouvements stomatiques sont régulés par les alternances jour/nuit. Afin de déterminer l'implication respective des stomates dans le phénotype « croissance », une construction permettant l'expression d'*AtClCa<sub>E203A</sub>* au niveau des cellules de garde uniquement a été utilisée

pour transformer *c/ca-2*. L'analyse de la teneur en eau et des mouvements stomatiques devrait apporter des précisions sur ce phénotype.

L'expression d'AtClCa est corrélée à la photopériode, la transcription est forte pendant la nuit et diminue fortement à la transition nuit/jour. Ceci est en accord avec l'hypothèse selon laquelle le stockage du nitrate dans la vacuole se ferait essentiellement la nuit, pendant la période d'inactivité de la NR (Von Der Fecht-Bartenbach *et al.*, 2010). En parallèle, il a été montré qu'une mutation des sous unités vha2vha3 de la V-ATPase vacuolaire engendre spécifiquement une diminution du stockage de nitrate et une augmentation de l'assimilation, comme ce que l'on observe chez les mutants exprimant *AtClCa<sub>E203A</sub>*. Ces phénotypes sont corrélés à une diminution de la croissance des plantes qui peut être complémentée par une augmentation de la durée du jour pendant la culture (Krebs *et al.*, 2010). En effet, comme mentionné dans l'introduction, l'assimilation du nitrate requiert notamment des molécules réduites, comme le NADPH, produites par la photosynthèse. Un plus faible stockage vacuolaire engendrerait donc une plus forte assimilation et donc une demande accrue pour ces produits photosynthétiques qui expliquerait la complémentation de la croissance par une culture en jours continus. Ces éléments suggèrent que la photopériode pourrait affecter le phénotype du mutant exprimant *AtClCa<sub>E203A</sub>*. Cependant aucune différence de contenu en nitrate n'a été observée entre le sauvage et les plantes *c/ca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* dans les conditions testées quelle que soit la durée du jour. De plus, aucune complémentation de la biomasse n'est observée chez ces plantes (données non montrées). Une explication possible à cela serait que chez ce mutant l'assimilation du nitrate étant déjà fortement stimulée, l'augmentation de la photopériode n'est pas à même d'apporter assez de composés réduits pour la stimuler davantage. Une autre explication possible serait que chez les plantes *c/ca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>*, non seulement le stockage de nitrate est fortement diminué (comme chez le mutant vha2vha3), mais l'efflux d'anions de la vacuole, imposé par l'ajout d' *AtClCa<sub>E203A</sub>*, ne fait qu'amplifier ce défaut éventuel en composés réduits.

Enfin, la réalisation des mesures d'ouverture stomatique en présence d'une solution contenant du nitrate à la place du chlorure conduit à une absence de complémentation du défaut d'ouverture de *c/ca-2* par la surexpression d'*AtClCa<sub>E203A</sub>* mais l'aggravation du phénotype par rapport à ce

dernier n'est plus observée comme en solution contenant du chlorure. Bien que cette expérience nécessite un réplicat supplémentaire, ces données préliminaires pourraient indiquer une modification de la sélectivité de l'échangeur découplé. Une telle modification ne serait pas étonnante puisque, quand *AtClCa<sub>E203A</sub>* est exprimé en ovocyte de Xénope, une augmentation de la sélectivité au chlorure est observée (Bergsdorf *et al.*, 2009). Cette hypothèse peut être testée par mesure d'électrophysiologie sur vacuole isolée ou encore par la réalisation de stress NaCl sur ces plantes, comme préalablement décrit sur AtClCg (Nguyen *et al.*, 2016). D'autre part, l'effet de la mutation du gating glutamate sur la sélectivité n'est pas improbable considérant sa localisation en site externe ainsi que son rôle dans le transport des anions au sein des ClCs (voir partie C1 de l'introduction).

# Chapitre II : Conséquences physiologiques d'une mutation du proton glutamate chez AtClCa

Le gating glutamate est particulièrement conservé au sein des ClCs échangeurs. Cependant un autre résidu présente cette caractéristique : il s'agit du glutamate 270 aussi appelé proton glutamate (introduction paragraphe C2). Une mutation du proton glutamate en résidu non protonable aboutit à une absence totale de transport de proton mais aussi d'anion chez AtClCa étudié en système hétérologue. De façon intéressante, la double mutation du proton et du gating glutamate permet une restauration du transport d'anion mais de façon totalement découpé des protons (Zdebik *et al.*, 2008; Bergsdorf *et al.*, 2009).

#### A. Obtention de plantes mutées pour le proton glutamate

##### 1. Analyse de l'expression de la forme mutée par RT-qPCR

Des plantes *clica-2* exprimant la forme mutée d'AtClCa pour le proton glutamate en alanine sous le contrôle du promoteur 35S ont été générées (voir matériel et méthodes). Après transformation des plantes *clica-2* KO pour AtClCa et sélection sur hygromycine B, 23 plantes résistantes ( $T_1$ ) ont été sélectionnées dont 12 présentant une ségrégation  $\frac{3}{4}$  résistants ;  $\frac{1}{4}$  sensibles. Parmi ces douze lignées, huit présentaient des plantes homozygotes, l'expression du transgène a donc été effectuée par RT-qPCR dans ces plantes (Figure 30).

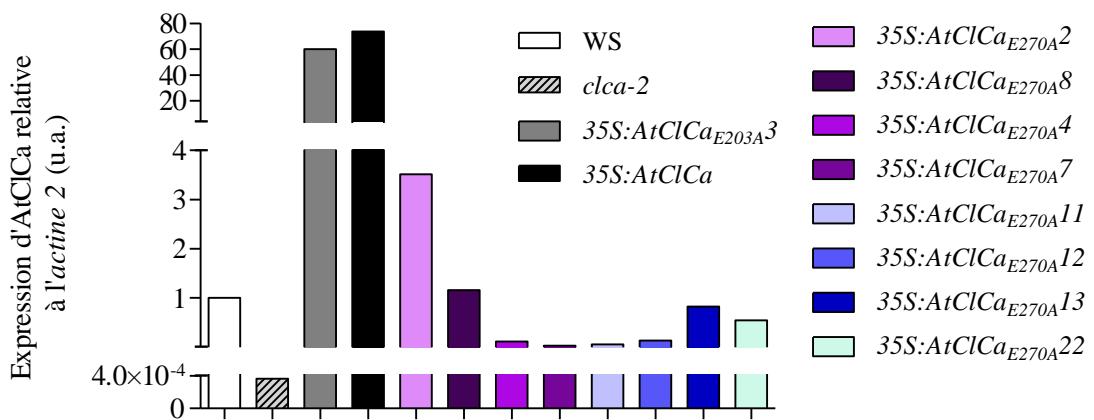


Figure 30: Niveau d'expression d'AtClCa chez les lignées transgéniques *clica-2/35S:AtClCa<sub>E270A</sub>*. Quantification de l'expression d'AtClCa chez WS et *clica-2* transformés avec *35S:AtClCa<sub>E270A</sub>*, *35S:AtClCa* ou *35S:AtClCa<sub>E203A</sub>* (lignées étudiées au chapitre précédent) avec des amorces spécifiques de l'*Actine 2* ou AtClCa selon le même protocole qu'en figure 28.

La lignée 2 exprime le transgène 3,5 fois plus que le sauvage et la lignée 8, qui elle exprime à hauteur du WS. Ces deux lignées ont donc été sélectionnées pour les analyses physiologiques. Il

est important de noter que cette expérience ainsi que les suivantes fournissent des résultats préliminaires, un seul réplicat biologique a été effectué à l'heure actuelle.

Afin de mieux comprendre les rôles respectifs des protons et gating glutamate lors du transport chez AtClCa, la génération de plantes présentant une double mutation E270A E203A a été débutée. Les plantes *c/ca-2* ont donc été transformées, comme décrit en matériel et méthodes, avec un vecteur contenant la forme mutée d'AtClCa. A la suite de la transformation, une sélection sur hygromycine B a permis d'obtenir 23 plantes résistantes ( $T_1$ ). Parmi ces plantes, 9 présentaient une ségrégation  $\frac{3}{4}$  résistants ;  $\frac{1}{4}$  sensibles. Ces lignées ont donc été utilisées pour rechercher les homozygotes. Sept lignées présentaient des plantes homozygotes. Cependant, à l'heure actuelle, les deux lignées dans lesquelles l'expression du transgène a été quantifiée ne présentent pas d'expression. Les cinq autres lignées seront analysées prochainement.

## 2. Impact de la mutation *AtClCa<sub>E270A</sub>* sur la production de matière fraîche par les plantes

Afin de quantifier l'impact physiologique de la mutation du proton glutamate, une première approche a été de déterminer la production de masse fraîche. Les mesures de biomasse ont été effectuées en hydroponie comme décrit dans le manuscrit (Chapitre IA) mais également après culture sur Jiffy®. En raison de l'hétérogénéité entre les plantes, seuls les résultats après culture sur Jiffy® sont exploitables et présentés en figure 31.

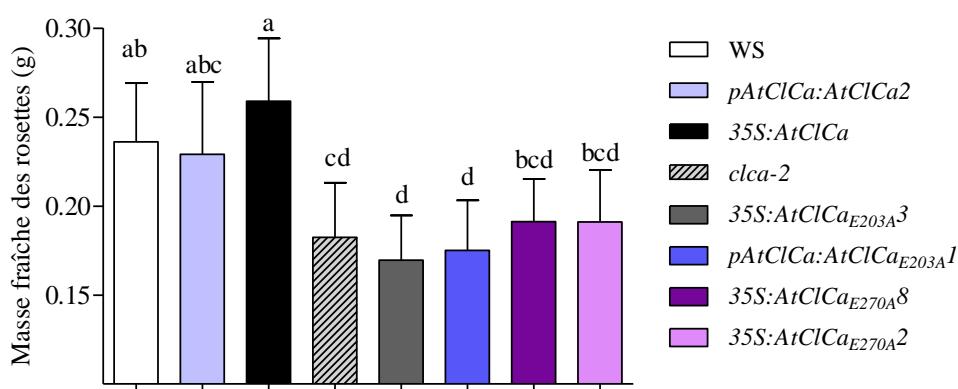


Figure 31: Masses fraîches des rosettes de plantes exprimant *AtClCa<sub>E270A</sub>* sous le contrôle du promoteur 35S. Les plantes ont été cultivées comme décrit en figure 28. Les données représentent la moyenne  $\pm$  l'écart type sur un réplicat biologique ( $n= 10$ ). Les différences significatives indiquées par des lettres sont issues d'une analyse de la variance suivie d'un test de Bonferroni ( $p<0.05$ ).

Conformément aux résultats précédents, *c/ca-2* montre une diminution de  $23\pm4\%$  de la masse fraîche par rapport au WS. Les plantes exprimant la forme mutée du gating glutamate sous le contrôle du promoteur endogène (lignée 1) ou du 35S (lignée 3) ont une biomasse diminuée respectivement de  $26\pm4\%$  et  $28\pm3\%$ . Bien qu'une tendance similaire soit observée, nous ne retrouvons pas exactement les mêmes résultats qu'en chapitre 1A, figure 3. Ceci peut s'expliquer par l'utilisation du substrat Jiffy® ou encore par une forte hétérogénéité au sein des plantes. Les plantes exprimant la forme mutée du proton glutamate présentent une masse fraîche diminuée de  $19\pm4\%$  par rapport au WS. En raison des limitations mentionnées ci-dessus et du manque de réplicat biologique additionnel une telle diminution n'est pas statistiquement significative par rapport au WS mais est apparemment similaire à celle obtenue pour *c/ca-2*.

### B. Conséquences de la mutation E270A sur l'homéostasie nitrate

La tendance observée en terme de biomasse pour les plantes exprimant AtClCa muté pour le proton glutamate suggère un possible dérèglement de l'homéostasie azotée au sein de ces plantes.

#### 1. Impact de la mutation E270A sur la teneur en nitrate après une culture *in vitro*

Afin de voir si l'homéostasie en nitrate est maintenue chez les plantes mutées pour le proton glutamate, une culture *in vitro* a été réalisée (voir matériel et méthodes). Le contenu en nitrate a été déterminé, dans les feuilles et racines, individuellement par dosage colorimétrique (Miranda *et al.*, 2001) (Figure 32).

Au niveau foliaire, en accord avec les résultats précédents, la teneur en nitrate chez les plantes exprimant la forme mutée de AtClCa pour le gating glutamate est diminuée de  $46\pm2\%$  chez le surexpresso et  $25\pm6\%$  chez la lignée l'exprimant sous le contrôle du promoteur endogène comparé au WS. Les plantes exprimant AtClCa muté pour le proton glutamate présentent une baisse maximale de  $32\pm5\%$  de la teneur en nitrate par rapport au sauvage. Au niveau racinaire, les plantes *c/ca-2/35S:AtClCa<sub>E270A</sub>* présentent une diminution entre  $35\pm8\%$  et  $40\pm9\%$  de la teneur en nitrate par rapport au WS. Bien qu'il semble que la mutation E270A dans AtClCa ne restaure pas le phénotype sauvage, ces résultats nécessitent d'être confirmés.

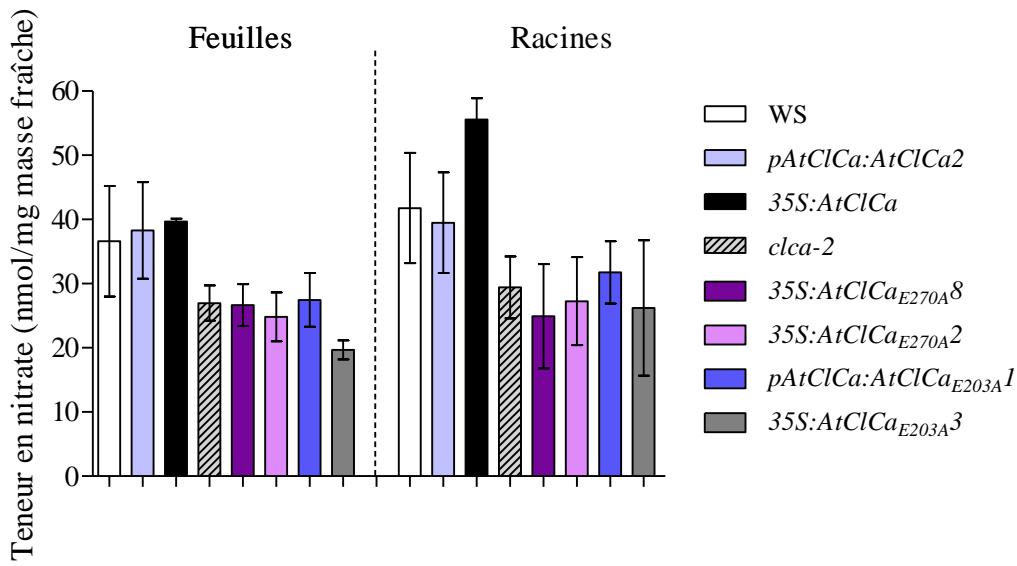


Figure 32: La mutation du proton glutamate ne complémente pas le phénotype sauvage pour les contenus en nitrate endogène après culture *in vitro* sur milieu  $\frac{1}{2}$  MS. La teneur en nitrate a été déterminée chez WS, *clca-2* et *clca-2* exprimant *AtClCa<sub>E203A</sub>* sous le contrôle du promoteur endogène ou 35S ainsi que sur les plantes surexprimant *AtClCa<sub>E270A</sub>* et *AtClCa*. Les conditions de culture sont celles décrites en figure 22. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  l'écart type calculés ( $n=4$ ) sur un réplicat biologique, à cause de la variabilité et du faible nombre de plante aucune différence n'est statistiquement significative.

## 2. Impact de la mutation du proton glutamate sur la teneur en nitrate après culture en hydroponie

Afin d'obtenir une évaluation plus précise de la teneur en nitrate selon les conditions de nutrition dans le milieu, une culture en hydroponie a été réalisée (comme décrite dans le manuscrit chapitre IA, figure 4). La teneur en nitrate a été déterminée dans les feuilles ainsi que dans les racines (Figure 33).

Au niveau foliaire, l'accumulation en nitrate chez le KO est diminuée de  $35 \pm 2\%$  et de  $61 \pm 1\%$  chez le surexpreisseur de la forme mutée du gating glutamate par rapport au sauvage, conformément aux résultats précédents. Chez le mutant pour le proton glutamate, la diminution observée est de  $38 \pm 2\%$  ou  $55 \pm 2\%$  pour les lignées 8 et 2 respectivement. La diminution de la teneur en nitrate par rapport au WS chez les deux lignées est statistiquement significative.

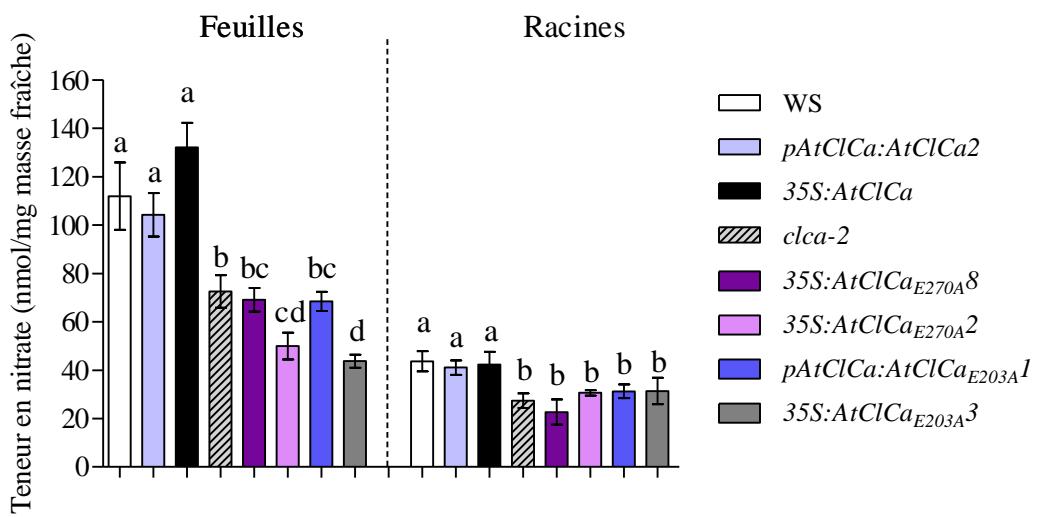


Figure 33: La mutation du proton glutamate engendre une diminution de la teneur en nitrate endogène après culture en hydroponie par rapport au WS et par rapport au KO pour la lignée 2. La teneur en nitrate a été déterminée chez WS, *clca-2* et *clca-2* exprimant *AtClCa<sub>E203A</sub>* sous le contrôle du promoteur endogène ou 35S ainsi que sur les plantes sur-exprimant *AtClCa<sub>E270A</sub>* et *AtClCa*. Les plantes ont été cultivées en hydroponie avec 4,25 mM de nitrate. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  l'écart type calculés sur un réplicat biologique (n=5). Les différences significatives indiquées par des lettres sont issues d'une analyse de la variance suivie d'un test de Bonferroni (p<0.01 \*\*).

Aucune différence significative n'est observée avec *clca-2* au niveau foliaire, à l'exception de la lignée 2 et de la lignée *clca-2/35S:AtClCa<sub>E203A</sub>3* témoin. Au niveau racinaire, le mutant pour le proton glutamate montre une diminution statistiquement significative de 30 $\pm$ 1% (lignée 2) et 48 $\pm$ 5% (lignée 8) de la teneur en nitrate comparé au WS mais aucune différence par rapport à *clca-2*. Donc, bien que ces résultats doivent encore être confirmés, la lignée *clca-2/35S:AtClCa<sub>E270A</sub>* qui exprime le plus fortement le transgène, semble accumuler encore moins de nitrate dans ses parties aériennes que le mutant KO pour *AtClCa*.

### C. Conséquence de la mutation E270A sur l'homéostasie hydrique

Le nitrate étant un osmoticum majeur, la diminution de biomasse observée précédemment peut être due, non seulement à une perturbation du métabolisme azoté, mais aussi à une perturbation de l'homéostasie hydrique. C'est pourquoi, une quantification de la teneur en eau des mutants pour le proton glutamate a été effectuée selon le protocole décrit dans le manuscrit (Chapitre IA). La diminution de contenu en eau observée chez *clca-2* et les mutants pour le gating glutamate

sont conformes aux résultats présentés précédemment (Figure 34). Le mutant pour le proton glutamate présente une teneur en eau significativement diminuée ( $0,6 \pm 0,04\%$  pour la lignée 2) par rapport au WS. Aucune différence significative n'est observée avec *caca-2*, mais on observe une teneur intermédiaire entre celle du *caca-2* et celle de la lignée 3, surexpresso de la forme mutée du gating glutamate, en corrélation avec ce qui est observé pour la teneur en nitrate foliaire.

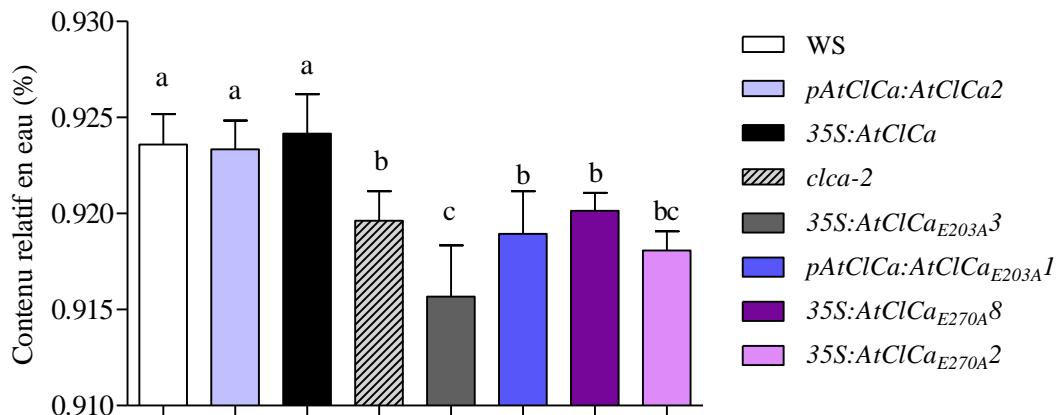


Figure 34: L'expression d'AtClCa muté pour le proton glutamate ne complémente pas le phénotype de *caca-2* pour le contenu en eau. Contenu relatif en eau de plantes cultivées comme décrit en figure 28. Le contenu en eau est calculé sur dix plantes comme suit : (masse fraîche-masse sèche) /masse fraîche et les données représentent la moyenne ainsi que l'écart type sur un réplicat biologique. L'analyse statistique est identique à celle de la figure 31.

**D. Discussion des résultats**

Chez les plantes *c/ca-2* exprimant la forme mutée du proton glutamate, aucune complémentation de la biomasse n'est observée par rapport au sauvage. Celle-ci est identique à celle observée chez le mutant KO *c/ca-2* ainsi qu'à celle observée chez les mutants pour le gating glutamate dans ces conditions. Cependant, les mesures de biomasse sont à considérer avec prudence car, en raison d'une importante hétérogénéité entre les plantes et des conditions de culture, ils ne sont pas strictement identiques à ceux présentés en chapitre 1A figure 3. Les mesures de biomasse doivent être répétées en hydroponie sur un nombre de plantes suffisant. Cependant, la tendance observée est en accord avec les résultats obtenus par Bergsdorf et collaborateurs (2009) par électrophysiologie puisque l'expression d'*AtClCa<sub>E270A</sub>* en ovocyte de Xénope n'induit aucun courant tout comme chez un KO pour AtClCa.

La mesure du contenu en eau de ces mêmes plantes montre une diminution chez les plantes exprimant la forme mutée d'AtClCa pour le proton glutamate. Celle-ci est semblable à celle observée chez *c/ca-2*, bien que la lignée 2 montre une très légère accentuation du phénotype.

Le dosage du nitrate chez les plantes exprimant *AtClCa<sub>E270A</sub>* a été effectué à la fois *in vitro*, en condition de fortes teneurs en nitrate (19 mM), et en hydroponie (4,25 mM). La croissance en hydroponie permet d'amplifier les différences entre racine et feuille car le stade de développement des plantes est plus avancé et les racines sont en solution à l'obscurité. La culture en hydroponie permet également de limiter la variabilité au sein d'un même génotype puisque l'effet « boîte » présent *in vitro* n'est pas observé en hydroponie et qu'un nombre plus important de plante peut être analysé. Grâce à ses avantages, la teneur en nitrate des mutants pour le proton glutamate a été déterminée dans les feuilles et les racines avec une précision permettant de voir que la lignée 2 présente une accumulation de nitrate diminuée par rapport au WS mais également par rapport à *c/ca-2*. Bien que ce résultat soit à prendre avec précaution, car issu d'un unique réplica biologique, cette amplification des phénotypes chez le mutant proton glutamate de la lignée 2 est surprenante. La teneur en eau dans les plantes de la lignée 2 est également inférieure à celle de la lignée 8 ainsi qu'à celle mesurée chez *c/ca-2*. Bien que cette différence soit faible, elle est en accord avec la teneur en nitrate mesurée. Nous pouvons donc supposer que la faible teneur en nitrate

chez cette lignée est à l'origine d'une plus faible osmolarité et donc d'une teneur en eau diminuée. La question est de savoir si ces diminutions de teneur en nitrate et eau se répercutent sur la biomasse produite par ces plantes. Une mesure de biomasse en hydroponie sur un plus grand nombre de plantes est requise pour répondre à cette question. Pourquoi une telle amplification des phénotypes chez cette lignée 2 et non chez la lignée 8 ? L'expression du transgène chez ce mutant de la lignée 2 est 3 fois supérieure à l'expression de *AtC/C* chez le sauvage et du transgène dans la lignée 8. Cette observation amène donc à se demander si le courant est bien inexistant chez ce mutant ou si un courant serait mesurable et favoriserait l'efflux de nitrate de la vacuole comme chez le mutant pour le gating glutamate. Des mesures d'électrophysiologie sont nécessaires pour explorer cette possibilité. Chez ce mutant pour le proton glutamate, l'homéostasie nitrate et hydrique semblent donc être perturbées et conduisent à une baisse de biomasse. Cependant, tous ces résultats sont bien entendus préliminaires et nécessitent d'être confirmés. Une lignée surexprimant fortement le transgène devrait aussi être sélectionnée afin d'éliminer un potentiel effet de l'insertion du transgène chez le mutant proton glutamate de la lignée 2.

# Matériel et méthodes

#### A. Génération des différents mutants

Toutes les constructions ont été réalisées à l'aide du vecteur pH2GW7.0 (Karimi *et al.*, 2002) (Figure 35). Par digestion enzymatique, à l'aide des enzymes de restriction *Sma* I et *Spe* I, le promoteur 35S a été remplacé soit par le promoteur pAtClCa (voir manuscrit, matériel et méthodes) soit par le promoteur *pmyb60*, dont l'activation est spécifique des cellules de garde (Cominelli *et al.*, 2005; Rusconi *et al.*, 2013). L'ADN génomique a été extrait chez les plantes sauvages (accession Wassilewskija) grâce au kit DNeasy Plant (Qiagen). Sur cet ADN, la région amont de l'ATG de *myb60*, d'une longueur de 1,3 kb, a été amplifiée par PCR à l'aide d'amorces spécifiques (5'-NNNNNCCGGGCACAAGGACACAAGGACA-3' (sens) et 5'-NNNNNACTAGTCCTAGATCTCTG-3' (antisens)) additionnées des sites de restriction *Spe* I et *Sma* I. L'hybridation a été effectuée à 65°C afin d'obtenir une spécificité optimale. Ce fragment PCR ainsi que le plasmide pH2GW7.0 ont ensuite été digérés avec les enzymes de restriction mentionnées afin de générer des extrémités cohésives compatibles avec la ligation. La ligation permet donc l'insertion de ce promoteur en amont de l'ADNc d'*AtClCa* ou d'*AtClCa<sub>E203A</sub>*. Les vecteurs finaux contenant *pmyb60:AtClCa* et *pmy60:AtClCa<sub>E203A</sub>* ont été introduits en agrobactéries (souche C58 thermo-compétentes) et les plantes *c/ca-2* ont été transformées par « floral dipping » (Clough and Bent, 1998). Les graines résultantes ont été semées sur hygromycine B (20 µg/mL) pour sélection, les lignées présentant une ségrégation 3 :1 ont été sélectionnées et plusieurs lignées T3 homozygotes ont été choisies pour analyse du niveau d'expression du transgène (Chapitre IB3).

Afin de générer les vecteurs contenant *AtClCa<sub>E270A</sub>* sous le contrôle du promoteur 35S, une mutagenèse a été effectuée sur le pDONR207 (plateau technique biologie moléculaire I2BC). Une réaction de BP entre le vecteur pH2GW7.0 (35S:*AtClCa*) et le pDONR207 vide (ccdB) a permis l'obtention du pH2GW7.0 vide (35S:ccdB) contenant les bordures AttR. Ce vecteur est ensuite combiné au pDONR207 contenant *AtClCa<sub>E270A</sub>* par réaction LR afin d'obtenir le vecteur pH2GW7.0 (35S:*AtClCa<sub>E270A</sub>*). Ce vecteur est introduit en agrobactérie (souche C58) et intégré chez les plantes *c/ca-2*. La sélection a été effectuée comme mentionné précédemment.

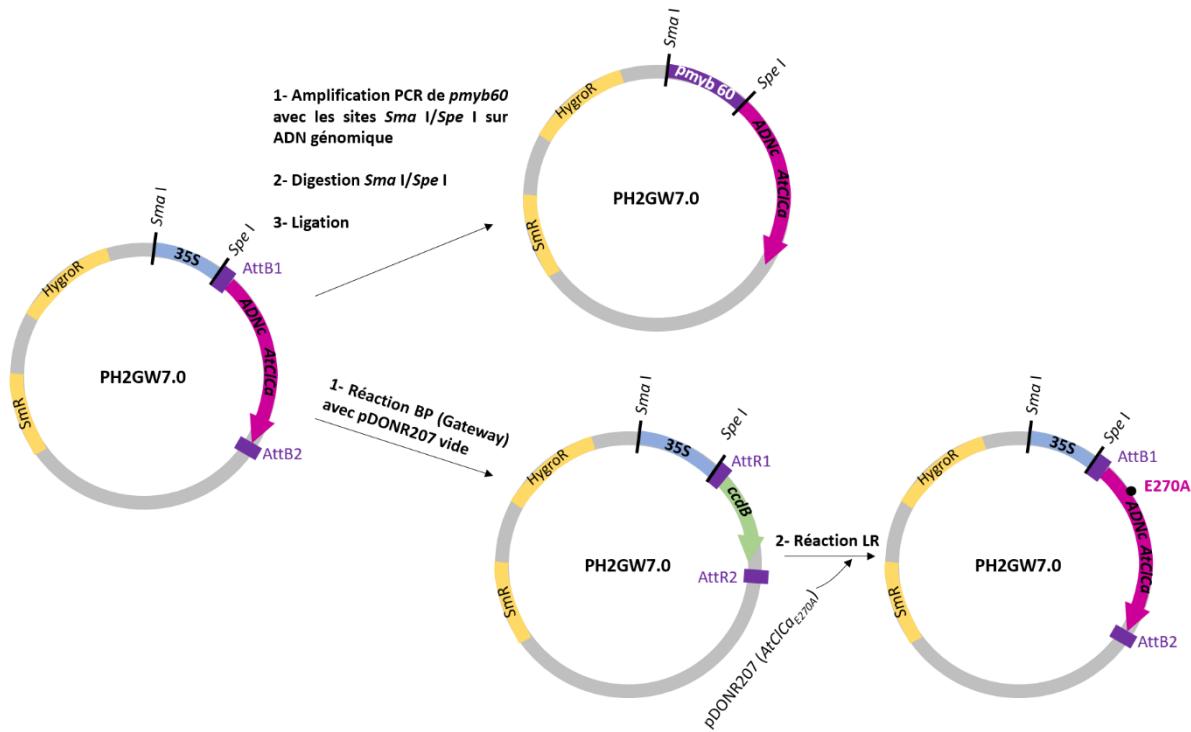


Figure 35: Modification du vecteur pH2GW7.0 afin d'introduire le promoteur stomate : *pmyb60*

## B. Conditions de culture des plantes

### 1. Culture in vitro

Deux types de milieu de culture *in vitro* ont été utilisés, d'une part le milieu ½ MS (Murashige et Skoog) et d'autre part le milieu Hoagland modifié.

Pour les expériences en milieu ½ MS, 2,15g/L de MS salt mixture (Sigma-Aldrich) sont dissous dans de l'eau milliQ puis le pH est ajusté entre 5,8 et 6 avec de l'hydroxyde de potassium. A ce milieu, 0,7% de phytoagar est ajouté (Duchefa Biochemie<sup>®</sup>) puis celui-ci est autoclavé. Le milieu est alors coulé à raison de 50 mL par boîte de pétri carré. En parallèle, les graines sont stérilisées sous cloche pendant 3h en présence de dichlore. Les graines sont semées sur le milieu et les boîtes sont placées à 4°C pendant quatre jours pour stratification puis transférées pour 21 jours à la lumière dans une enceinte à jours longs (8h obscurité 16h lumière) à 21°C.

Le milieu utilisé afin de réaliser des expériences où la concentration en nitrate est modifiée est le milieu Hoagland (tableau ci-dessous). Afin de maintenir constante la teneur en calcium à 1,5 mM, du CaCl<sub>2</sub> est ajouté en teneur constante. Afin de modifier la teneur en nitrate, le volume de KNO<sub>3</sub> ajouté est modifié. Le défaut de ce protocole est qu'il engendre une augmentation concomitante

de la teneur en potassium dans le milieu, c'est pourquoi il serait nécessaire d'exclure son implication en reproduisant l'expérience avec du  $K_2SO_4$ . La suite du protocole à partir de l'autoclavage est identique à celle décrite pour le milieu MS.

Concentration en nitrate standard		Concentration en nitrate ajustée	
Macronutriments	Concentration finale	Macronutriments	Concentration finale
$Ca(NO_3)_2$	1,5mM	$(CaCl)_2$	1,5mM
$KNO_3$	1,25 mM	$KNO_3$	0,75 mM ou 1,5 mM ou 3mM
$MgSO_4$	0,75mM	$MgSO_4$	0,75mM
$KH_2PO_4$	0,28mM	$KH_2PO_4$	0,28mM
<b>Micronutriments</b>		<b>Micronutriments</b>	
KCl	50 $\mu$ M	KCl	50 $\mu$ M
$H_3BO_3$	25 $\mu$ M	$H_3BO_3$	25 $\mu$ M
$ZnSO_4$	1 $\mu$ M	$ZnSO_4$	1 $\mu$ M
$CuSO_4$	0,5 $\mu$ M	$CuSO_4$	0,5 $\mu$ M
$Na_2MoO_4$	0,1 $\mu$ M	$Na_2MoO_4$	0,1 $\mu$ M
$MnSO_4$	5 $\mu$ M	$MnSO_4$	5 $\mu$ M
Fe-HBED	20 $\mu$ M	Fe-HBED	20 $\mu$ M
MES-KOH pH 5,7	2 mM	MES-KOH pH 5,7	2 mM

Tableau 2 : Milieu Hoagland modifié adapté pour modifier la teneur en nitrate

## 2. Culture en serre

Afin de comprendre les conséquences d'une modification de la photopériode sur les phénotypes, trois types de conditions de culture ont été utilisés. Les graines ont été semées sur sol stérile (Jiffy<sup>®</sup>) puis stratifiées à 4°C pendant quatre jours. A l'issu de cela, les pots sont transférés dans des logettes à 22°C, 60% d'humidité relative et une intensité lumineuse de 75  $\mu$ mol de photon  $m^{-2} s^{-1}$ . Selon les expériences, la photopériode peut être de 8h de lumière pour 16h d'obscurité (jours courts) ou 16h de lumière pour 8h d'obscurité (jours longs) ou finalement de 24h de lumière (jours continus). Dans le cas d'une comparaison jours courts et jours longs, les plantes sont cultivées cinq semaines en jours courts et trois semaines en jours longs afin d'être analysées au même stade de développement (huit feuilles). Si l'on compare jours courts et jours continus, la culture est de cinq semaines en jours courts pour dix-huit jours en jours continus.

## Discussion générale

Le premier chapitre a permis l'étude des conséquences physiologiques d'une mutation du résidu glutamate 203, le gating glutamate, chez AtClCa. Une mutation en résidu non protonable converti l'échangeur en canal et engendre une perturbation de la physiologie de la plante, notamment concernant son statut azoté et hydrique. La surexpression de cette forme découpée dans un fond mutant *c/ca-2* engendre même dans la plupart des expériences réalisées une aggravation du phénotype par rapport au KO *c/ca-2*. Chez les plantes surexprimant la forme mutée d'AtClCa l'équilibre stockage/remobilisation du nitrate est déplacé en faveur d'un efflux vers le cytoplasme. Ceci provoque une plus forte assimilation du nitrate et donc des teneurs en acides aminés et protéines accrues. Un tel phénotype est particulièrement intéressant car il confère à la plante une plus forte valeur nutritionnelle. Cependant la décroissance du stockage de nitrate vacuolaire provoque une décroissance de l'osmolarité et donc de la teneur en eau. Ce phénotype est très probablement la cause majoritaire de la décroissance de la biomasse mesurée dans ces plantes. Il serait donc particulièrement intéressant de générer des plantes présentant cet accroissement de la valeur nutritionnelle mais en limitant les aspects délétères aboutissant à une plus faible biomasse. Une première approche serait d'exprimer *AtClCa<sub>E203A</sub>* spécifiquement au niveau racinaire. Han et collaborateurs (2016) ont démontré qu'un plus faible stockage de nitrate vacuolaire au niveau de la racine favorise sa translocation vers les parties aériennes et engendre ainsi une plus forte assimilation et un NUE accru (rendement en graine et masse sèche). Dans la mesure où le contenu en nitrate est très fortement diminué chez les plantes surexprimant *AtClCa<sub>E203A</sub>* il est légitime de supposer que le NUE de ces plantes sera augmenté. De plus, une expression restreinte aux racines permettrait de diminuer voire supprimer l'effet délétère sur le contenu en eau, et donc la biomasse, lié à l'expression dans les cellules du mésophylle et les cellules de garde. En revanche, s'il l'on considère que l'effet néfaste sur la biomasse est majoritairement la conséquence d'une surexpression dans les cellules de garde, alors une autre approche envisageable serait de surexprimer *AtClCa<sub>E203A</sub>* dans les cellules du mésophylle. Cependant il y a fort à parier que la teneur en eau et la biomasse ne seraient que très légèrement accrues par rapport aux plantes exprimant *AtClCa<sub>E203A</sub>* de façon ubiquitaire car la décroissance de

la teneur en eau est probablement la conséquence d'une baisse d'osmolarité dans les cellules du mésophylle plus que d'une transpiration accrue au niveau des stomates.

En système hétérologue comme en système homologue, dans la présente étude, une mutation du gating glutamate engendre un découplage chez AtClCa. Ce résidu est impliqué à la fois dans le transport des anions mais également dans celui des protons puisque sa protonation engendre sa rotation hors de la voie de conduction ionique. Son existence du coté vacuolaire suppose un résidu remplissant un rôle symétrique du côté cytoplasmique. Le résidu glutamate 270, proton glutamate, est localisé à l'interface de la solution cytoplasmique et de la voie de conduction et sa mutation abolit le transport de proton et de chlorure en système hétérologue (Zdebik *et al.*, 2008; Bergsdorf *et al.*, 2009). De façon intéressante, la mutation additionnelle du gating glutamate dans ce système restaure la conductance au chlorure. Cette observation suggère un lien fonctionnel entre les glutamates 203 et 270 lors du transport chez AtClCa. C'est pourquoi le chapitre II décrit la génération de plantes présentant une mutation du proton glutamate afin d'étudier ses conséquences *in planta*. La mutation de ce résidu, au même titre que celle du gating glutamate engendre des perturbations de l'homéostasie hydrique et nitrate. Une surexpression d'*AtClCa<sub>E270A</sub>* (lignée 2) engendre même une tendance à l'aggravation des phénotypes liés au nitrate et à l'eau par rapport à *c/ca-2*. Ce résultat est en contradiction avec les mesures d'électrophysiologie effectuées par Bergsdorf et collaborateurs (2009) sur système hétérologue puisqu'une absence de courant était observée. Des mesures d'électrophysiologie doivent donc être effectuées pour comprendre l'origine de ce phénotype.

Afin de mieux comprendre les relations entre ces deux résidus, la génération de plantes présentant la double mutation E270AE203A est en cours. Cela dit nous rencontrons des difficultés à obtenir des plantes homozygotes exprimant le transgène. Comme mentionné dans les résultats, la sélection de lignées doit être poursuivie puisque les deux lignées homozygotes testées n'expriment pas le transgène.

Comme présenté dans l'introduction, la tyrosine interne est proposée comme un gate interne impliqué dans le couplage chez les ClCs (Walden *et al.*, 2007). Le couplage pourrait donc reposer, non pas sur la coopération de deux résidus, mais de trois résidus. La génération de plantes mutées

pour cette tyrosine ainsi que le triple mutant pour les résidus glutamates 203, 270 et Tyr 563 pourrait apporter davantage d'informations sur les implications respectives de ces résidus au couplage chez AtClCa.

La recherche des homologues d'AtClCa, basée sur la comparaison des séquences protéiques, a permis l'observation de l'état de conservation des trois résidus mentionnés ci-dessus. De façon intéressante, chez les espèces analysées incluant spermatophytes, algues, lycophytes et bryophytes, ces trois résidus sont conservés chez les homologues les plus proches de AtClCa. Cependant, le lien avec la conservation de la fonction d'échange du transporteur n'est pas aisé. Très peu d'homologue sont caractérisés à l'heure actuelle, seul celui du soja (*Glycine max*) est caractérisé comme un transporteur à chlorure dont l'activité est dépendante du pH (Wong *et al.*, 2013). Chez *Arabidopsis thaliana*, tous les ClCs vacuolaires présentent un proton et un gating glutamate, à l'exception d'AtClCg. Cependant, comme mentionné en introduction, les études d'électrophysiologie sont particulièrement difficiles sur ce transporteur et on ne sait pas à l'heure actuelle s'il s'agit d'un canal ou d'un échangeur. Si l'on élargit aux mammifères, notamment l'Homme, le gating glutamate est remplacé par une valine dans les canaux HsClCKa et b uniquement et le proton glutamate n'est conservé dans aucun des canaux (HsClCKa, HsClCKb, HsClC1 et HsClC2) à la différence de la tyrosine qui elle est conservée chez tous les ClCs humains. S'il l'on en croit ces observations, la présence du proton glutamate serait absolument requise au mécanisme d'échange. Le lien entre le mécanisme d'échange et la présence du gating glutamate n'est pas si simple puisque les canaux HsClC1 et 2 présentent un gating glutamate. La corrélation entre la conservation de ces résidus et le mécanisme de transport nécessite la caractérisation fonctionnelle des homologues d'AtClCa.

Le mécanisme d'échange proton/nitrate chez AtClCa nécessite l'existence d'un gradient de proton en grande partie généré par les V-ATPases. Des mutations nulles des sous unités VHA2 et VHA3 engendrent une baisse de 75% de la teneur en nitrate et une stimulation de l'assimilation (Krebs *et al.*, 2010). Cependant, si les V-ATPases sont requises au fonctionnement d'AtClCa, la réciproque est probablement vraie. Des études effectuées chez les mammifères, notamment sur ClC-5 et ClC-3, montrent que ces échangeurs sont requis à l'acidification des endosomes. La conversion de ClC-

5 en canal par mutation du gating glutamate engendre une plus faible activité des V-ATPases et une diminution de l'acidification des endosomes. Ceci suggère donc que le mécanisme d'échange est requis pour l'activation des V-ATPases. Le fonctionnement continu de ces pompes nécessite la présence, au niveau vacuolaire, de charges négatives compensant les charges positives issues des protons transportés. Dans le cas de notre mutant E203A, la plus faible accumulation de nitrate vacuolaire pourrait aboutir à un défaut partiel d'activation des V-ATPases. Une telle hypothèse est appuyée par des données préliminaires obtenues en collaboration avec Melanie Krebs (Université de Heidelberg, Allemagne) par mesure du pH vacuolaire de cellules gardes chez les surexpresso<sup>r</sup> d'*AtClCa<sub>E203A</sub>*. Ces données ont été obtenues sur des épidermes de feuille pelés et mis en présence d'Oregon green (comme décrit dans (Andrés *et al.*, 2014)). Cette molécule permet la mesure du pH vacuolaire par une approche ratiométrique : le pH est déterminé grâce au quotient des intensités d'émission mesurées après excitation à 458 nm et 488 nm (point isobistique). Une seule expérience a été effectuée mais elle montre une alcalinisation de la vacuole chez le mutant pour le gating glutamate ainsi que chez *c/ca-2*. Ceci confirme les données obtenues chez CIC-5 qui suggèrent l'importance du mécanisme d'échange pour l'acidification des compartiments internes. Bien que très préliminaires, ces résultats soutiennent l'importance d'AtClCa dans la régulation du pH vacuolaire *via* un probable effet sur les V-ATPases vacuolaires. De récentes données ont été obtenues par Elsa Demes, Alexis De Angeli et collaborateurs. Ils ont utilisé un bio senseur cytoplasmique codé génétiquement, et sensible à la fois au nitrate et au pH, pour mesurer le pH cytosolique chez *c/ca-3* (KO pour AtClCa chez l'accession Columbia-0). Dans les cellules de garde, ils perfusent différentes solutions en faisant varier la concentration en nitrate et mesure l'évolution du pH dans le cytoplasme chez le sauvage (Col-0) et chez *c/ca-3*. En réponse à la variation de teneur en nitrate, le pH cytosolique est modifié chez le sauvage. En revanche chez le KO pour AtClCa aucune modification du pH n'est mesurée. Ceci montre que, non seulement AtClCa semble être important pour le contrôle du pH vacuolaire, mais aussi pour l'ajustement du pH cytosolique en réponse aux variations de teneur en nitrate. Il serait donc intéressant de croiser les plantes surexprimant *AtClCa<sub>E203A</sub>* avec les lignées exprimant le bio senseur à pH cytoplasmique afin d'avoir une mesure du pH à plus forte résolution. La teneur en nitrate chez ce mutant étant plus faible

encore que chez *caca-2*, on peut s'attendre à un effet important sur le pH si la dérégulation des V-ATPases est induite par un défaut de nitrate. Enfin, la génération de plantes exprimant un biosenseur permettant la mesure du pH en conditions acides serait un excellent outil pour mesurer le pH vacuolaire. Un senseur (apo-pHusion) à notamment été utilisé pour la quantification du pH dans l'apoplaste, un adressage de ce dernier à la vacuole pourrait donc être envisagé (Gjetting *et al.*, 2012).

## Références

- Abeyrathne, P.D., Chami, M. and Stahlberg, H. (2016) Biochemical and biophysical approaches to study the structure and function of the chloride channel (CIC) family of proteins. *Biochimie*, 128–129, 154–162.
- Abeyrathne, P.D. and Grigorieff, N. (2017) Expression, purification, and contaminant detection for structural studies of Ralstonia metallidurance CIC protein rm1. *PLoS One*, 12, 1–24.
- Accardi, A. (2015) Structure and gating of CLC channels and exchangers. *J. Physiol.*, 593, 4129–4138.
- Accardi, A., Lobet, S., Williams, C., Miller, C. and Dutzler, R. (2006) Synergism Between Halide Binding and Proton Transport in a CLC-type Exchanger. *J. Mol. Biol.*, 362, 691–699.
- Accardi, A. and Miller, C. (2004) Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of CIC Cl<sup>-</sup> channels. *Nature*, 427, 803–807.
- Accardi, A., Walden, M., Nguiragool, W., Jayaram, H., Williams, C. and Miller, C. (2005) Separate Ion Pathways in a Cl<sup>-</sup> /H<sup>+</sup> Exchanger. *J. Gen. Physiol.*, 126, 563–570.
- Alboresi, A., Gestin, C., Leydecker, M.T., Bedu, M., Meyer, C. and Truong, H.N. (2005) Nitrate, a signal relieving seed dormancy in Arabidopsis. *Plant, Cell Environ.*, 28, 500–512.
- Andrés, Z., Pérez-Hormaeche, J., Leidi, E.O., et al. (2014) Control of vacuolar dynamics and regulation of stomatal aperture by tonoplast potassium uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 111, E1806–14.
- Angeli, A. De, Monachello, D., Ephritikhine, G., Frachisse, J.M., Thomine, S., Gambale, F. and Barbier-Brygoo, H. (2006) The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature*, 442, 939–942.
- Angeli, A. De, Moran, O., Wege, S., Filleur, S., Ephritikhine, G., Thomine, S., Barbier-Brygoo, H. and Gambale, F. (2009) ATP Binding to the C Terminus of the *Arabidopsis thaliana* Nitrate/Proton Antiporter, AtCLCa, Regulates Nitrate Transport into Plant Vacuoles. *J. Biol. Chem.*, 284, 26526–26532.
- Basilio, D., Noack, K., Picollo, A. and Accardi, A. (2014) Conformational changes required for H(+)/Cl(-) exchange mediated by a CLC transporter. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 21, 456–63.
- Bennetts, B., Rychkov, G.Y., Ng, H.L., Morton, C.J., Stapleton, D., Parker, M.W. and Cromer, B.A. (2005) Cytoplasmic ATP-sensing domains regulate gating of skeletal muscle CIC-1 chloride channels. *J. Biol. Chem.*, 280, 32452–32458.
- Bergsdorf, E., Zdebik, A.A. and Jentsch, T.J. (2009) Residues Important for Nitrate / Proton Coupling in Plant and Mammalian CLC Transporters \*. , 284, 11184–11193.
- Blanke, M.M. and Belcher, A.R. (1989) Stomata of apple leaves cultured in vitro. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, 19, 85–89.
- Bloom, A.J. (2015) Photorespiration and nitrate assimilation: A major intersection between plant carbon and nitrogen. *Photosynth. Res.*, 123, 117–128.
- Boyer, J.S. (1982) Plant Productivity and Environment. *Science* (80-.), 218, 443–448.
- Boyer, J.S. (1968) Relationship of Water Potential to Growth of Leaves '., 1, 1056–1062.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248–254.
- Braidwood, L., Breuer, C. and Sugimoto, K. (2014) My body is a cage: Mechanisms and modulation of plant cell growth. *New Phytol.*, 201, 388–402.

- Brouwer, R. (1962) Nutritive influences on the distribution of dry matter in the plant. *Netherlands J. Agric. Sci.*, **10**, 399–408.
- Carr, G., Simmons, N. and Sayer, J. (2003) A role for CBS domain 2 in trafficking of chloride channel CLC-5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **310**, 600–605.
- Chen, B.M., Wang, Z.H., Li, S.X., Wang, G.X., Song, H.X. and Wang, X.N. (2004) Effects of nitrate supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate concentration and nitrate reductase activity in three leafy vegetables. *Plant Sci.*, **167**, 635–643.
- Chen, T.-Y. and Hwang, T.-C. (2008) CLC-0 and CFTR: Chloride Channels Evolved From Transporters. *Physiol. Rev.*, **88**, 351–387.
- Chiu, C.-C., Lin, C.-S., Hsia, A.-P., Su, R.-C., Lin, H.-L. and Tsay, Y.-F. (2004) Mutation of a nitrate transporter, AtNRT1:4, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development. *Plant Cell Physiol.*, **45**, 1139–1148.
- Chope, G.A., Wan, Y., Penson, S.P., Bhandari, D.G., Powers, S.J., Shewry, P.R. and Hawkesford, M.J. (2014) Effects of Genotype, Season, and Nitrogen Nutrition on Gene Expression and Protein Accumulation in Wheat Grain. *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 4399–4407.
- Chopin, F., Orsel, M., Dorbe, M.-F., Chardon, F., Truong, H.-N., Miller, A.J., Krapp, A. and Daniel-Vedele, F. (2007) The *Arabidopsis* ATNRT2.7 nitrate transporter controls nitrate content in seeds. *Plant Cell*, **19**, 1590–1602.
- Claeys, H. and Inze, D. (2013) The Agony of Choice: How Plants Balance Growth and Survival under Water-Limiting Conditions. *Plant Physiol.*, **162**, 1768–1779.
- Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998) Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **16**, 735–743.
- Cominelli, E., Galbiati, M., Vavasseur, A., Conti, L., Sala, T., Vuylsteke, M., Leonhardt, N., Dellaporta, S.L. and Tonelli, C. (2005) A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance. *Curr. Biol.*, **15**, 1196–1200.
- Cookson, S.J., Williams, L.E. and Miller, A.J. (2005) Light-dark changes in cytosolic nitrate pools depend on nitrate reductase activity in *Arabidopsis* leaf cells. *Plant Physiol.*, **138**, 1097–1105.
- Costa, A., Vijay Kanth Gutla, P., Boccaccio, A., et al. (2012) The *Arabidopsis* central vacuole as an expression system for intracellular transporters: Functional characterization of the Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> exchanger CLC-7. *J. Physiol.*, **590**, 3421–3430.
- Cotelle, V. and Leonhardt, N. (2016) 14-3-3 Proteins in Guard Cell Signaling. *Front. Plant Sci.*, **6**, 1–10.
- Cramer, M.D., Hawkins, H.-J. and Verboom, G.A. (2009) The importance of nutritional regulation of plant. *Oecologia*, **161**, 15–24.
- Crawford, N.M. (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell*, **7**, 859–68.
- Curtis, M.D. and Grossniklaus, U. (2003) A Gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Breakthr. Technol.*, **133**, 462–469.
- Davenport, S., Lay, P. Le and Sanchez-Tamburrino, J.P. (2015) Nitrate metabolism in tobacco leaves overexpressing *Arabidopsis* nitrite reductase. *Plant Physiol. Biochem.*, **97**, 96–107.
- Davies, D.D. and Humphrey, T.J. (1978) Amino Acid Recycling in Relation to Protein Turnover. *Plant Physiol.*, **61**, 54–58.
- Dechorgnat, J., Nguyen, C.T., Armengaud, P., Jossier, M., Diatloff, E., Filleur, S. and Daniel-Vedele, F. (2012) The Arabidopsis ATNRT2.7 nitrate transporter controls nitrate content in seeds. *Plant Cell*, **19**, 1590–1602.

- Vedele, F.** (2011) From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. *J. Exp. Bot.*, **62**, 1349–1359.
- Dutzler, R.** (2006) The CLC family of chloride channels and transporters. *Curr Opin Struct Biol*, **16**, 439–446.
- Dutzler, R., Campbell, E.B., Cadene, M., Chait, B.T. and MacKinnon, R.** (2002) X-ray structure of a CLC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature*, **415**, 287–294.
- Dutzler, R., Campbell, E.B. and MacKinnon, R.** (2003) Gating the selectivity filter in CLC chloride channels. *Science*, **300**, 108–112.
- Eisenach, C. and Angeli, A. De** (2017) Ion Transport at the Vacuole during Stomatal Movements. *Plant Physiol.*, **174**, 520–530.
- Engelsberger, W.R. and Schulze, W.X.** (2012) Nitrate and ammonium lead to distinct global dynamic phosphorylation patterns when resupplied to nitrogen-starved *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.*, **69**, 978–995.
- Estévez, R., Pusch, M., Ferrer-Costa, C., Orozco, M. and Jentsch, T.J.** (2004) Functional and structural conservational of CBS domains from CLC chloride channels. *J. Physiol.*, **557**, 363–378.
- Fecht-Bartenbach, J. Von Der, Bogner, M., Dynowski, M. and Ludewig, U.** (2010) CLC-b-mediated  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$  exchange across the tonoplast of *arabidopsis* vacuoles. *Plant Cell Physiol.*, **51**, 960–968.
- Fecht-Bartenbach, J.V.D., Bogner, M., Krebs, M., Stierhof, Y.D., Schumacher, K. and Ludewig, U.** (2007) Function of the anion transporter AtCLC-d in the trans-Golgi network. *Plant J.*, **50**, 466–474.
- Feng, L., Campbell, E.B., Hsiung, Y. and MacKinnon, R.** (2010) Structure of a eukaryotic CLC transporter defines an intermediate state in the transport cycle. *Science*, **330**, 635–41.
- Feng, L., Campbell, E.B., MacKinnon, R., Feng, L., MacKinnon, R., Campbell, E.B. and MacKinnon, R.** (2012) Molecular mechanism of proton transport in CLC  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  exchange transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **109**, 11699–11704.
- Filleur, S., Dorbe, M.F., Cerezo, M., Orsel, M., Granier, F., Gojon, A. and Daniel-Vedele, F.** (2001) An *Arabidopsis* T-DNA mutant affected in *Nrt2* genes is impaired in nitrate uptake. *FEBS Lett.*, **489**, 220–224.
- Frigerio, L., Hinz, G. and Robinson, D.G.** (2008) Multiple vacuoles in plant cells: Rule or exception? *Traffic*, **9**, 1564–1570.
- Gadsby, D.C.** (2009) Ion channels versus ion pumps: The principal difference, in principle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 344–352.
- Gaxiola, R.A., Yuan, D.S., Klausner, R.D. and Fink, G.R.** (1998) The yeast CLC chloride channel functions in cation homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 4046–4050.
- Geelen, D., Lurin, C., Bouchez, D., Frachisse, J.M., Lelièvre, F., Courtial, B., Barbier-Brygoo, H. and Maurel, C.** (2000) Disruption of putative anion channel gene AtCLC-a in *Arabidopsis* suggests a role in the regulation of nitrate content. *Plant J.*, **21**, 259–267.
- Girin, T., Lejay, L., Wirth, J., Widiez, T., Palenchar, P.M., Nazoa, P., Touraine, B., Gojon, A. and Lepetit, M.** (2007) Identification of a 150 bp cis-acting element of the AtNRT2.1 promoter

- involved in the regulation of gene expression by the N and C status of the plant. *Plant, Cell Environ.*, **30**, 1366–1380.
- Gjetting, K.S.K., Ytting, C.K., Schulz, A. and Fuglsang, A.T. (2012) Live imaging of intra-and extracellular pH in plants using pHusion, a novel genetically encoded biosensor. *J. Exp. Bot.*, **63**, 3207–3218.
- Godde, M. and Conrad, R. (2000) Influence of soil properties on the turnover of nitric oxide and nitrous oxide by nitrification and denitrification at constant temperature and moisture. *Biol. Fertil. Soils*, **32**, 120–128.
- Gorska, A., Ye, Q., Holbrook, N.M. and Zwieniecki, M.A. (2008) Nitrate Control of Root Hydraulic Properties in Plants: Translating Local Information to Whole Plant Response. *Plant Physiol.*, **148**, 1159–1167.
- Granstedt, R.C. and Huffaker, R.C. (1982) Identification of the leaf vacuole as a major nitrate storage pool. *Plant Physiol.*, **70**, 410–3.
- Graves, A.R., Curran, P.K., Smith, C.L. and Mindell, J.A. (2008) The Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter CIC-7 is the primary chloride permeation pathway in lysosomes. *Nature*, **453**, 788–792.
- Gregersen, P.L., Culetic, A., Boschian, L. and Krupinska, K. (2013) Plant senescence and crop productivity. *Plant Mol. Biol.*, **82**, 603–622.
- Gruber, B.D., Giehl, R.F.H., Friedel, S. and Wiren, N. von (2013) Plasticity of the Arabidopsis Root System under Nutrient Deficiencies. *Plant Physiol.*, **163**, 161–179.
- Guiboileau, A., Sormani, R., Meyer, C. and Masclaux-Daubresse, C. (2010) Senescence and death of plant organs: Nutrient recycling and developmental regulation. *Comptes Rendus - Biol.*, **333**, 382–391.
- Günther, W., Lüchow, a, Cluzeaud, F., Vandewalle, a and Jentsch, T.J. (1998) CIC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 8075–8080.
- Guo, F.-Q., Young, J. and Crawford, N.M. (2003) The nitrate transporter AtNRT1.1 (CHL1) functions in stomatal opening and contributes to drought susceptibility in Arabidopsis. *Plant Cell*, **15**, 107–17.
- Guo, W., Zuo, Z., Cheng, X., Sun, J., Li, H., Li, L. and Qiu, J.L. (2014) The chloride channel family gene CLCd negatively regulates pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.*, **65**, 1205–1215.
- Guo, Y. and Gan, S. (2005) Leaf Senescence: Signals, Execution, and Regulation. *Curr. Top. Dev. Biol.*, **71**, 83–112.
- Hackett, C. (1972) Method of applying nutrients locally to roots under controlled conditions, and some morphological effects of locally applied nitrate on the branching of wheat roots. *Aust. J. Biol. Sci.*, **25**, 1169–80.
- Han, Y.-L., Song, H.-X., Liao, Q., et al. (2016) Nitrogen use efficiency is mediated by vacuolar nitrate sequestration capacity in roots of *Brassica napus*. *Plant Physiol.*, **170**, pp.01377.2015.
- Hanke, W. and Miller, C. (1983) Single chloride channels from Torpedo electroplax. Activation by protons. *J. Gen. Physiol.*, **82**, 25–45.
- Havé, M., Marmagne, A., Chardon, F. and Masclaux-Daubresse, C. (2017) Nitrogen remobilization during leaf senescence: Lessons from Arabidopsis to crops. *J. Exp. Bot.*, **68**, 2513–2529.

- Hawkesford, M.J.** (2014) Reducing the reliance on nitrogen fertilizer for wheat production. *J. Cereal Sci.*, **59**, 276–283.
- He, Y.-N., Peng, J.-S., Cai, Y., Liu, D.-F., Guan, Y., Yi, H.-Y. and Gong, J.-M.** (2017) Tonoplast-localized nitrate uptake transporters involved in vacuolar nitrate efflux and reallocation in *Arabidopsis*. *Sci. Rep.*, **7**, 6417.
- Hechenberger, M., Schwappach, B., Fischer, W.N., Frommer, W.B., Jentsch, J., Steinmeyer, K. and Jentsch, T.J.** (1996) Membranes and Bioenergetics : A Family of Putative Chloride Channels from *Arabidopsis* and Functional Complementation of a Yeast Strain with a CLC Gene Disruption A Family of Putative Chloride Channels from *Arabidopsis* and Functional Complementation of a Y. *J. Biol. Chem.*, **271**, 33632–33638.
- Herdean, A., Nziengui, H., Zsiros, O., Solymosi, K., Garab, G., Lundin, B. and Spetea, C.** (2016) The *Arabidopsis* Thylakoid Chloride Channel AtCLCe Functions in Chloride Homeostasis and Regulation of Photosynthetic Electron Transport. *Front. Plant Sci.*, **7**, 1–15.
- Hildebrandt, T.M., Nunes Nesi, A., Araújo, W.L. and Braun, H.P.** (2015) Amino Acid Catabolism in Plants. *Mol. Plant*, **8**, 1563–1579.
- Ho, C.H., Lin, S.H., Hu, H.C. and Tsay, Y.F.** (2009) CHL1 Functions as a Nitrate Sensor in Plants. *Cell*, **138**, 1184–1194.
- Huang, N.C., Liu, K.H., Lo, H.J. and Tsay, Y.F.** (1999) Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *Plant Cell*, **11**, 1381–1392.
- Huang, Y., Drengstig, T. and Ruoff, P.** (2012) Integrating fluctuating nitrate uptake and assimilation to robust homeostasis. *Plant, Cell Environ.*, **35**, 917–928.
- Jacquot, A., Li, Z., Gojon, A., Schulze, W. and Lejay, L.** (2017) Post-translational regulation of nitrogen transporters in plants and microorganisms. *J. Exp. Bot.*, **68**, 2567–2580.
- Jayaram, H., Robertson, J.L., Wu, F., Williams, C. and Miller, C.** (2011) Structure of a slow CLC Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from a cyanobacterium. *Biochemistry*, **50**, 788–794.
- Jentsch, T.J.** (2015) Discovery of CLC transport proteins: cloning, structure, function and pathophysiology. *J. Physiol.*, **0**, n/a-n/a.
- Jentsch, T.J., Gunther, W., Pusch, M. and Schwappach, B.** (2014) Properties of voltage-gated chloride channels of the C1C gene family. , **13**.
- Jentsch, T.J., Steinmeyer, K. and Schwarz, G.** (1990) Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature*, **348**, 510–514.
- Jossier, M., Kronewicz, L., Dalmas, F., et al.** (2010) The *Arabidopsis* vacuolar anion transporter, AtCLCc, is involved in the regulation of stomatal movements and contributes to salt tolerance. *Plant J.*, **64**, 563–576.
- Karimi, M., Inze, D. and Depicker, A.** (2002) GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.*, **7**, 193–195.
- Kataoka, T., Watanabe-Takahashi, A., Hayashi, N., Ohnishi, M., Mimura, T., Buchner, P., Hawkesford, M.J., Yamaya, T. and Takahashi, H.** (2004) Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**, 2693–704.
- Khantwal, C.M., Abraham, S.J., Han, W., et al.** (2016) Revealing an outward-facing open

- conformational state in a CLC CL-/H<sup>+</sup> exchange transporter. *Elife*, **5**, 1–30.
- Kiba, T., Feria-Bourrelier, A.-B., Lafouge, F., et al.** (2012) The Arabidopsis nitrate transporter NRT2.4 plays a double role in roots and shoots of nitrogen-starved plants. *Plant Cell*, **24**, 245–58.
- Konishi, M. and Yanagisawa, S.** (2013) Arabidopsis NIN-like transcription factors have a central role in nitrate signalling. *Nat. Commun.*, **4**, 1617–1619.
- Konishi, M. and Yanagisawa, S.** (2010) Identification of a nitrate-responsive cis-element in the Arabidopsis NIR1 promoter defines the presence of multiple cis-regulatory elements for nitrogen response. *Plant J.*, **63**, 269–282.
- Koshuchowa, S., Zoglauer, K. and Göring, H.** (1990) Structure of Guard Cells and Function of Stomata of Plants cultured in vitro. *Biochem. und Physiol. der Pflanz.*, **186**, 289–299.
- Krapp, A.** (2015) Plant nitrogen assimilation and its regulation: A complex puzzle with missing pieces. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **25**, 115–122.
- Krapp, A., Berthome, R., Orsel, M., et al.** (2011) Arabidopsis Roots and Shoots Show Distinct Temporal Adaptation Patterns toward Nitrogen Starvation. *Plant Physiol.*, **157**, 1255–1282.
- Krapp, A., David, L.C., Chardin, C., et al.** (2014) Nitrate transport and signalling in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.*, **65**, 789–798.
- Krebs, M., Beyhl, D., Gorlich, E., Al-Rasheid, K. a. S., Marten, I., Stierhof, Y.-D., Hedrich, R. and Schumacher, K.** (2010) Arabidopsis V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**, 3251–3256.
- Krouk, G.** (2016) Hormones and nitrate: a two-way connection. *Plant Mol. Biol.*, **91**, 599–606.
- Kühn, C. and Grof, C.P.L.** (2010) Sucrose transporters of higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **13**, 288–298.
- Kutschera, U. and Niklas, K.J.** (2013) Cell division and turgor-driven stem elongation in juvenile plants: A synthesis. *Plant Sci.*, **207**, 45–56.
- Lark, R.M., Milne, A.E., Addiscott, T.M., Goulding, K.W.T., Webster, C.P. and O'Flaherty, S.** (2004) Scale- and location-dependent correlation of nitrous oxide emissions with soil properties: An analysis using wavelets. *Eur. J. Soil Sci.*, **55**, 611–627.
- Lee, S., Swanson, J.M.J. and Voth, G.A.** (2016) Multiscale Simulations Reveal Key Aspects of the Proton Transport Mechanism in the ClC-ec1 Antiporter. *Biophys. J.*, **110**, 1334–1345.
- Leij, M. Van Der, Smith, S.J. and Miller, A.J.** (1998) Remobilisation of vacuolar stored nitrate in barley root cells. *Planta*, **205**, 64–72.
- Lejay, L., Tillard, P., Lepetit, M., Olive, F.D., Filleur, S., Daniel-Vedele, F. and Gojon, A.** (1999) Molecular and functional regulation of two NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake systems by N- and C-status of Arabidopsis plants. *Plant J.*, **18**, 509–519.
- Lemaître, T., Gaufichon, L., Boutet-Mercey, S., Christ, A. and Masclaux-Daubresse, C.** (2008) Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in Arabidopsis thaliana Wassileskija accession. *Plant Cell Physiol.*, **49**, 1056–1065.
- Lezhneva, L., Kiba, T., Feria-Bourrelier, A.B., Lafouge, F., Boutet-Mercey, S., Zoufan, P., Sakakibara, H., Daniel-Vedele, F. and Krapp, A.** (2014) The Arabidopsis nitrate transporter NRT2.5 plays a role in nitrate acquisition and remobilization in nitrogen-starved plants. *Plant J.*, **80**, 230–241.

- Li, G., Santoni, V. and Maurel, C. (2014) Plant aquaporins: Roles in plant physiology. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, **1840**, 1574–1582.
- Li, G., Tillard, P., Gojon, A. and Maurel, C. (2016) Dual regulation of root hydraulic conductivity and plasma membrane aquaporins by plant nitrate accumulation and high-affinity nitrate transporter NRT2.1. *Plant Cell Physiol.*, **57**, 733–742.
- Li, W., Wang, Y., Okamoto, M., Crawford, N.M., Siddiqi, M.Y. and Glass, A.D.M. (2006) Dissection of the AtNRT2.1:AtNRT2.2 Inducible High-Affinity Nitrate Transporter Gene Cluster. *Plant Physiol.*, **143**, 425–433.
- Lim, H.-H. and Miller, C. (2009) Intracellular Proton-Transfer Mutants in a CLC  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  Exchanger. *J. Gen. Physiol.*, **133**, 131–138.
- Lim, H.H., Shane, T. and Miller, C. (2012) Intracellular Proton Access in a  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  Antiporter. *PLoS Biol.*, **10**.
- Lin, S.-H., Kuo, H.-F., Canivenc, G., et al. (2008) Mutation of the Arabidopsis NRT1.5 Nitrate Transporter Causes Defective Root-to-Shoot Nitrate Transport. *Plant Cell Online*, **20**, 2514–2528.
- Lísal, J. and Maduke, M. (2008) The CIC-0 chloride channel is a “broken”  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  antiporter. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 805–10.
- Liu, C.W., Sung, Y., Chen, B.C. and Lai, H.Y. (2014) Effects of nitrogen fertilizers on the growth and nitrate content of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **11**, 4427–4440.
- Liu, K.H., Huang, C.Y. and Tsay, Y.F. (1999) CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of *Arabidopsis* involved in multiple phases of nitrate uptake. *Plant Cell*, **11**, 865–874.
- Liu, K.H. and Tsay, Y.F. (2003) Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *EMBO J.*, **22**, 1005–1013.
- Lockhart, J.A. (1965) An analysis of irreversible plant cell elongation. *J. Theor. Biol.*, **8**, 264–275.
- Ludewig, U., Pusch, M. and Jentsch, T.J. (1996) Two physically distinct pores in the dimeric CIC-0 chloride channel. *Nature*, **383**, 340–343.
- Ludwig, M., Doroszewicz, J., Seyberth, H.W., Bökenkamp, A., Balluch, B., Nuutinen, M., Utsch, B. and Waldegger, S. (2005) Functional evaluation of Dent’s disease-causing mutations: Implications for CIC-5 channel trafficking and internalization. *Hum. Genet.*, **117**, 228–237.
- Lurin, C., Geelen, D., Barbier-Brygoo, H., Guern, J. and Maurel, C. (1996) Cloning and functional expression of a plant voltage-dependent chloride channel. *Plant Cell*, **8**, 701–11.
- Lv, Q. dan, Tang, R. jie, Liu, H., Gao, X. shu, Li, Y. zhou, Zheng, H. qiong and Zhang, H. xia (2009) Cloning and molecular analyses of the *Arabidopsis thaliana* chloride channel gene family. *Plant Sci.*, **176**, 650–661.
- Maduke, M., Williams, C. and Miller, C. (1998) Formation of CLC-0 chloride channels from separated transmembrane and cytoplasmic domains. *Biochemistry*, **37**, 1315–1321.
- Maeda, S.I., Konishi, M., Yanagisawa, S. and Omata, T. (2014) Nitrite transport activity of a novel HPP family protein conserved in cyanobacteria and chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, **55**, 1311–1324.
- Marchive, C., Roudier, F., Castaings, L., Bréhaut, V., Blondet, E., Colot, V., Meyer, C. and Krapp, A. (2013) Nuclear retention of the transcription factor NLP7 orchestrates the early response to nitrate in plants. *Nat. Commun.*, **4**, 1–9.

- Marmagne, A., Vinauger-Douard, M., Monachello, D., et al.** (2007) Two members of the *Arabidopsis* CLC (chloride channel) family, AtCLCe and AtCLCf, are associated with thylakoid and Golgi membranes, respectively. *J. Exp. Bot.*, **58**, 3385–3393.
- Martin, A., Lee, J., Kichey, T., et al.** (2006) Two Cytosolic Glutamine Synthetase Isoforms of Maize Are Specifically Involved in the Control of Grain Production. *Plant Cell Online*, **18**, 3252–3274.
- Martinoia, E., Heck, U. and Wiemken, A.** (1981) Vacuoles as storage compartments for nitrate in barley leaves. *Nature*, **289**, 292–294.
- Martinoia, E., Meyer, S., Angeli, A. De and Nagy, R.** (2012) Vacuolar Transporters in Their Physiological Context. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **63**, 183–213.
- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorganat, J., Chardon, F., Gaufichon, L. and Suzuki, A.** (2010) Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: Challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann. Bot.*, **105**, 1141–1157.
- McIntyre, G.I.** (2001) Control of plant development by limiting factors: A nutritional perspective. *Physiol. Plant.*, **113**, 165–175.
- McIntyre, G.I.** (1997) The Role of Nitrate in the Osmotic and Nutritional Control of Plant Development. *Aust. J. Plant Physiol.*, **24**, 103–118.
- Mensinga, T.C., Speijers, G.J.A. and Meulenbelt, J.** (2003) Health implications of exposure to environmental nitrogenous compounds. *Toxicol. Rev.*, **22**, 41–51.
- Menz, J., Li, Z., Schulze, W.X. and Ludewig, U.** (2016) Early nitrogen-deprivation responses in *Arabidopsis* roots reveal distinct differences on transcriptome and (phospho-) proteome levels between nitrate and ammonium nutrition. *Plant J.*, **88**, 717–734.
- Miflin, B.J.** (1974) The location of nitrite reductase and other enzymes related to amino Acid biosynthesis in the plastids of root and leaves. *Plant Physiol.*, **54**, 550–555.
- Migge, A., Carayol, E., Hirel, B. and Becker, T.W.** (2000) Leaf-specific overexpression of plastidic glutamine synthetase stimulates the growth of transgenic tobacco seedlings. *Planta*, **210**, 252–260.
- Miller, A.J., Fan, X., Orsel, M., Smith, S.J. and Wells, D.M.** (2007) Nitrate transport and signalling. *J. Exp. Bot.*, **58**, 2297–2306.
- Miller, A.J. and Smith, S.J.** (2008) Cytosolic nitrate ion homeostasis: Could it have a role in sensing nitrogen status? *Ann. Bot.*, **101**, 485–489.
- Miller, A.J. and Smith, S.J.** (1992) The mechanism of nitrate transport across the tonoplast of barley root cells. *Planta*, **187**, 554–557.
- Miller, C. and White, M.M.** (1984) Dimeric structure of single chloride channels from Torpedo electroplax. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **81**, 2772–5.
- Miller, E.C.** (1939) A physiological study of the winter wheat plant at different stages of its development. *Tech. Bull. 47, Kansas Agric. Exp. Stn.*
- Mindell, J.A. and Maduke, M.** (2001) CIC chloride channels. *Genome Biol.*, **2**
- Miranda, K.M., Espey, M.G. and Wink, D.A.** (2001) A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Biol. Chem.*, **5**, 62–71.
- Møller, A.L.B., Pedas, P., Andersen, B., Svensson, B., Schjoerring, J.K. and Finnie, C.** (2011) Responses of barley root and shoot proteomes to long-term nitrogen deficiency, short-term nitrogen starvation and ammonium. *Plant, Cell Environ.*, **34**, 2024–2037.

- Monachello, D., Allot, M., Oliva, S., Krapp, A., Daniel-Vedele, F., Barbier-Bryggo, H. and Ephritikhine, G. (2009) Two anion transporters AtClCa and AtClCe fulfil interconnecting but not redundant roles in nitrate assimilation pathways. *New Phytol.*, **183**, 88–94.
- Munemasa, S., Hauser, F., Park, J., Waadt, R., Brandt, B. and Schroeder, J.I. (2015) Mechanisms of abscisic acid-mediated control of stomatal aperture. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **28**, 154–162.
- Nazoa, P., Vidmar, J.J., Tranbarger, T.J., Mouline, K., Damiani, I., Tillard, P., Zhuo, D., Glass, A.D.M. and Touraine, B. (2003) Regulation of the nitrate transporter gene AtNRT2.1 in *Arabidopsis thaliana*: Responses to nitrate, amino acids and developmental stage. *Plant Mol. Biol.*, **52**, 689–703.
- Nguyen, C.T., Agorio, A., Jossier, M., Depré, S., Thomine, S. and Filleur, S. (2016) Characterization of the chloride channel-like, AtCLCg, involved in chloride tolerance in *arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, **57**, 764–775.
- Noctor, G., Bergot, G., Mauve, C., Thominet, D., Lelarge-Trouverie, C. and Prioul, J.L. (2007) A comparative study of amino acid measurement in leaf extracts by gas chromatography-time of flight-mass spectrometry and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Metabolomics*, **3**, 161–174.
- Noguero, M. and Lacombe, B. (2016) Transporters Involved in Root Nitrate Uptake and Sensing by *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.*, **7**, 1–7.
- Novarino, G., Weinert, S., Rickheit, G. and Jentsch, T.J. (2010) Endosomal Chloride-Proton Exchange. *Science (80-.)*, **328**, 1398–1402.
- Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R. and Stitt, M. (2010) Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. *Mol. Plant*, **3**, 973–996.
- Oaks, A. and Hirel, B. (1985) Nitrogen Metabolism in Roots. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **36**, 345–365.
- Ohkubo, Y., Tanaka, M., Tabata, R., Ogawa-Ohnishi, M. and Matsubayashi, Y. (2017) Shoot-to-root mobile polypeptides involved in systemic regulation of nitrogen acquisition. *Nat. Plants*, **3**, 1–6.
- Ohyama, K., Ogawa, M. and Matsubayashi, Y. (2008) Identification of a biologically active, small, secreted peptide in *Arabidopsis* by in silico gene screening, followed by LC-MS-based structure analysis. *Plant J.*, **55**, 152–160.
- Oliveira, I.C., Brears, T., Knight, T.J., Clark, A. and Coruzzi, G.M. (2002) Overexpression of cytosolic glutamine synthetase. Relation to nitrogen, light, and photorespiration. *Plant Physiol.*, **129**, 1170–1180.
- Pandey, S., Zhang, W. and Assmann, S.M. (2007) Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction. *FEBS Lett.*, **581**, 2325–2336.
- Paris, N., Stanley, C.M., Jones, R.L. and Rogers, J.C. (1996) Plant-Cells Contain 2 Functionally Distinct Vacuolar Compartments. *Cell*, **85**, 563–572.
- Park, E., Campbell, E.B. and MacKinnon, R. (2017) Structure of a CLC chloride ion channel by cryo-electron microscopy. *Nature*, **541**, 500–505.
- Peña-Münzenmayer, G., Catalán, M., Cornejo, I., Figueroa, C.D., Melvin, J.E., Niemeyer, M.I., Cid, L.P. and Sepúlveda, F. V (2005) Basolateral localization of native ClC-2 chloride channels in absorptive intestinal epithelial cells and basolateral sorting encoded by a CBS-2 domain di-leucine motif. *J. Cell Sci.*, **118**, 4243–4252.

- Pessemier, J. De, Chardon, F., Juraniec, M., Delaplace, P. and Hermans, C.** (2013) Natural variation of the root morphological response to nitrate supply in *Arabidopsis thaliana*. *Mech. Dev.*, **130**, 45–53.
- Picollo, A. and Pusch, M.** (2005) Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins CIC-4 and CIC-5. *Nature*, **436**, 420–423.
- Poroca, D.R., Pelis, R.M. and Chappe, V.M.** (2017) CLC channels and transporters: Structure, physiological functions, and implications in human chloride channelopathies. *Front. Pharmacol.*, **8**, 1–25.
- Ray, P.M., Green, P.B. and Cleland, R.** (1972) Role of turgor in plant cell growth. *Nature*, **239**, 163–164.
- Richard, E.A. and Miller, C.** (1990) Steady-State Coupling of Ion-Channel Conformations to a Transmembrane Ion Gradient. *Science (80-.)*, **247**, 1208–1210.
- Roelfsema, M.R.G. and Hedrich, R.** (2005) In the light of stomatal opening: New insights into "the Watergate." *New Phytol.*, **167**, 665–691.
- Roy, S.J., Cuin, T.A. and Leigh, R.A.** (2003) Nanolitre-scale assays to determine the activities of enzymes in individual plant cells. *Plant J.*, **34**, 555–564.
- Ruffel, S. and Gojon, A.** (2017) Systemic nutrient signalling: On the road for nitrate. *Nat. Plants*, **3**, 1–2.
- Rusconi, F., Simeoni, F., Francia, P., et al.** (2013) The *Arabidopsis thaliana* MYB60 promoter provides a tool for the spatio-temporal control of gene expression in stomatal guard cells. *J. Exp. Bot.*, **64**, 3361–3371.
- Satoh, N., Suzuki, M., Nakamura, M., Suzuki, A., Horita, S., Seki, G. and Moriya, K.** (2017) Functional coupling of V-ATPase and CLC-5. *World J. Nephrol.*, **6**, 14–20.
- Schimel, J.P. and Bennett, J.B.** (2004) Nitrogen Mineralization: Challenges of a Changing Paradigm. *Ecology*, **85**, 591–602.
- Schluter, U., Mascher, M., Colmsee, C., Scholz, U., Brautigam, A., Fahnenschich, H. and Sonnewald, U.** (2012) Maize Source Leaf Adaptation to Nitrogen Deficiency Affects Not Only Nitrogen and Carbon Metabolism But Also Control of Phosphate Homeostasis. *Plant Physiol.*, **160**, 1384–1406.
- Schumaker, K.S. and Sze, H.** (1987) Decrease of pH Gradients in Tonoplast Vesicles by NO<sub>3</sub> and Cl<sup>-</sup>: Evidence for H-Coupled Anion Transport. *Plant Physiol.*, **83**, 490–6.
- Schwappach, B., Stobrawa, S., Hechenberger, M., Steinmeyer, K. and Jentsch, T.J.** (1998) Golgi localization and functionally important domains in the NH<sub>2</sub> and COOH terminus of the yeast CLC putative chloride channel Gef1p. *J. Biol. Chem.*, **273**, 15110–15118.
- Sebilo, M., Mayer, B., Nicolardot, B., Pinay, G. and Mariotti, A.** (2013) Long-term fate of nitrate fertilizer in agricultural soils. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **110**, 18185–18189.
- Segonzac, C., Boyer, J.-C., Ipotesi, E., Szponarski, W., Tillard, P., Touraine, B., Sommerer, N., Rossignol, M. and Gibrat, R.** (2007) Nitrate Efflux at the Root Plasma Membrane: Identification of an *Arabidopsis* Excretion Transporter. *Plant Cell Online*, **19**, 3760–3777.
- Shangguan, Z.P., Shao, M.A. and Dyckmans, J.** (2000) Nitrogen nutrition and water stress effects on leaf photosynthetic gas exchange and water use efficiency in winter wheat. *Environ. Exp. Bot.*, **44**, 141–149.

- Srivastava, H.S.** (1980) Regulation of nitrate reductase activity in higher plants. *Phytochemistry*, **19**, 725–733.
- Stitt, M. and Krapp, a** (1999) The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant, Cell Environ.*, **22**, 553–621.
- Stöltzing, G., Teodorescu, G., Begemann, B., et al.** (2013) Regulation of ClC-2 gating by intracellular ATP. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, **465**, 1423–1437.
- Strahm, B.D. and Harrison, R.B.** (2006) Nitrate Sorption in a Variable-Charge Forest Soil of the Pacific Northwest. *Soil Sci.*, **171**, 313–321.
- Sun, C.-H., Yu, J.-Q. and Hu, D.-G.** (2017) Nitrate: A Crucial Signal during Lateral Roots Development. *Front. Plant Sci.*, **8**, 1–9.
- Tabata, R., Sumida, K., Yoshii, T., Ohyama, K., Shinohara, H. and Matsubayashi, Y.** (2014) Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling. *Science (80-.)*, **346**, 343–346.
- Tegeder, M. and Masclaux-Daubresse, C.** (2018) Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use. *New Phytol.*, **217**, 35–53.
- Tian, H., Smet, I. De and Ding, Z.** (2014) Shaping a root system: Regulating lateral versus primary root growth. *Trends Plant Sci.*, **19**, 426–431.
- Tsay, Y.F., Chiu, C.C., Tsai, C.B., Ho, C.H. and Hsu, P.K.** (2007) Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Lett.*, **581**, 2290–2300.
- Tsay, Y.F., Schroeder, J.I., Feldmann, K.A. and Crawford, N.M.** (1993) The herbicide sensitivity gene CHL1 of arabidopsis encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell*, **72**, 705–713.
- Umar, A.S. and Iqbal, M.** (2007) Agronomy for sustainable development. *Agron. Sustain. Dev.*, **27**, 45–57.
- Urriola, J. and Rathore, K.S.** (2015) Overexpression of a glutamine synthetase gene affects growth and development in sorghum. *Transgenic Res.*, **24**, 397–407.
- Vien, M., Basilio, D., Leisle, L. and Accardi, A.** (2017) Probing the conformation of a conserved glutamic acid within the Cl<sup>-</sup> pathway of a CLC H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> exchanger. *J. Gen. Physiol.*, **149**, 1–7.
- Vitousek** (2009) Nutrient Imbalances in Agricultural Development. *Europe*, 1519–1521.
- Vivancos, P.D., Driscoll, S.P., Bulman, C.A., Ying, L., Emami, K., Treumann, A., Mauve, C., Noctor, G. and Foyer, C.H.** (2011) Perturbations of Amino Acid Metabolism Associated with Glyphosate-Dependent Inhibition of Shikimic Acid Metabolism Affect Cellular Redox Homeostasis and Alter the Abundance of Proteins Involved in Photosynthesis and Photorespiration. *Plant Physiol.*, **157**, 256–268.
- Walden, M., Accardi, A., Wu, F., Xu, C., Williams, C. and Miller, C.** (2007) Uncoupling and turnover in a Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> exchange transporter. *J. Gen. Physiol.*, **129**, 317–329.
- Wang, M., Ding, L., Gao, L., Li, Y., Shen, Q. and Guo, S.** (2016) The Interactions of Aquaporins and Mineral Nutrients in Higher Plants. *Int. J. Mol. Sci.*, **17**.
- Wang, R.** (2000) Genomic Analysis of a Nutrient Response in Arabidopsis Reveals Diverse Expression Patterns and Novel Metabolic and Potential Regulatory Genes Induced by Nitrate. *Plant Cell Online*, **12**, 1491–1510.
- Wang, Y., Cheng, Y., Chen, K. and Tsay, Y.** (2018) Nitrate Transport, Signaling, and Use Efficiency.
- Wang, Y.H., Garvin, D.F. and Kochian, L. V** (2001) Nitrate-induced genes in tomato roots. Array

- analysis reveals novel genes that may play a role in nitrogen nutrition. *Plant Physiol.*, **127**, 345–59.
- Wege, S., Angeli, A. De, Droillard, M., et al. (2014) Phosphorylation of the vacuolar anion exchanger AtCLCa is required for the stomatal response to abscisic acid. *Sci. Signal.*, **7**.
- Wege, S., Jossier, M., Filleur, S., Thomine, S., Barbier-Brygoo, H., Gambale, F. and Angeli, A. De (2010) The proline 160 in the selectivity filter of the Arabidopsis NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/H<sup>+</sup> exchanger AtCLCa is essential for nitrate accumulation in planta. *Plant J.*, **63**, 861–869.
- Weinert, S., Jabs, S., Supanchart, C., et al. (2010) Lysosomal pathology and osteopetrosis upon loss of H<sup>+</sup>-driven lysosomal Cl<sup>-</sup> accumulation. *Science (80-.)*, **328**, 1401–1403.
- White, Michael M; Miller, C. (1979) A voltage-gated anion channel from the electric organ of *Torpedo californica*. *J. Biol. Chem.*, **254**, 10161–10166.
- Wirth, J., Chopin, F., Santoni, V., Viennois, G., Tillard, P., Krapp, A., Lejay, L., Daniel-Vedele, F. and Gojon, A. (2007) Regulation of root nitrate uptake at the NRT2.1 protein level in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, **282**, 23541–23552.
- Wong, T.H., Li, M.W., Yao, X.Q. and Lam, H.M. (2013) The GmCLC1 protein from soybean functions as a chloride ion transporter. *J. Plant Physiol.*, **170**, 101–104.
- Yan, H., Xie, L., Guo, L., Fan, J., Diao, T., Lin, M., Zhang, H. and Lin, E. (2014) Characteristics of nitrous oxide emissions and the affecting factors from vegetable fields on the North China Plain. *J. Environ. Manage.*, **144**, 316–321.
- Yang, S.Y., Huang, T.K., Kuo, H.F. and Chiou, T.J. (2017) Role of vacuoles in phosphorus storage and remobilization. *J. Exp. Bot.*, **68**, 3045–3055.
- Yong, Z., Kotur, Z. and Glass, A.D.M. (2010) Characterization of an intact two-component high-affinity nitrate transporter from *Arabidopsis* roots. *Plant J.*, **63**, 739–748.
- Yu, L.H., Wu, J., Tang, H., Yuan, Y., Wang, S.M., Wang, Y.P., Zhu, Q.S., Li, S.G. and Xiang, C. Bin (2016) Overexpression of *arabidopsis* NLP7 improves plant growth under both nitrogen-limiting and-sufficient conditions by enhancing nitrogen and carbon assimilation. *Sci. Rep.*, **6**, 1–13.
- Zdebik, A.A., Zifarelli, G., Bergsdorf, E.Y., Soliani, P., Scheel, O., Jentsch, T.J. and Pusch, M. (2008) Determinants of anion-proton coupling in mammalian endosomal CLC proteins. *J. Biol. Chem.*, **283**, 4219–4227.
- Zhang, H. and Forde, B.G. (1998) An *Arabidopsis* MADS Box Gene That Controls Nutrient-Induced Changes in Root Architecture. *Science (80-.)*, **279**, 407–409.
- Zhang, H. and Forde, B.G. (2000) Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *J. Exp. Bot. MP Spec. Issue*, **51**, 51–59.
- Zhang, H., Rong, H. and Pilbeam, D. (2007) Signalling mechanisms underlying the morphological responses of the root system to nitrogen in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.*, **58**, 2329–2338.
- Zhang, Y., Wang, H., Liu, S., Lei, Q., Liu, J., He, J., Zhai, L., Ren, T. and Liu, H. (2015) Identifying critical nitrogen application rate for maize yield and nitrate leaching in a Haplic Luvisol soil using the DNDC model. *Sci. Total Environ.*, **514**, 388–398.
- Zhao, X.Q., Nie, X.L. and Xiao, X.G. (2013) Over-Expression of a Tobacco Nitrate Reductase Gene in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Increases Seed Protein Content and Weight without Augmenting Nitrogen Supplying. *PLoS One*, **8**, 1–11.

- Zhong, P.J., Gallardo, F., Pascual, M.B., Sampalo, R., Romero, J., Navarra, A.T. De and Cánovas, F.M.** (2004) Improved growth in a field trial of transgenic hybrid poplar overexpressing glutamine synthetase. *New Phytol.*, **164**, 137–145.
- Zifarelli, G. and Pusch, M.** (2010) CLC transport proteins in plants. *FEBS Lett.*, **584**, 2122–2127.
- Zifarelli, G. and Pusch, M.** (2009) Conversion of the 2 Cl-/1 H<sup>+</sup> antiporter CIC-5 in a NO<sub>3</sub>-/H<sup>+</sup> antiporter by a single point mutation. *EMBO J.*, **28**, 175–182.

**Titre :** Le couplage nitrate/proton au sein de l'échangeur AtClCa est essentiel à la physiologie de la plante en réponse aux fluctuations environnementales

**Mots clés :** Nitrate, AtClCa, stockage, échangeur, résidus conservés, vacuole

**Résumé :** Chez les plantes, le nitrate est un élément essentiel mais sa disponibilité dans le sol est fluctuante. Il est donc stocké dans la vacuole grâce à un échangeur nitrate/proton appelé AtClCa. La famille de protéines ClCs comporte à la fois des échangeurs mais aussi des canaux suggérés comme issus de l'évolution des échangeurs par une conversion mécanistique. Chez *Arabidopsis thaliana*, seuls des ClCs échangeurs assurent la gestion du nitrate. Deux glutamates très conservés, E203 et E270 dans AtClCa, sont essentiels pour le transport des protons chez les ClCs échangeurs. La mutation du résidu E203 en une alanine, un acide aminé non protonable (E203A) a permis de produire artificiellement une telle conversion mécanistique. Afin de mieux comprendre l'importance physiologique du mécanisme d'échange, une analyse a été conduite sur des plantes

exprimant la forme mutée d'AtClCa pour ce glutamate. Chez ces plantes, le stockage vacuolaire est fortement réduit au profit d'une importante assimilation accroissant la teneur en protéines. En dépit de cela, elles présentent un défaut de production de biomasse résultant en grande partie d'une perturbation de l'homéostasie hydrique. Elles sont également plus sensibles aux stress hydrique et probablement azoté. La conservation d'un échangeur est donc requise pour croître en dépit des fluctuations environnementales. En parallèle, la mutation E270A a été introduite en plante afin d'étudier son importance sur la physiologie d'*Arabidopsis*. Une analyse préliminaire de la biomasse et des contenus en nitrate et eau de plantes exprimant la forme mutée de ce glutamate est donc présentée dans la seconde partie de cette thèse.

**Title :** Nitrate/proton coupling in AtClCa exchanger is required for plant physiology in response to environment fluctuations

**Keywords :** Nitrate, AtClCa, storage, exchanger, conserved residues, vacuole

**Abstract :** Nitrate is a major element for plant but its availability is very fluctuant in soils. Then, it is stored in vacuoles thanks to a nitrate/proton exchanger named AtClCa. In ClCs, exchangers but also channels were identified, the latest were suggested to be evolved from exchanger in which a mechanistic switch happened. In *Arabidopsis thaliana*, only exchangers are involved in nitrate management. Two conserved glutamate, E203 and E270 in AtClCa, are essential for protons transport in ClCs exchangers. The mutation of E203 into an alanine, a non-protonable amino acid (E203A) artificially produces such a mechanistic switch. To better understand the physiological importance of this exchange mechanism, a study was conducted in plants expressing the mutated form of

AtClCa for this glutamate. In those plants, the vacuolar storage is highly restricted whereas the assimilation is favoured and the protein content increased. Despite that, the biomass production is decreased mostly because of a hydric homeostasis disruption. Those plants are also more sensitive to hydric and probably nitrogenous stress. The exchanger conservation is then required for plant growth whatever the environmental fluctuations. In parallel, the mutation E270A was introduced *in planta* to study its physiological importance. A preliminary analysis of plant biomass and nitrate and water contents was then performed in plants expressing the E270A mutated form of AtClCa and the results are presented in the second part of the manuscript.

