

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par le
**Centre international d'études supérieures en
sciences agronomiques
Montpellier**

Thèse en cotutelle avec
L'université de Sfax
Faculté des Sciences de Sfax - Tunisie

Préparée au sein de l'école doctorale SIBAGHE
Et de l'unité de recherche B&PMP

Spécialité : Biologie Intégrative des Plantes

Présentée par **Nibras Belgaroui**

**Dissection moléculaire et physiologique du rôle de
l'acide phytique dans la réponse des plantes aux
stress de l'environnement**

Soutenue le 17 / 12 / 2016, devant le jury composé de :

M. Ali GARGOURI, Professeur (CBS)	Président
M. Chedly ABDELLY, Professeur (CBBC)	Rapporteur
M. Thierry DESNOS, Chargé de recherche, HDR (CEA)	Rapporteur
M. Christophe ROBAGLIA, Professeur (CEA)	Examineur
M. Moez HANIN, Professeur (ISBS)	Directeur de Thèse
M. Hatem ROUACHED, HDR (INRA Montpellier)	Directeur de Thèse

DEDICACE

Je dédie ce travail,

A mes chers parents

*qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont encouragé à réaliser
mes ambitions.*

*Si j'en suis là aujourd'hui, c'est grâce à vous! Je vous suis infiniment
reconnaissante de l'éducation et des valeurs que vous m'avez transmises*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mon immense gratitude
et mon profond amour.*

A ma chère sœur Safa

Pour tant d'amour

*Merci sœurette, d'être toujours à mes cotés pour me soutenir, me
réconforter... nos rêves peuvent, un jour, devenir réalité ...*

A toute ma famille

A mes chers amis

A tous ceux qui ont contribué à ma formation

REMERCIEMENTS

C'est un travail de longue haleine, un défi que l'on se donne à soi-même mais c'est surtout une aventure passionnante et enrichissante...

Ce travail de recherche a pu aboutir grâce la contribution de nombreuses personnes. Je désire ici leur témoigner ma sincère gratitude via ces quelques lignes.

Je tiens à remercier chaleureusement Messieurs **Khaled MASMOUDI** et **Faiçal BRINI** directeurs successifs du Laboratoire de Biotechnologie et d'Amélioration des Plantes de m'avoir accordé leurs confiances en m'ayant accueilli au sein de leurs Laboratoires. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma grande reconnaissance, de ma gratitude et de mon profond respect.

Je tiens également à remercier les membres de l'équipe Métaux pour l'accueil et les conditions de travail privilégiées qui m'ont été offertes, et tout particulièrement Pr. **Pierre BERTHOMIEU** (directeur de l'équipe Adaptation des Plantes aux Métaux), je vous remercie pour l'accueil, le temps et l'intérêt que vous m'avez accordés. Merci aussi à **Claude NESPOULOUS**, **Françoise GOSTI**, **Laurence MARQUES**, **Patrick DOUMAS**, **Teddy CASTILLO** pour leur gentillesse, leur sympathie, leur encouragement ainsi que leurs discussions enrichissantes lors des réunions d'équipe. Je remercie également tous les membres de l'unité mixte de recherche Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes.

J'exprime mes plus sincères remerciements au Pr. **Moez HANIN** qui a veillé à mon encadrement. Je suis ravie d'avoir travaillé en sa compagnie car outre ses indubitables compétences scientifiques et académiques, son assiduité, sa générosité, il a toujours été là pour me soutenir et me conseiller. Dès le début PFE, master, et durant toute ma thèse, ses discussions scientifiques, sa richesse d'esprit, sa rigueur professionnelle et ses précieux conseils ont été pour moi une source d'inspiration et d'encouragement. Merci pour ta disponibilité, ta compréhension et ta gentillesse. Merci aussi pour la confiance que tu m'as apportée et dont j'avais besoin pour continuer à parcourir cette aventure de rêve et de défi. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect et de mon éternelle gratitude.

Un grand Merci à Monsieur le Docteur **Hatem ROUACHED**, qui a assuré mon co-encadrement, pour son aide précieuse, ses conseils, sa rigueur scientifique et ses réflexions avisées qu'il m'a apportés.

Mes sincères remerciements et ma gratitude vont aussi au Pr. **Ali GARGOURI** pour avoir accepté de juger ce travail et d'en présider le jury de soutenance. Que vous soyez assuré de mon entière reconnaissance.

Je remercie Pr. **Chedly ABDELLY** et Dr. **Thierry DESNOS** qui ont bien voulu s'intéresser à ce travail en acceptant d'en être les rapporteurs. Je tiens à leurs exprimer ma considération la plus respectueuse.

Je tiens également à remercier Pr. **Christophe ROBAGLIA** qui a accepté de juger ce travail en tant qu'examineur. Je lui adresse mes sentiments les plus respectueux.

Mes sincères remerciements et ma gratitude vont aussi au Pr. **Jean-Claude DAVIDIAN**, pour sa gentillesse, son enthousiasme, ses nombreuses réflexions scientifiques, ses discussions très enrichissantes, ainsi qu'à sa patience lors de mes nombreuses sollicitations pour les analyses HPIC. Le partage de son expérience, ses encouragements et ses conseils m'ont été particulièrement précieuses.

J'aimerais spécialement présenter ma reconnaissance infinie à **Chantal EBEL**, maître assistante à l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Sfax pour sa générosité, ses remarques pertinentes, son suivi et sa lecture scrupuleuse du manuscrit. Elle a toujours fait tout son possible pour m'aider et elle a su me remonter le moral dans les moments difficiles.

J'adresse mes sincères remerciements pour les membres de mon comité de thèse **Sabine Zimmermann, Jean François Briat, Thierry Desnos, Patrick Doumas et Pierre Berthomieu**. Merci pour vos conseils, vos suggestions et vos remarques pertinentes qui m'ont permis d'envisager mon travail sous un autre angle, tout en étoffant mes connaissances et en stimulant mon esprit critique.

Un grand merci aux doctorants et aux stagiaires avec lesquels j'ai eu l'occasion de travailler dans l'équipe métaux: **Oriane, Jérémy, Iliana, Amanda, Amal, NguyetAnh, Mushtak, Muhanad, et Sikander**. Je remercie également **Mariam, Dorsaf, Ines, Nesrine, Fida** et tout particulièrement **Alaeddine** pour sa gentillesse et sa disponibilité à chaque fois que j'ai eu besoin de son aide.

Je tiens également à remercier **Ikram Zaidi, Rania Ben Saad et Najib Saidi**, pour leur encouragement et leur aide.

J'adresse mes affectueux remerciements à **Héla S, Mariem B, Sana K, Amira D, Hanen B et Héla G** pour l'indéfectible soutien qu'ils m'ont apporté à tout moment. Merci à vous pour votre amitié, votre sympathie, les bons moments passés dans le labo et aussi pour partager des fous rires qui nous ont permis de supporter toutes nos lourdeurs.

Merci également à tous les amis qui m'ont supporté: **Maroua D, Sana T, Karama H, Mouna G, Siwar B, Rania J, Kawthar F, Sandra G, Habib M, Nabil Z ...** et à tous les membres de notre équipe LBAP pour l'encouragement et l'aide qu'ils m'ont témoignés durant ces années.

Il m'est impossible d'oublier **Majdi Touzri** pour sa passion de la recherche scientifique qu'il m'a transmise, sa générosité et sa bonne humeur. Qu'il trouve ici mes sincères sentiments de respect et de fraternité.

Enfin, mes plus vifs remerciements sont également adressés à tous les chercheurs et les personnels du CBS pour leur gentillesse et leur serviabilité et à tous qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Avant propos

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une thèse en cotutelle entre :

La Faculté des Sciences de Sfax (FSS), Laboratoire de Biotechnologie et d'Amélioration des Plantes (LBAP) du Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS) sous l'encadrement du **Pr. Moez HANIN**

&

Le Centre International d'Études Supérieures en Sciences Agronomiques Montpellier (SupAgro Montpellier), Équipe Métaux de l'Unité mixte de recherche Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes (B&PMP) sous l'encadrement du **Dr. Hatem ROUACHED**

Mon sujet de thèse s'intitule "**Dissection moléculaire et physiologique du rôle de l'acide phytique dans la réponse des plantes aux stress de l'environnement**"

L'objectif de mon travail de thèse est, d'une part, de tester l'effet de l'activité de la phytase PHY-US417 sur la croissance des plantes d'*Arabidopsis thaliana* dans des conditions de carence en phosphore, et d'autre part, d'investiguer le rôle de l'AP et de ses dérivés dans le contrôle des interactions entre les voies de signalisation régulant l'homéostasie du P et du Zn ainsi que dans la réponse des plantes aux stress abiotiques.

Abréviations

A	: Adénine
ABA	: Abscisic Acid
ADN	: Acide Désoxyribonucléique
ADNc	: Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AP ou InsP₆, IP6	: Acide phytique ou <i>myo</i> -inositol 1,2,3,4,5,6 hexakis phosphate
ARN	: Acide Ribonucléique
ARNm	: Acide Ribonucléique messenger
AsA	: Acide ascorbique
ATP	: Adénosine Tri-Phosphate
APS	: PerSulfate d' Ammonium
BET	: Bromure d'éthidium
BSA	: Bovine Serum Albumine
C	: Cytosine
Ca²⁺	: ions calcium
CaCl₂	: Chlorure de calcium
CaMV35S	: Cauliflower Mosaic Virus 35S
CAT	: Catalase
DAB	: Diaminobenzidine
DAG	: Diacylglycérol
DEPC	: Diethyl Pyrocarbonate
DNase	: désoxyribonucléase
dNTPs	: Désoxynucléotides Triphosphate (dATP + dCTP + dGTP + dTTP)
DO	: Densité Optique
DTT	: Dithiothréitol
EDTA	: acide Ethylène Diamine Tétra-Acétique
Ext3	: Extensine 3 d' <i>Arabidopsis</i>
Fe	: Fer
G	: Guanine
g	: gramme
GFP	: Green fluorescent protein
GUS	: béta-glucuronidase
HAP	: Histidine Acide Phosphatase
H₂O₂	: peroxyde d'hydrogène
HPIC	: High-Performance Ionic
IAA	: indole-3-acetic acid
IMP	: <i>myo</i> -inositol 3-monophosphatase
IP ou IPP	: Inositol Phosphates ou Inositol polyphosphate
IPTG	: Iso-propyl-D-thio-galactopyrannoside
IPK1	: inositol(1,3,4,5,6)P ₅ 2-kinase
IPK2	: inositol(1,4,5)P ₃ 3-/6-kinase
Ins	: <i>myo</i> -inositol
Ins(3)P₁	: <i>myo</i> -inositol 3-mono phosphate
InsP₂, IP₂	: <i>myo</i> -inositol bis phosphate
Ins(1,3,4)P₃	: <i>myo</i> -inositol 1,3,4 tris phosphate
Ins(1,4,5)P₃	: <i>myo</i> -inositol 1,4,5 tris phosphate
Ins(3,4,6)P₃	: <i>myo</i> -inositol 3,4,6 tris phosphate
Ins(1,3,5)P₃	: <i>myo</i> -inositol 1,3,5 tris phosphate

Ins(2,4,6)P₃	: <i>myo</i> -inositol 2,4,6 tris phosphate
InsP₄	: <i>myo</i> -inositol tetrakis phosphate
InsP₅	: <i>myo</i> -inositol pentakis phosphate
ITPK	: inositol(1,3,4)P ₃ 5-/6-kinase
kb	: Kilobase
l	: litre
LB	: Lauria Bertani
lpa	: low phytic acid
M	: mol/litre
MDA	: malondialdéhyde
mg	: milligramme
min	: minute
ml	: millilitre
mM	: millimoles
MS	: Murashig and Skoog
MES	: Acide 2-morpholino éthanesulfonique monohydraté
MIK	: <i>myo</i> -inositol 3-monophosphate kinase
MIPS	: <i>myo</i> -inositol(3)P1 synthase
miRNA	: micro-RNA
MRP	: multidrug-resistance-associated protein
NaCl	: Chlorure de sodium
NBT	: nitro blue tetrazolium chloride
O₂^{•-}	: anion superoxyde
P	: Phosphore
PAP	: Phosphatases Acides Pourpres
pb	: Paire de bases
PCR	: Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne
PHY-US417	: la phytase produite par <i>Bacillus subtilis</i> US417
Pi	: Phosphate inorganique
PLC	: Phospholipase C
Po	: Phosphore organique
POD	: Peroxydase
PPI	: Polyphosphoinositides
PtdIns	: phosphatidylinositol
PtdIns(4,5)P₂ ou PIP₂	: phosphatidyl inositol-4,5-bisphosphate
PtdIS	: phosphatidylinositol synthase
PTP	: Protéine Tyrosine Phosphatase
qsp	: quantité suffisante pour
qRT-PCR	: Quantitative Reverse Transcription-PCR
rpm	: rotation par minute
RNase	: Ribonucléase
ROS	: Reactive Oxygen Species
RT	: Reverse transcription
RT-PCR	: Reverse transcription-PCR
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
SOD	: Superoxyde Dismutase
secs	: secondes
T	: Tymine
T°	: Température
TAE	: Tris-Acétate-EDTA

Taq	: Thermophilus aquaticus
TBA	: Acide thiobarbiturique
TCA	: Acide trichloroacétique
TE	: Tris-EDTA
TEMED	: Tétraméthylènediamine
Tm	: melting Temperature, Température d'hybridation
UV	: ultra-violet
V	: Volume
WT	: Wild-type
X-gal	: 5 bromo-4 chloro- 3 indolyl -béta-D-galactosidase
X-Gluc	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide
µg	: microgramme
µl	: microlitre
µM	: micro molaire
βPPs	: béta-propellar phytase
°C	: degré Celsius

Sommaire

Introduction générale.....	1
Synthèse Bibliographique.....	4
I. le phosphore	4
I.1. Importance du phosphore.....	4
I.2. Le phosphore dans le sol et sa biodisponibilité.....	4
I.3. L' Absorption du Pi.....	5
* Les transporteurs à haute affinité.....	5
* Les transporteurs à faible affinité.....	7
I.4. Les réponses adaptatives des plantes à une carence en Pi.....	9
I.4.1. Adaptation de l'architecture racinaire.....	9
*Rôles des phytohormones dans la régulation de l'architecture racinaire induite par la carence en P.....	12
I.4.2 La mycorhization.....	15
I.4.3. Solubilisation du P du sol.....	16
I.4.4. La régulation des systèmes de transport de Pi et les changements d'expression des gènes.....	17
I.4.5. Mobilisation du phosphate interne.....	20
1.5. La perception et la signalisation du Pi.....	22
1.5.1. La perception du Pi.....	22
1.5.2. Voie de signalisation de la carence en Pi (locale et systémique).....	23
1.5.2.1. Les signaux transportés des racines vers les feuilles.....	25
*Le signal phosphate.....	25
* La régulation systémique via les hormones strigolactones et cytokinines.....	26
1.5.2.2. Les signaux longs distances issus des feuilles.....	26
* Les miARN.....	26
*Les sucres.....	27
* Le calcium.....	27
II. L'acide phytique.....	28
II.1. Structure chimique et localisation	28
II.2. Fonctions et biosynthèse.....	28
II.3. Facteur antinutritionnel et problèmes environnementaux.....	31
II.4. Les mutants pauvre en acide phytique (<i>lpa</i> : low phytic acid contents).....	33
II.4.1. Production des mutants <i>lpa</i>	33
II.4.2. Caractéristiques des mutants <i>lpa</i>	34

II.4.3. Rôle des InsP dans les réponses aux contraintes abiotiques.....	38
III. Interaction entre phosphate et autre éléments minéraux.....	42
III.1. Interaction entre phosphate et zinc.....	42
III.2. Interaction entre phosphate et fer.....	44
III.3. Interaction entre phosphate et sulfate.....	45
IV. Les phytases.....	46
IV.1. Rôle des phytases.....	46
IV.2. Classification et propriétés des phytases.....	48
IV.3. Application des phytases	51
Matériels et méthodes	55
I. Matériels biologiques	55
I.1. Matériel végétal et conditions de culture.....	55
I.2. Souches bactériennes.....	55
I.2.1. <i>Escherichia coli</i>	55
I.2.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	56
I.3. Vecteurs de clonage.....	56
II. Méthodes.....	57
II.1. Méthodes de clonage moléculaire.....	57
II.1.1. Réactions d'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction).....	57
II.1.2. Digestion enzymatique de l'ADN.....	57
II.1.3. Précipitation à l'éthanol.....	58
II.1.4. Obtention de bouts francs par l'utilisation de la Klenow.....	58
II.1.5. Purification des fragments.....	58
II.1.6. Ligation vecteur-insert	58
II.1.7. Transformation des bactéries compétentes.....	58
II.1.8. PCR sur colonies.....	59
II.1.9. Séquençage et analyse bioinformatique.....	59
II.1.10. Extraction d'ADN plasmidique par la méthode de lyse alcaline (mini préparation).....	60
II.1.11. Electrophorèse en gel d'agarose.....	60
II.2. Transformation d' <i>Arabidopsis thaliana</i> par floral dip.....	61
II.2.1. Préparation et transformation des cellules compétentes d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ...	61
II.2.2. Préparation des plantes.....	61
II.2.3. Préparation des bactéries et transformation des plantes.....	61
II.3. Sélection et analyse moléculaire des lignées transgéniques.....	62
II.3.1. Extraction d'ADN génomique (méthode rapide pour le criblage des plantes	

transgéniques par PCR)	62
II.3.2. Extraction au Trizol des ARN totaux des plantes.....	62
II.3.3. Traitement des ARNs à la DNase.....	63
II.3.4. Transcription inverse.....	63
II.4. Analyse de l'expression des gènes.....	63
II.4.1 Extraction des ARN totaux avec le mini Kit "Qiagen RNeasy"	63
II.4.2. Quantification de l'accumulation des transcrits par q-PCR.....	64
II.4.3. Révélation de l'activité GUS.....	65
II.5. Etude de l'activité phytasique chez les lignées transgéniques.....	65
II.5.1. Préparation des extraits protéiques.....	65
II.5.2. Dosages des protéines.....	66
II.5.3. Détermination de l'activité phytasique par la méthode du bleu de molybdate.....	66
II.5.4. Détection de l'activité phytasique sécrétée par les racines des lignées transgéniques ...	67
II.6. Détermination de la teneur en phytate dans les graines d' <i>Arabidopsis</i>	67
II.7. Coloration histologique du fer au Perls/DAB.....	67
II.8. Extraction et dosage des ions.....	68
II.8.1. Extraction et dosage des anions majeurs par HPIC.....	68
II.8.2. Extraction et dosage colorimétrique du phosphate inorganique (Pi).....	68
II.8.3. Extraction et dosage de Zn.....	69
II.9. Evaluation du statut oxydatif.....	69
II.9.1. Dosage du MDA (test de peroxydation lipidique)	69
II.9.2. Détermination de la teneur en peroxyde d'hydrogène.....	69
II.9.3. Détection du peroxyde d'hydrogène par le DAB.....	70
II.9.4. Détection du superoxyde (O ₂ ^{•-}) par Nitro Blue-Tetrazolium (NBT).....	70
II.10. Dosage des chlorophylles.....	70
II.11. Détermination de la concentration de proline.....	70
II.12. Détermination des teneurs en acide ascorbique (AsA).....	71
II.13. Détermination <i>in vitro</i> des activités des enzymes antioxydantes.....	71
II.13.1. Préparation des extraits protéiques.....	71
II.13.2. Dosage de l'activité superoxyde dismutase (SOD).....	72
II.13.3. Dosage de l'activité peroxydase	72
II.13.4. Dosage de l'activité catalase.....	73
Résultats et discussion	75
Chapitre I : Etude de l'effet de la surexpression de la phytase de <i>Bacillus subtilis</i> PHYUS417 sur la capacité à améliorer la mobilisation du P à partir de l'AP chez les plantes	

d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	75
I. Effet de l'ajout de la phytase de la souche <i>Bacillus subtilis</i> US417 sur la croissance des plantes d' <i>Arabidopsis thaliana in vitro</i>	76
II. Effet de la surexpression de la phytase PHY-US417 chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	78
II.1. Production de plantes transgéniques d' <i>Arabidopsis</i> surexprimant la forme intracellulaire de PHY-US417	78
II.2. Dosage de l'activité phytasique et du taux d'AP chez les plantes transgéniques.....	80
II.3. Effet de la surexpression de PHY-US417 sur la croissance des plantes transgéniques dans des conditions de carence en P.....	81
II.4. Remobilisation du fer chez les lignées transgéniques.....	83
II.5. Effet de la surexpression de PHY-US417 sur le contenu en phosphate et en sulfate chez les plantes transgéniques.....	84
II.6. Niveau d'expression des transporteurs de SO ₄ et de Pi chez les lignées transgéniques.....	86
II.7. Effet de la surexpression de PHY-US417 sur la perception et la signalisation phosphatée	88
Conclusion.....	90

Chapitre II : Etude de l'implication de l'acide phytique dans l'interconnexion entre les voies de signalisation régulant l'homéostasie du phosphore et du zinc	91
I. Étude de la réponse des plantes à faible teneur en phytate à la carence en minéraux.....	92
II. Effets de la réduction du taux d'AP sur l'accumulation du Pi et du Zn.....	94
III. Évaluation de l'expression des transporteurs du Zn et du Pi en conditions de déficiences minérales.....	96
Conclusion.....	98

Chapitre III : Effet de la surexpression de la phytase PHYUS417 sur la tolérance des plantes d' <i>Arabidopsis</i> aux stress abiotiques.....	100
I. Etude de la réponse des lignées surexprimant PHYUS417 aux stress abiotiques.....	101
II. Evaluation de la teneur en proline et en AsA chez les lignées transgéniques surexprimant PHY soumis à un stress osmotique.....	104
III. Évaluation de l'accumulation des ROS en conditions de stress osmotique	107
IV. Etude de l'activité des enzymes antioxydantes chez les génotypes testés	108
Conclusion.....	110

Chapitre IV : La sécrétion de la phytase PHYUS417 par les racines d' <i>Arabidopsis</i> améliore la nutrition phosphatée et la croissance des plantes en co-culture.....	111
I. Production de plantes transgéniques d' <i>Arabidopsis</i> sur-exprimant la forme sécrétée	

Ext-PHY-US417 (e-PHY)	112
II. Détection et dosage de l'activité phytasique chez les plantes transgéniques ePHY.....	115
III. Effet de la surexpression de ePHY-US417 sur la réponse des plantes d' <i>Arabidopsis</i> à la carence phosphatée.....	116
IV. Effet de la sécrétion de la phytase PHY-US417 sur la croissance des plantes co-cultivées avec plantes transgéniques d' <i>Arabidopsis</i> en condition de carence phosphatée.....	118
IV.1. Tests de co-culture entre les lignées transgéniques et des plantes sauvages d' <i>Arabidopsis</i>	118
IV.2. Test de co-culture entre les lignées transgéniques d' <i>Arabidopsis</i> et des plantes sauvages de tabac.....	120
V. Analyse du potentiel des lignées transgéniques ePHY à promouvoir l'accumulation foliaire du Pi et la croissance des plantes voisines.....	122
VI. Étude de l'expression des transporteurs du Pi chez les plantes co-cultivées en présence d'AP comme seule source de Pi	123
Conclusion.....	126
Conclusions Générales et Perspectives.....	127
Références bibliographiques.....	132
Annexes	
Publications	

Résumé

La faible disponibilité du phosphore (P) constitue une contrainte majeure pour la croissance et le développement des cultures végétales à l'échelle mondiale. En fait, 95% du P total des sols agricoles existe sous forme de P organique dont le composant prépondérant est l'acide phytique (AP). Ce dernier n'est disponible pour les plantes que s'il est hydrolysé par des enzymes spécifiques appelées les phytases. Nous nous sommes intéressés ici à l'étude d'une phytase PHY-US417 de la souche US417 de *Bacillus subtilis* afin de tester sa capacité à améliorer la mobilisation du P à partir de l'AP chez les plantes. Nous avons démontré dans un premier temps que la surexpression chez *Arabidopsis* d'une forme intracellulaire de la phytase PHY-US417 entraîne une diminution de 40% du taux d'AP dans les graines. Des analyses physiologiques ont révélé que la surexpression de cette phytase améliore la croissance des plantes lors d'une carence en P, via l'augmentation du niveau intracellulaire de Pi et de sulfate. Une plus forte mobilisation du fer a été observée au cours de la germination chez ces lignées transgéniques. En outre, la perception du Pi extérieur est affectée suite à des changements dans les profils d'expression de certains gènes induits par la carence en phosphate. Ces résultats indiquent que l'AP constitue non seulement une forme de stockage de P au niveau des graines mais agit aussi comme une molécule de signalisation qui régule l'interaction entre l'homéostasie du phosphore et du sulfate.

Ces lignées transgéniques nous ont conduit à conclure aussi que l'AP et ses dérivés en inositol phosphates pourraient être aussi impliqués dans l'interconnexion entre les voies régulant l'homéostasie le P et celle du Zn. Ces derniers semblent également être des régulateur positifs de la réponse des plantes au stress osmotique et ce via une stimulation des activités antioxydantes.

Dans un deuxième temps, l'effet de la sécrétion de la phytase PHY-US417 par les racines d'*Arabidopsis* a été étudié. Les résultats obtenus ont montré que la forme extracellulaire ePHY-US417 a été capable d'hydrolyser l'AP utilisé comme seul source de Pi dans le milieu extérieur. En conséquence, ces lignées surexprimant ePHY-US417 ont une meilleure acquisition du Pi et une meilleure croissance. Enfin, cette amélioration de la croissance dans des conditions de carence en Pi a concerné aussi d'autres plantes de tabac ou d'*Arabidopsis* co-cultivées avec les lignées sécrétant la phytase ePHY-US417.

Une telle avancée montre que les phytases sécrétées pourraient avoir un fort potentiel de valorisation via le développement de nouvelles pratiques de cultures associées qui favorisent une agriculture durable en limitant l'usage intensif des engrais phosphatés.

Mots clés: phosphore, acide phytique, phytase, homéostasie, inositol phosphates, stress

Liste des Figures

Figure 1. Disponibilité du phosphore en fonction du pH de sol	5
Figure 2. Représentation d'un transporteur de Pi de la famille PHT1 ancrée dans le plasmalemme (a). (b) distribution spatiale de ces transporteurs chez <i>Arabidopsis</i> , déduite à partir des données histologiques et transcriptomiques des plantes testées sur milieu enrichi ou carencé en Pi	8
Figure 3. Les phytohormones impliquées dans les réponses des plantes à la carence en Pi, contrôlant l'architecture racinaire et l'expression des gènes induits lors de la carence phosphatée (PSI).....	15
Figure 4. Description des mécanismes de réponses mis en place pour répondre à la carence phosphatée selon une échelle arbitraire allant d'une carence courte à longue...	21
Figure 5. Voie de signalisation de la carence phosphatée.....	24
Figure 6. Structure chimique de l'acide phytique.....	28
Figure 7. Illustration schématique de la biosynthèse de l'acide phytique.....	31
Figure 8. Structure de l'acide phytique représentant les six phosphates avec les différentes possibilités d'interagir tant avec des cations métalliques qu'avec des résidus des protéines.....	33
Figure 9. Variations du métabolisme des polyphosphoinositides et des inositol phosphates en réponse à la sécheresse.....	42
Figure 10. Représentation schématique des interconnexions entre les voies de régulation impliquées dans la réponse des plantes à la carence en phosphate et en Zinc.....	44
Figure 11. Mécanisme d'action d'une phytase sur l'acide phytique.....	46
Figure 12. Effet de l'addition de la phytase PHY-US417 sur la croissance des plantes sauvages <i>Arabidopsis</i> in vitro.....	78
Figure 13. Production de plantes transgéniques surexprimant le gène <i>PHY-US417</i> ...	80
Figure 14. Dosage de la concentration de phytate à partir des graines des plantes sauvages et des deux lignées transgéniques (L7 et L9).....	81
Figure 15. Analyse de la reprise de la croissance des lignées transgéniques après leur germination dans des conditions de carence en P.....	82
Figure 16. Coloration histochimique du fer au Perls/DAB indiquant la remobilisation du fer lors de la germination chez les plantes sauvages (WT) le mutant <i>ipk1-1</i> et les deux lignées transgéniques L7 et L9.....	84

Figure 17. Effet de la surexpression du PHY-US417 sur le contenu du Pi et SO ₄ au niveau des plantes transgéniques.....	85
Figure 18. Niveaux d'expression des gènes impliqués dans le transport du Pi, sulfate, nitrate et fer chez les plantes WT, le mutant <i>ipk1-1</i> et les deux lignées transgéniques..	87
Figure 19. La surexpression du PHY US417 altère la perception et la signalisation chez les plantes d' <i>Arabidopsis</i>	89
Figure 20. Effets de la carence en Zn, en Fe et en Pi sur la croissance des génotypes étudiés (Col, <i>ipk1-1</i> , L7, L9).....	93
Figure 21. La teneur en Pi et en Zn au niveau des parties aériennes des lignées transgéniques (L7 et L9), du mutant <i>ipk1-1</i> et des plantes sauvages cultivées en conditions standard (MS) ou déficiences en P (MS-P) et en Zn (MS-Zn) pendant 20 jours.....	96
Figure 22. Analyse par RT-PCR de l'expression des transporteurs du Pi (PHT1;4 et PHO1;H3) et du Zn (ZIP4 et ZIP9) au niveau des racines des plantes sauvages (Col), transgéniques (L7 et L9) et mutantes (<i>ipk1-1</i>) en conditions standard (MS) et de carence en Pi (-Pi) et en Zn (-Zn).....	97
Figure 23. Réponse des lignées transgéniques (L7 et L9) aux stress abiotiques.....	102
Figure 24. Effet du stress abiotique sur la croissance des plantules WT, L7, L9 et <i>ipk1-1</i>	104
Figure 25. Les teneurs en proline et en AsA chez les plantes sauvages (Col), transgéniques (L7 et L9) et mutantes (<i>ipk1-1</i>) soumises ou non au stress osmotique...	106
Figure 26. Observation de la production des ROS et teneur de H ₂ O ₂ et MDA chez les plantules sauvages (Col), transgéniques (L7 et L9) et mutantes (<i>ipk1-1</i>) soumises ou non à un stress osmotique.....	108
Figure 27. Analyse de l'activité des enzymes antioxydantes SOD, CAT et POD chez les plantules sauvages (Col), transgéniques (L7 et L9) et mutantes (<i>ipk1-1</i>) soumises ou non à un stress osmotique.....	109
Figure 28. Séquences nucléotidique et protéique de la fusion Ext3-PHYUS417 (e-PHY).....	113
Figure 29. Production de plantes transgéniques sur-exprimant la forme extracellulaire du gène <i>PHY US417</i>	114
Figure 30. Détection de l'activité phytasique sécrétée par les racines des lignées	115

transgéniques d' <i>Arabidopsis</i> ePHY par le test de coloration avec le FeCl ₃	117
Figure 31. Les lignées transgéniques ePHY (e4, e5, e9) maintiennent leur croissance sur un milieu contenant l'AP comme seule source de P.....	119
Figure 32. L'amélioration de la croissance observée chez les plantes WT co-cultivées avec les transgéniques en milieu MS liquide contenant l'AP comme source de P.....	
Figure 33. Amélioration de la concentration du Pi au niveau des feuilles des plantes WT(Col) lorsqu'elles sont cultivées avec des lignées transgéniques ePHY (e4 et e5) dans un milieu contenant le phytate comme seule source de P.....	120
Figure 34. Amélioration de la croissance des plantes sauvages du Tabac co-cultivées avec les sur-expresses de ePHY (e4,e5, e9) en milieu MS liquide sans P supplémenté du phytate comme seule source de P.....	121
Figure 35. Croissance et teneurs foliaire en Pi dans les mutants <i>pht1;1</i> et <i>pht1;1-1;4</i> co-cultivées avec de les plantes sauvages d' <i>Arabidopsis</i> (Col) ou les sur-expresses ePHY.....	123
Figure 36. Analyse de l'expression des transporteurs du P, PHT1;1, PHT1;4, PHO1 et PHO1;H1 après deux semaines de co-culture entre les plantes sauvages d' <i>Arabidopsis</i> (Col) et les lignées transgéniques intégrant Vv (ev) ou ePHY (e4 et e5) en hydroponie, dans MS-P ou MS-P+0,33AP.....	124
Figure 37. Détection de l'activité GUS dans la lignée Pht1;4::GUS co-cultivées avec les lignées transgéniques (e4 et e5) ou les plantes WT (Col).....	125

Liste des Tableaux

Tableau 1. Exemple de gènes impliqués dans la régulation de l'architecture racinaire et les mutants qui leur sont associés ayant une architecture racinaire altérée en réponse à une carence en P.....	10
Tableau 2. Les principaux gènes induits par la carence en P répartis en différentes classes fonctionnelles.....	18
Tableau 3. Exemples de mutants <i>lpa</i> isolés de différentes espèces végétales et leurs principales caractéristiques.....	35
Tableau 4. L'activité phytasique secrétée et le contenu en Pi libéré au niveau des exsudats racinaires des plantes sauvages et des lignées transgéniques. L'activité phytase a été déterminée entre le jour 10 et le jour 12 de croissance en milieu liquide.	116



Introduction Générale

Introduction générale

Le phosphore (P) représente l'un des éléments nutritifs les plus limitant pour la production agricole mondiale. Cette limitation en P est liée à sa forte adsorption aux éléments minéraux du sol, ce qui le rend ainsi très peu disponible pour les plantes notamment dans les sols calcaires méditerranéens où sa rétention est élevée.

Les plantes absorbent le P par leurs racines principalement sous forme d'ions orthophosphate H_2PO_4^- et HPO_4^{2-} (Nussaume *et al.*, 2011). Cette fraction inorganique du phosphore (Pi) varie d'un sol à un autre mais reste faible (Marschner, 1995; Poirier et Bucher, 2002 ; Hinsinger, 2001), ce qui explique le recours à la fertilisation minérale. Chaque année, une grande quantité d'engrais phosphatés est appliquée aux terres cultivables mais seulement 10 à 20% du P ajouté est prélevé par la plante (Halford, 1997). Le reste est rapidement fixé en fractions inorganique et organique très peu disponibles pour les racines des plantes (Richardson *et al.*, 2001 ; Vance *et al.*, 2003). De ce fait, l'année suivante une nouvelle fertilisation sera requise (Miles et Sistani, 2002) et le P non absorbé qui augmente dans l'environnement d'une année à l'autre finit par contaminer les cours d'eau et les lacs générant ainsi des sérieux problèmes d'eutrophisation. Le phénomène d'eutrophisation constitue aujourd'hui une menace sérieuse sur les écosystèmes aquatiques dans le monde (Vollenweider, 1968; NRC, 1993; Nixon, 1995; Bennett *et al.*, 2001; Garnache *et al.*, 2016).

D'autre part, la forme de P majoritaire dans le sol est une forme organique (Po) dont plus de la moitié existe sous forme d'acide phytique (*myo*-inositol 1,2,3,4,5,6 hexakisphosphate ; InsP_6) (Iyamuremye et Dick 1996; Mudge *et al.*, 2003) mais qui constitue cependant une molécule de stockage de P non assimilable directement par les plantes. L'acide phytique (AP) est introduit dans le sol par les résidus des végétaux et par les fumiers des animaux (Dao, 2004; Toor *et al.*, 2005 ; Dao, 2007). Il constitue ainsi un immense réservoir et selon Mullaney et Ullah, (2007) le P-phytique représente environ 67% du phosphate utilisé comme fertilisants à l'échelle mondiale, ce qui reflète son importance quantitative dans le cycle du P dans le sol. En outre, l'AP représente la forme majeure de stockage du P dans les plantes et principalement dans les grains de céréales (> 75% de la quantité totale du P) (Raboy, 2009) qui sont aussi les principaux ingrédients utilisés en alimentation animale. Néanmoins, l'AP n'est pas disponible pour les animaux monogastriques et possède des propriétés anti-nutritionnelles vu son fort pouvoir chélateur, d'où la nécessité de supplémenter les aliments de ces animaux en P inorganique (Pi) pour subvenir à leurs besoins en P.

Une telle situation entraîne une forte accumulation dans le sol de P provenant des fientes, très chargées en P, excrétées par les animaux. Cette forte accumulation, notamment dans les zones d'élevage intensif d'animaux monogastriques, pose elle aussi de sérieux problèmes de pollution de l'environnement comme l'eutrophisation des cours d'eau (Raboy, 2001).

Face à cette situation nous devons être conscients de l'utilité de raisonner/diminuer l'apport des fertilisants phosphatés et surtout d'améliorer leur efficacité. Le fait de rendre le stock de phytate (présent dans le sol ou dans les graines) accessible que ce soit pour les plantes ou pour les animaux monogastriques va améliorer la disponibilité du Pi et aussi libérer d'autres éléments minéraux qui sont liés à celui-ci par chélation sans recours à l'ajout d'engrais phosphatés.

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre travail de recherche qui porte essentiellement sur l'amélioration de la biodisponibilité du Pi provenant de l'AP par son hydrolyse grâce à des enzymes spécialisées appelées phytases. Ceci nécessite d'avoir une vision claire sur les mécanismes qui régulent l'homéostasie du Pi et des interactions éventuelles avec d'autres macro- et micro-éléments.

Ainsi, nous nous sommes intéressés ici à investiguer le potentiel d'une nouvelle phytase d'origine bactérienne isolée de la souche *Bacillus subtilis* US417 (Farhat *et al.*, 2008) dans l'amélioration de la nutrition phosphatée et la croissance des plantes. Pour cela, nous avons fixé comme objectifs de tester l'effet de la surexpression de cette phytase sur la capacité à améliorer la mobilisation du P à partir de l'AP chez les plantes d'*Arabidopsis thaliana*, et d'autre part, d'investiguer l'implication de l'AP en tant que molécule signal dans le contrôle de la régulation de l'homéostasie du P et celle d'autres éléments minéraux mais aussi dans la réponse aux stress environnementaux.

Pour aborder ces objectifs nous avons adopté la stratégie suivante :

- Tout d'abord nous avons testé l'effet de l'ajout de la phytase PHY-US417 dans le milieu sur la croissance des plantes d'*Arabidopsis thaliana*, dans des conditions de carence en P. En parallèle, nous avons généré des plantes transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* surexprimant cette phytase dans le but d'évaluer son implication dans la mobilisation du P à partir de l'AP et de tester la réponse de ces plantes à la carence phosphatée.
- Dans un second temps, j'ai testé la réponse des plantes transgéniques qui sur-expriment la forme intracellulaire face à la carence d'autres minéraux en particulier le zinc et le fer pour

comprendre la signification biologique des interactions entre les voies de signalisation du phosphore et du zinc chez les plantes via le taux cellulaire du phytate.

- Ultérieurement, on s'est intéressé à tester la réponse des plantes transgéniques d'*Arabidopsis* à des stress abiotiques (salin et osmotique). Ceci nous a paru très attrayant puisque l'augmentation de l'activité phytasique chez les plantes transgéniques est corrélée avec la réduction du taux d'AP et éventuellement avec la perturbation du pool des inositol phosphates.

- Dans une dernière partie, nous nous sommes intéressés à générer des plantes transgéniques d'*Arabidopsis* surexprimant la forme secrétée ePHY-US417 dans le but d'étudier la capacité de cette phytase à mobiliser le Pi à partir du phytate présent dans le milieu extérieur.



Synthèse Bibliographique

Synthèse Bibliographique

I. le phosphore

I.1. Importance du phosphore

Le phosphore (P) est un macronutriment essentiel pour la croissance et le développement de tous les organismes vivants. Il entre dans la composition des acides nucléiques (ADN, ARN), des phospholipides membranaires, des phosphoprotéines et des sucres ce qui lui confère un rôle structural fondamental. Fonctionnellement, il est essentiel dans le stockage de l'énergie cellulaire via les liaisons anhydres entre les groupements phosphate riche en énergie (notamment l'ATP). En outre, il est impliqué dans de nombreux processus biologiques comme la photosynthèse, la respiration, et est un composant essentiel dans les cascades de transduction de signal et dans la régulation de l'activité enzymatique via la phosphorylation (Marschner, 1995; Poirier et Bucher, 2002; Rausch et Bucher, 2002; Plassard *et al.*, 2015).

Le P est, après l'azote, le deuxième macro-élément limitant la croissance des végétaux (Abel *et al.* 2001; Barrow, 1963). Sa carence affecte la croissance et le développement et engendre des pertes de rendements (Tisdale et Nelson, 1975; Marschner, 1989).

I.2. Le phosphore dans le sol et sa biodisponibilité

La quantité de P présente dans un sol ne reflète pas vraiment l'aptitude du sol à fournir cet élément aux végétaux et à satisfaire leurs exigences. En raison des interactions électrostatiques qu'il forme avec les particules du sol et la séquestration à la surface des argiles, le P est considéré comme l'ion majeur le moins disponible (Raghothama, 1999). En fait, seul le Pi (phosphate inorganique) présent sous formes d'ions orthophosphates (H_2PO_4^- et HPO_4^{2-}) est directement assimilable par les racines des plantes. La majeure partie du P total du sol (jusqu'à 80%) se trouve sous forme organique, insoluble ou fixée très peu disponible pour la plante. La présence de chacune de ces formes et la disponibilité du P dépendent du pH (Figure 1), de la texture et de l'activité biologique du sol.

Dans les sols alcalins (sols ayant un $\text{pH} > 7$), l'ion dominant réagissant avec le phosphate est le calcium. Dans les sols acides, entre $\text{pH} 5,5$ et 6 le P tend à être fixé par l'aluminium alors qu'à un pH inférieur à $5,5$ le P est fixé par le fer. Les composés résultant de ces réactions sont assez insolubles (phosphates de Ca, de Fe ou d'Al) (Busman *et al.*, 2002). Le P n'est disponible directement que dans un écart étroit de pH , $6,2$ à 7 (Lindsay, 1979) qui représente un faible pourcentage des sols dans le monde.

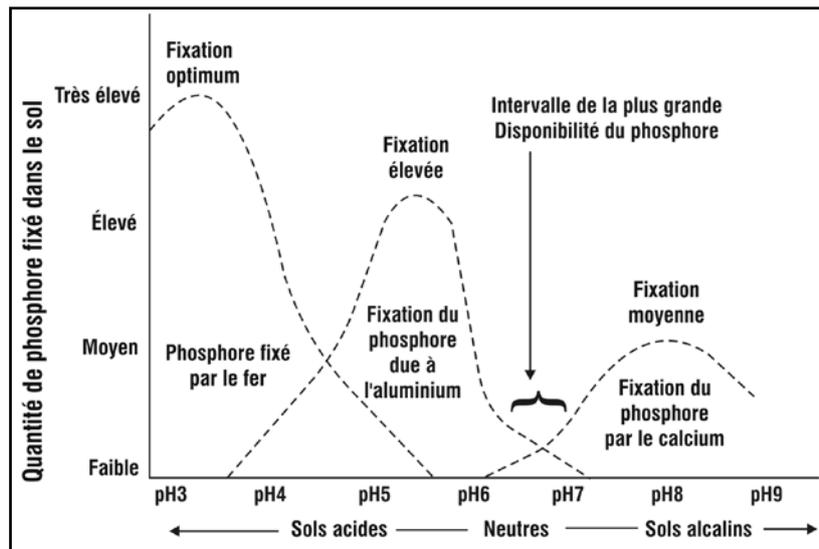


Figure 1 : Disponibilité du phosphore en fonction du pH de sol (adapté de Busman *et al.* 2002)

I.3. L'Absorption du Pi :

La concentration du Pi dans la solution du sol ne dépasse pas 10 μM (Bielecki, 1973; Hinsinger, 2001), tandis qu'elle est 1000 fois plus élevée dans la plupart des cellules végétales (1 à 10 mM; Raghothama, 1999). Ceci montre qu'il est absorbé contre son gradient de concentration par des systèmes de transport actif (Bielecki et Ferguson, 1983).

Chez les plantes, ces systèmes de transport actif sont régis par des transporteurs de phosphate à haute affinité permettant l'absorption du Pi lorsqu'il est présent en faible concentration dans le milieu extérieur (de l'ordre de μM) et par des transporteurs de phosphate à basse affinité opérant à des concentrations de P de l'ordre du mM.

Les transporteurs de P ont été identifiés pour la première fois chez la levure (Persson *et al.*, 2003). PHO84 et PHO89 sont décrits comme étant des transporteurs à haute affinité (Bun-ya *et al.*, 1991; Martinez et Persson, 1998) qui sont respectivement H^+ et Na^+ dépendants. Cette différence est encore utilisée pour la classification des transporteurs chez les plantes. En effet, les symports $\text{Pi}:\text{H}^+$ sont associés à la famille PHT1, alors que les symports $\text{Pi}:\text{Na}^+$ à la famille PHT2 (Casieri *et al.*, 2013).

Les transporteurs à haute affinité :

Les transporteurs à haute affinité (PHT1) sont des protéines membranaires qui assurent le transfert du Pi vers le cytoplasme des cellules racinaires lorsque le milieu extérieur est déficient en P.

L'expression hétérologue des transporteurs de Pi appartenant à la famille PHT1 chez la levure a montré une affinité modérée à haute pour le Pi. Les Km enregistrés dans la levure sont loin de ceux enregistrés dans les analyses cinétiques *in planta*. Il est donc fort probable que la caractérisation en système hétérologue de ces transporteurs fournit une image altérée de leurs performances réelles *in situ*, à cause probablement de l'absence d'interaction avec des protéines partenaires homologues (Leggewie et al., 1997; Daram et al., 1998; Guo et al., 2007).

Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, la famille PHT1 est constituée de 9 membres (*PHT1;1* à *PHT1;9*) ayant une forte similarité de séquences (de 60 à 95%). Leurs homologues ont été identifiés chez plusieurs espèces cultivées comme le riz, blé, la pomme de terre, la tomate et le tabac (Okumura et al., 1998 ; Poirier et Bucher, 2002 ; Rausch et Bucher, 2002; Nussaume et al., 2011). Ces transporteurs appartiennent à la famille des PHS (Pi:H⁺ symporter) eux-mêmes membres de la superfamille MFS (Major Facilitator Superfamily) (Poirier et Bucher, 2002). Tous ces transporteurs présentent douze domaines transmembranaires séparés en deux groupes de six par une large région hydrophile qui est une caractéristique commune à de nombreuses protéines impliquées dans le transport des ions, des sucres ou des acides aminés (Raghothama, 1999) (**Figure 2**).

Des études d'expression (Mudge et al., 2002; Misson et al., 2005) et l'utilisation de gènes rapporteurs (GUS, GFP) couplés aux promoteurs de différents membres de la famille PHT1 (Raghothama et Karthikeyan, 2005, Mudge et al., 2002) ont permis d'identifier précisément les organes dans lesquels ces gènes s'expriment. Il a été démontré que la majorité des transporteurs de la famille PHT1 semblent préférentiellement être exprimées dans les racines, ce qui est en accord avec leur rôle majeur dans l'absorption du Pi à partir du sol. Leur accumulation est concentrée dans les cellules de l'épiderme racinaire et le cylindre central et en particulier au niveau des poils absorbants (Karthikeyan et al., 2002; Mudge et al., 2002; Misson et al., 2004; Koyama et al., 2005; Xiao et al., 2006; Hirsch et al., 2011). La perturbation de l'expression des membres de la famille PHT1 affecte l'acquisition du Pi. Par exemple le simple (*pht1;4*) et le double mutant (*pht1;1-1;4*) montrent une capacité réduite d'absorption du Pi accumulant ainsi moins de Pi dans leurs tiges (Misson et al., 2004 ; Shin et al., 2004).

Certains membres de la famille PHT1 sont également localisés dans d'autres tissus de divers organes et se chevauchent entre eux (**Figure 2**), ce qui suggère une grande complexité dans leurs rôles (Nussaume et al., 2011). Cette localisation est souvent influencée par les facteurs

environnementaux ou de développement. Par exemple, l'expression du transporteur *AtPHT1;6* au niveau des grains de pollen pourrait révéler son implication dans le développement des fleurs (Nussaume *et al.*, 2011). Une mutation du gène *PHT1;5* confirme son implication lors de la sénescence des feuilles et révèle son rôle dans la mobilisation des réserves du Pi des organes sources (les feuilles matures ou sénescentes) vers des organes puits (les jeunes feuilles et les inflorescences) (Nagarajan *et al.*, 2011).

Les transporteurs à faible affinité :

Comme déjà mentionné, les transporteurs à haute affinité sont inductibles par le manque de P, tandis que les transporteurs à faible affinité (*PHT2* et *PHT3*) sont constitutifs (Marschner, 1995). Ces transporteurs membranaires contrôlent le flux du Pi entre les chloroplastes (*PHT2*), les mitochondries (*PHT3*), les vacuoles et le cytoplasme selon la demande métabolique (Rausch et Bucher, 2002 ; Raghothama et Karthikeyan, 2005).

Le premier de ces transporteurs *PHT2;1* a été caractérisé chez *Arabidopsis thaliana*. Ce gène code pour une protéine qui possède une structure similaire à celle des *PHT1*. En revanche, cette protéine est principalement exprimée dans les tissus chlorophylliens (Daram *et al.* 1999) et pourrait fonctionner en association avec les transporteurs trioses:phosphate dans le but de mobiliser le Pi le long de la membrane chloroplastique (Raghothama et Karthikeyan 2005).

La majeure partie du Pi absorbé par les racines grâce aux transporteurs de type *PHT1* est chargé dans le xylème pour qu'il soit transféré jusqu'aux parties aériennes. Chez le riz, deux transporteurs de P, *OsPHT1;2* et *OsPHT1;6* ayant des propriétés cinétiques différentes sont impliqués dans la translocation du Pi des racines vers les feuilles (Ai *et al.*, 2009). Un transporteur spécifique *PHO1*, contribue également à la translocation à travers le chargement du Pi dans le xylème. Son implication avait été déduite de l'étude d'un mutant *pho1* d'*Arabidopsis*, dont les feuilles sont constitutivement carencées en phosphate (Poirier *et al.*, 1991).

Une fois dans les cellules des parties aériennes, le Pi peut être pris en charge par les transporteurs de type *PHT2* et *PHT3* pour son transfert vers les chloroplastes et les mitochondries.

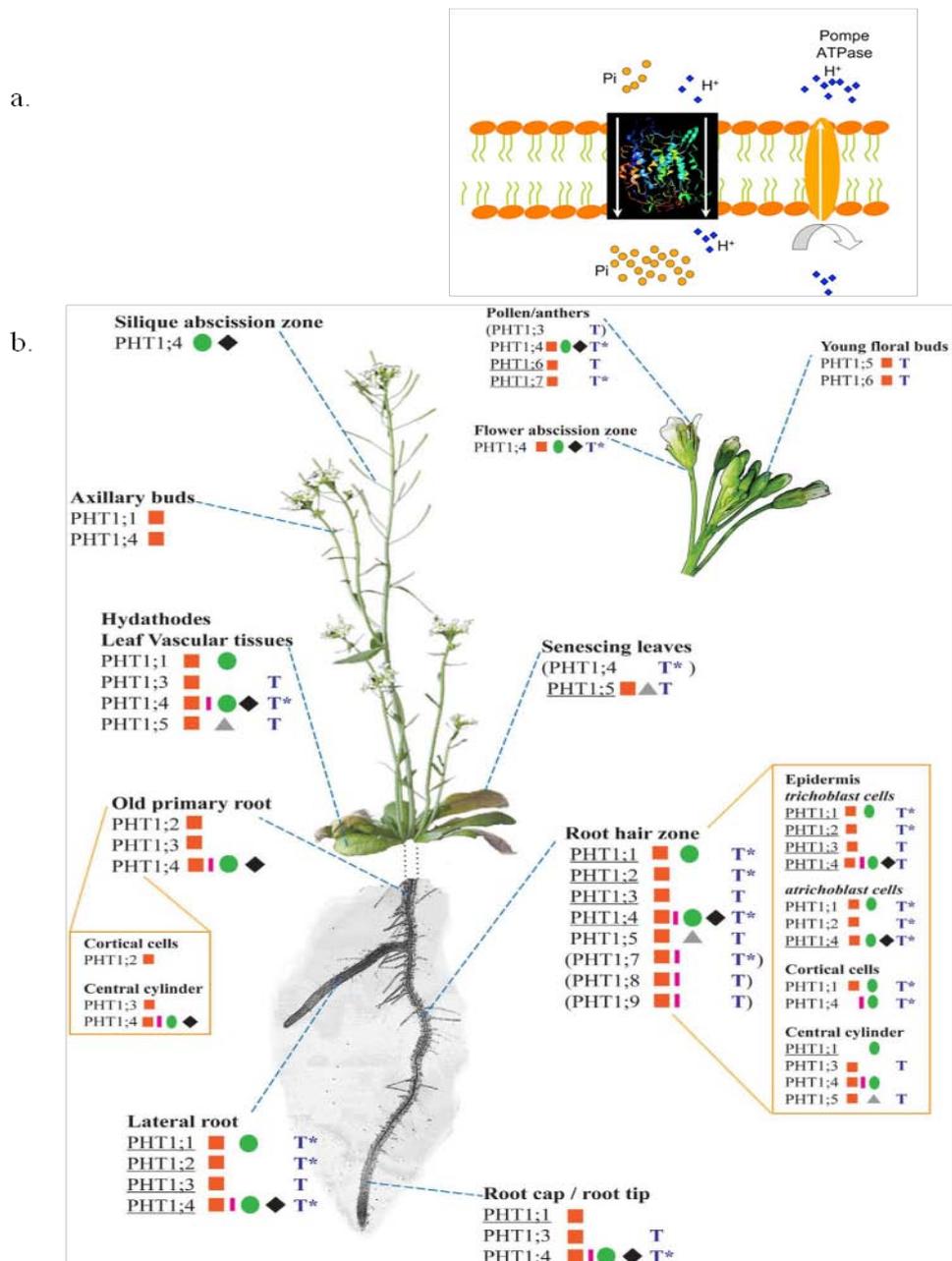


Figure 2 : Représentation d'un transporteur de Pi de la famille PHT1 ancrée dans le plasmalemme (a). L'énergie nécessaire au système actif, est obtenue par une pompe ATPase qui forme un gradient de protons. Les protons sont transportés dans la même direction que le Pi à travers le transporteur. (b) distribution spatiale de ces transporteurs chez *Arabidopsis*, déduite à partir des données histologiques et transcriptomiques des plantes testées sur milieu enrichi ou carencé en Pi (d'après Nussaume *et al.*, 2011)

I.4. Les réponses adaptatives des plantes à une carence en Pi

Les plantes développent des stratégies adaptatives pour pouvoir faire face au stress dû au manque de P. Ces réponses adaptatives visent à améliorer l'acquisition et le prélèvement des ressources du P existant dans l'environnement extérieur (Baldwin *et al.*, 2001; Karthikeyan *et al.*, 2002) et à optimiser et mobiliser le Pi interne (Raghothama, 1999; Vance *et al.*, 2003; Cruz-Ramírez *et al.*, 2006).

I.4.1. Adaptation de l'architecture racinaire :

La plasticité de l'architecture racinaire est un processus important pour répondre aux variations de la disponibilité en P, que ce soit un enrichissement local ou une carence en P. En général, les plantes répondent à la carence en P en allouant plus de carbone aux racines, ce qui augmente le ratio partie racinaire/partie aérienne (Hermans *et al.*, 2006). En outre, la faible disponibilité du Pi modifie considérablement la configuration spatiale (l'architecture) du système racinaire en augmentant l'élongation des racines latérales et la densité des poils absorbants (Föhse *et al.*, 1991; Bates et Lynch, 1996; López-Bucio *et al.*, 2002) tandis que la racine primaire montre une diminution voire un arrêt de croissance (Lynch et Brown, 2008; Vance, 2008; López-Bucio *et al.*, 2003; Péret *et al.*, 2011). Ces changements morphologiques permettent d'explorer un volume de sol plus large et d'améliorer l'absorption des éléments peu mobiles comme le Pi (Williamson *et al.*, 2001; López-Bucio *et al.*, 2002).

Chez *Arabidopsis*, les réponses adaptatives sont bien documentées. L'inhibition de la croissance de la racine primaire est causée par la répression de l'élongation cellulaire suivie par l'arrêt progressif de la prolifération des cellules méristématiques. Plusieurs mutants d'*Arabidopsis*, avec des réponses architecturales altérées en conditions déficientes en P ont été isolés, comme *pdr2*, *lpr1* et *lpr2* (Reymond *et al.*, 2006, Svistoonoff *et al.*, 2007, Ticconi *et al.*, 2004; Ticconi *et al.*, 2009). Les gènes *LPR1* et *LPR2* (low phosphate root1 et 2) codent pour des oxydases à cuivre. Lorsque leur expression est réprimée, les mutants répondent par une croissance moins altérée de la racine primaire à la carence phosphatée. Par contre le mutant *pdr2* (*phosphate deficiency response 2*) est caractérisé par une racine primaire très courte vu la perte de l'activité du méristème apical racinaire et forme beaucoup plus de racines latérales par rapport aux plantes sauvages en condition de carence. *PDR2* code une ATPase de Type 5 (*AtP5A*) fonctionnelle au niveau du réticulum endoplasmique et nécessaire pour le maintien de l'expression du *SCR* (*SCARECROW*), qui est un régulateur clé du développement racinaire (Sabatini *et al.*, 2003; Ticconi *et al.*, 2004 et 2009). Le double mutant *lpr1, lpr2* (the insensitive *lpr1, lpr2* mutations) empêche l'inhibition de la croissance de la racine primaire

et supprime le phénotype hypersensible du mutant *pdr2*, ce qui indique que ces gènes agissent dans la même voie (**Figure 3**). En fait il est démontré que LPR1 et PDR2 interagissent au niveau du réticulum endoplasmique de la pointe racinaire permettant ainsi de réguler l'activité du méristème racinaire et d'ajuster le fonctionnement correct de ce dernier en fonction des teneurs externes en P (Svistoonoff *et al.*, 2007 ; Ticconi *et al.*, 2009).

Parallèlement à l'effet sur la croissance de la racine primaire, la carence phosphatée affecte la formation de racines latérales. Dans ce cas, les plantes sont confrontées à un dilemme : maximiser l'efficacité de l'utilisation du P et promouvoir l'exploration du sol. Par conséquent, l'absence du Pi déclenche la réduction de la croissance des racines primaires conformément à la limitation métabolique tandis qu'en même temps, les programmes génétiques vont induire le développement de nouveaux organes favorisant ainsi la formation et l'élongation des racines latérales (Péret *et al.*, 2014).

La carence phosphatée stimule également le développement et l'élongation des poils absorbants. En effet, la densité des poils absorbants est élevée de 5 fois lors d'une déficience (Ma *et al.*, 2001). Des études anatomiques ont indiqué que la formation excessive de poils absorbants résulte de l'augmentation du nombre de cellules épidermiques qui se différencient en trichoblastes (Ma *et al.*, 2001; López-Bucio *et al.*, 2003).

Plusieurs gènes sont impliqués dans la régulation des changements de l'architecture racinaire en fonction du statut externe du Pi comme le montre le tableau ci-dessous.

Tableau 1: Exemple de gènes impliqués dans la régulation de l'architecture racinaire et les mutants qui leur sont associés ayant une architecture racinaire altérée en réponse à une carence en P (D'après Péret *et al.*, 2011 ; Niu *et al.*, 2012)

Gène	Fonction	Phénotype du mutant	Références
Racine principale			
<i>LPI1, LPI2</i>	signalisation de la carence en Pi	la croissance des racines primaires est maintenue	Sánchez-Calderón <i>et al.</i> (2006)
<i>PDR2</i>	ATPase de Type 5 signalisation de la carence en Pi	phénotype hypersensible : racine primaire très courte	Ticconi <i>et al.</i> (2004)
<i>LPR1, LPR2</i>	oxydases à cuivre	la croissance des racines primaires est maintenue	Svistoonoff <i>et al.</i> (2007)
<i>PHR1</i>	facteur de transcription de type MYB	une faible réduction du ratio racine/feuille	Rubio <i>et al.</i> (2001) Bustos <i>et al.</i> (2010)
<i>SIZ1</i>	enzyme de type E3 SUMO ligase / signalisation de l'auxine	hypersensible : arrêt de la croissance des racines primaires	Miura <i>et al.</i> (2005, 2011)

Racines latérales			
<i>LPR1</i>	Hormone-like signalling	réduction du développement des racines latérales	López-Bucio et al. (2005)
<i>SIZ1</i>	enzyme de type E3 SUMO ligase / signalisation de l'auxine	augmente le nombre des racines latérales	Miura et al. (2005, 2011)
<i>PDR2</i>	ATPase de Type 5 signalisation de la carence en Pi	ramification intense des racines latérales	Ticconi et al. (2004)
<i>PNP</i>	Ribonuclease polynucleotide phosphorylase	racines latérales très ramifiées	Marchive et al. (2009)
<i>GIN2</i>	Signalisation de sucre	réduction du nombre des racines latérales	Karthikeyan et al. (2007)
<i>WRKY 75</i>	facteur de transcription	augmente la croissance des racines latérales	Devaiah et al. (2007a)
<i>ARF7/ ARF19</i>	signalisation auxinique	plus de racines latérales	Pérez -Torres et al. (2008)
Poils absorbants			
<i>bHLH32</i>	facteur de transcription	augmentation de la formation des poils absorbants	Chen et al. (2007)
<i>FBX2</i>	signalisation de la carence en Pi	augmentation de la croissance et la formation des poils absorbants	Chen et al. (2008)
<i>IPK</i>	Inositol Polyphosphate Kinase biosynthèse du phytate	formation constitutive des poils absorbants	Stevenson-Paulik et al. (2005)
<i>UBP14/PER1</i>	protéase de l'ubiquitine	inhibition de la croissance des poils absorbants	Li et al. (2010)
<i>HSP2</i>	signalisation d'éthylène	augmentation de la formation des poils absorbants	Lei et al. (2011)
<i>GAI,3</i>	signalisation de l'acide gibbérellique	réduction de la longueur des poils absorbants	Jiang et al. (2007)
<i>PHR1/PHL1</i>	facteur de transcription de type MYB signalisation de la carence en Pi	la longueur des poils absorbants est affectée	Bustos et al. (2010)
<i>PHR1</i>	facteur de transcription de type MYB signalisation de la carence en Pi	augmentation de la longueur des poils absorbants	Bustos et al. (2010)
<i>SIZ1</i>	enzyme de type E3 SUMO ligase / signalisation de l'auxine	augmentation du nombre des poils absorbants	Miura et al. (2005)
<i>WRKY 75</i>	facteur de transcription	production constitutive des poils absorbants	Devaiah et al. (2007)
<i>RSI4</i>	facteur de transcription	formation de poils absorbants trop courts	Yi et al. (2010)

Chez certaines plantes adaptées à croître dans des sols pauvres en P, tels que les Proteaceae et les lupins blancs, on constate la formation de racines protéoïdes (ou cluster roots) (Alexova et Millar, 2013). Ces structures caractéristiques sont issues de l'induction d'un très grand nombre de racines secondaires ou tertiaires organisées de manière dense et portant de nombreux poils absorbants (Johnson et al., 1996; Watt et Evans, 1999; Skene, 2000; Shane et Lambers, 2005; Shu et al., 2005; Lambers et al., 2006). Ces racines protéoïdes sont spécialisées dans l'exsudation en grande quantité d'enzymes et d'acides organiques qui vont acidifier le sol et chélater les ions métalliques afin de mobiliser le P et d'autres éléments (Abdolzadeh et al., 2010).

Les monocotylédones semblent présenter des modifications architecturales moins marquées ou même différentes de celles observées chez les dicotylédones (Péret et al., 2014). Par exemple, la carence en Pi stimule légèrement la croissance de la racine primaire chez le maïs (*Zea mays*; Li et al., 2012) et le riz 'Japonica' (Zhou et al., 2008; Dai et al., 2012), bien que certaines études soient contradictoires (Yang et al., 2014). Ceci peut être attribué à la différence entre les cultivars utilisés ou dans les conditions expérimentales. Concernant la formation des racines latérales en conditions limitantes en Pi, elle est inhibée chez les jeunes plants de maïs (Li et al., 2012), tandis que les plantules de riz produisent autant de racines latérales (Li et al., 2000).

Rôles des phytohormones dans la régulation de l'architecture racinaire induite par la carence en P

Les phytohormones jouent des rôles multiples dans la régulation de divers processus de développement chez les plantes. Parmi celles-ci certaines sont également impliquées dans les réponses des plantes à la carence en Pi. En fait, il a été démontré par des études transcriptomiques que la carence en Pi affecte le niveau d'expression des gènes impliqués dans la synthèse de ces hormones (Misson et al., 2005 ; Hammond et al., 2003). De même l'étude des mutants hormonaux d'*Arabidopsis* montre l'existence d'un lien génétique entre les changements de l'architecture racinaire dans le cas d'une déficience phosphatée et l'action des phytohormones (Vance et al., 2003) (Figure 3).

L'auxine intervient dans la modulation du développement racinaire des plantes lors d'une déficience phosphatée (Rubio et al., 2009). Une application d'auxine exogène entraîne l'inhibition de la croissance de la racine primaire, stimule celle des racines secondaires ainsi

que la formation des poils absorbants. Ces modifications sont similaires à celles observées chez des plantes carencées en P (Al-Gazi *et al.*, 2003; Nacry *et al.*, 2005; Grieneisen *et al.*, 2007). En effet la déficience en P induit l'expression du TIR1 (Transporteur Inhibitor Response 1) le récepteur d'auxine qui stimule la dégradation des répresseurs transcriptionnels Aux/IAA, permettant ainsi aux ARF (Auxin Response Factors) de se fixer aux éléments cis-régulateurs de type AuxRE présents au niveau des promoteurs de ces gènes cibles (Ulmasov *et al.*, 1999) ce qui active leur transcription et favorise la formation des racines latérales (Pérez-Torres *et al.*, 2008). De plus l'altération d'un transporteur d'auxine chez le lupin blanc réduit la formation des racines protéoïdes (Gilbert *et al.*, 2000). Par conséquent, le développement de ces racines en cas de carence en P est également lié à l'auxine (Niu *et al.*, 2013).

D'autre part, Jiang *et al.*, (2007) ont démontré que les gibbérellines (GA) modulent les changements de l'architecture racinaire et l'accumulation des anthocyanes via la voie de signalisation GA/DELLA mais sans intervenir dans la régulation de l'efficacité de l'absorption du Pi et l'expression des gènes inductibles par la carence en Pi. Les protéines DELLA répriment la croissance des plantes en cas de stress, tandis que les GA la favorisent en stimulant la dégradation des DELLA. Lors d'une carence phosphatée, l'augmentation des protéines DELLA suite à la diminution du taux de formes actives de GA dans les racines est impliquée dans l'inhibition de la croissance et l'élongation de la racinaire primaire. De plus, l'application de GA exogène ou des mutations au niveau des protéines DELLA (GAI, RGA, RGL chez *Arabidopsis*) entraînent la répression des réponses architecturales adoptées en cas de stress par manque de P (Jiang *et al.*, 2007). Ainsi les GA semblent exercer un effet négatif sur les réponses des plantes à la carence phosphatée.

L'éthylène semble également être impliqué dans les réponses à une carence en phosphate. Comme décrit précédemment, l'une des réponses de la carence en Pi est l'accroissement de la biomasse racinaire. Or cet effet est annulé par l'aminooxyvinylglycine (AVG) qui est un inhibiteur de l'éthylène endogène (Borch *et al.*, 1999). De même, un mutant *eto3* d'*A. thaliana* surproduisant de l'éthylène, présente un phénotype de plante carencée en phosphate quelque soit la teneur en phosphate dans le milieu de culture (Schmidt, 2001). En revanche, des études sur des mutants des voies de signalisation de l'ACC (1-aminocyclopropane-1-acide carboxylique), le précurseur de l'éthylène, ont montré que cette hormone n'était pas directement impliquée dans la formation des racines latérales (Lopez-Bucio *et al.* 2002). Plusieurs indices prouvent que l'éthylène stimule la biosynthèse d'auxine, et que l'interaction

synergique entre eux module la croissance racinaire et le développement des poils absorbants (Osmont *et al.*, 2007; Stepanova et Alonso, 2009).

Quant à l'acide abscissique (ABA), il ne semble pas jouer un rôle majeur dans la régulation des réponses à un stress phosphaté (Trull *et al.*, 2007), bien qu'il soit impliqué dans la répression des gènes induits par une carence en P comme *AtPHO1*, *AtPHO1;H1*, *AtPHT1*, *At4* et *AtIPSI* (Shin *et al.*, 2006; Ribot *et al.*, 2008).

Récemment, il a été démontré que les strigolactones (SLs) sont impliquées dans de nombreux processus développementaux comme la régulation du développement des racines (Czarnecki *et al.*, 2013; Koltai, 2013) et le contrôle de la ramification des parties aériennes (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008). Ces phytohormones interviennent de façon locale ou systémique pour réguler l'acclimatation des plantes face à la carence phosphatée (Czarnecki *et al.*, 2013; Mayzlish-Gati *et al.*, 2012). Chez *A. thaliana*, en condition de carence phosphatée la quantité de strigolactones produites augmente et cela est corrélé avec la réduction de la ramification des parties aériennes et la stimulation développement des racines latérales et des poils absorbants permettant un meilleur accès aux ressources nutritives du sol (Kohlen *et al.*, 2011). Ceci corrobore la baisse de la densité des poils absorbants et de l'expression des gènes induits par la carence phosphatée (PSI) chez le mutant *max4* d'*Arabidopsis* déficient dans la production de strigolactones en condition de carence en P. De manière attendue, un traitement exogène avec GR24 (analogue de synthèse des strigolactones) permet de corriger ces perturbations. De plus, chez les mutants *max4* et *max2* (mutant dans la voie de signalisation des strigolactones) le phénotype de carence phosphatée a pu être restauré par l'ajout d'IAA. Ces résultats suggèrent que les strigolactones sont impliquées non seulement dans la perception et la signalisation de la carence phosphatée mais aussi dans les processus de développement, probablement grâce à l'interaction avec l'auxine (Mayzlish-Gati *et al.*, 2012).

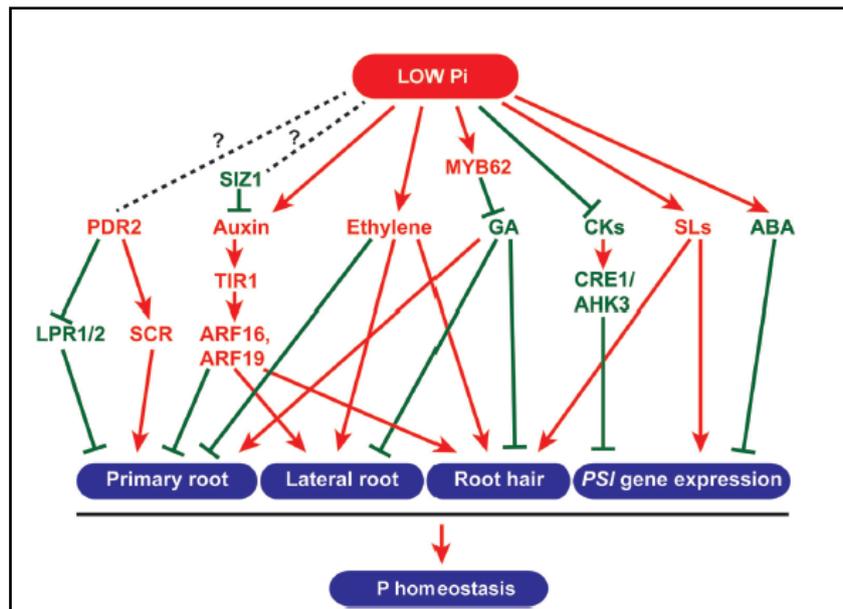


Figure 3 : Les phytohormones impliquées dans les réponses des plantes à la carence en Pi, contrôlant l'architecture racinaire et l'expression des gènes induits lors de la carence phosphatée (PSI). Les niveaux d'auxine, d'éthylène et de SLs sont induits par la carence en Pi et agissent en tant que régulateurs positifs des voies de signalisation de la carence en Pi. Les niveaux GA et CKs diminuent par la faible disponibilité du Pi et fonctionnent comme des régulateurs négatifs des voies de signalisation de la carence en Pi. L'ABA est induit dans les conditions de carence en Pi mais agit en réprimant l'expression des gènes induits par la carence phosphatée (PSI). PDR2 et LPR1/2 agissent en promouvant et inhibant la croissance des racines primaires dans les conditions limitant en Pi, respectivement (D'après Zhang *et al.*, 2014).

I.4.2 La mycorhization

Une autre stratégie adoptée par les plantes est de promouvoir les associations symbiotiques avec les microorganismes du sol comme les champignons mycorhiziens afin de bénéficier de leur forte capacité à acquérir le Pi lors d'une carence phosphatée (Péret *et al.*, 2009, Smith et Smith, 2011). Ces champignons mycorhiziens garantissent une surface d'absorption supplémentaire puisqu'ils permettent aux plantes d'accéder au Pi situé au-delà de la zone d'épuisement (créé autour des racines), grâce à leur mycélium extra-racinaire composé d'hyphes très fins et plus longs que les poils absorbants (environ plus de 100 fois) (Javot *et al.*, 2007). En retour, ces champignons reçoivent des composés carbonés directement assimilables de la part des plantes hôte.

Les champignons mycorhiziens sont capables aussi de dégrader des molécules organiques du sol pour libérer du Pi et possèdent des transporteurs de Pi à haute affinité (Harrison et Van Buuren, 1995; Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001) leur permettant de mieux récupérer le Pi externe. Les ions Pi ainsi absorbés par les hyphes sont transférés vers la racine et sont prélevés grâce à des systèmes de transport induits par mycorhization (Smith et Read, 2008).

Les plantes peuvent alors varier les stratégies en élaborant des associations symbiotiques ou en développant des racines protéoïdes, afin d'explorer une grande partie de la rhizosphère (Lambers *et al.*, 2008).

I.4.3. Solubilisation du P du sol

Les modifications chimiques et biologiques au niveau de la rhizosphère qui sont induites par les racines jouent un rôle clé dans l'amélioration de la biodisponibilité du P du sol (Hinsinger, 2001). Les racines des plantes exsudent des acides organiques (comme le malate et le citrate) et des enzymes spécialisées pour libérer le P piégé sous forme insoluble (FePO_4 , $\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4) ou sous forme organique (phytate principalement et aussi sucres phosphatés, acides nucléiques et phospholipides) (Duff *et al.*, 1994 ; Jones, 1998). En effet, les acides organiques entrent en compétition avec le phosphate sur les sites de fixation de Fe, Al et Ca pour former des complexes stables favorisant le maintien du phosphore en solution (Parnet, 2002). Chez le lupin blanc la carence phosphatée stimule la sécrétion de citrate et de malate à partir des racines protéoïdes (20 à 40 fois de plus) (Neumann *et al.*, 1999). Une sécrétion accrue de citrate a été observée également chez le riz et le colza. Dans ce contexte, une approche génétique qui vise à améliorer génétiquement les espèces cultivées en augmentant la sécrétion par les racines d'acides organiques paraît efficace. Koyama *et al.*, (2000) ont rapporté que la surexpression du gène codant la citrate synthase (CS) chez *Arabidopsis* augmente la production de citrate en cas de déficience phosphatée. De même, des plantes de tabac surexprimant une citrate synthase bactérienne ont montré une amélioration de l'excrétion du citrate par les racines ainsi que l'acquisition du P_i à partir des sols acides (López-Bucio *et al.*, 2000).

De façon intéressante, l'amélioration de la sécrétion d'acides organiques est liée aussi à la résistance de plusieurs plantes à l'aluminium, puisque l'aluminium chélaté est moins nocif pour les cellules végétales que les ions Al^{3+} libres (Poirier et Bucher, 2002).

La sécrétion d'enzymes (comme les phosphatases) permet aussi de décomposer le phosphore organique (Po) en P_i pour le rendre disponible aux plantes. (Neumann et Römheld, 2002; Zhang *et al.*, 2010, Raghothama, 1999). Ces phosphatases jouent donc un rôle important dans le recyclage du Po en P_i et leur activité semble être plus importante dans la rhizosphère (Grierson et Comerford, 2000 ; Spohn et Kuzyakov, 2013). Ces enzymes comprennent différents types comme les phosphodiesterases, les hydrolases capables d'hydrolyser les fonctions anhydride d'acide ou les liaisons P-N (Nannipieri *et al.*, 2011) et

les phosphomonoestérases incluant les phytases. Ces dernières sont les plus étudiées (voir plus loin), vue leur spécificité à hydrolyser l'acide phytique la forme majeure du Po dans le sol (Jones et Oburger, 2011).

I.4.4. La régulation des systèmes de transport de Pi et les changements d'expression des gènes

L'expression de plusieurs gènes est modifiée en réponse à une carence phosphatée. D'une part, les plantes tentent d'améliorer leur potentiel d'absorption en augmentant la capacité d'assimilation des cellules racinaires en condition de carence. L'optimisation de l'acquisition du Pi externe est assurée par une forte induction de l'expression des transporteurs de Pi (Raghothama, 1999; Misson et al 2004) et notamment les transporteurs à haute affinité comme *PHT1;1* et *PHT1;4* (Muchhal et al., 1996; Karthikeyan et al., 2002; Mudge et al., 2002 ; Shin et al., 2004). Le double mutant *pht1;1-pht1;4* montre une réduction de la teneur en Pi et de sa capacité à absorber cet élément par rapport aux plantes sauvages, de même sa biomasse est très altérée. Ceci prouve le rôle important de ces deux transporteurs dans l'acquisition du Pi que ce soit en condition normale ou de carence (Shin et al., 2004) mais n'écarte pas la contribution importante d'autres transporteurs comme *PHT1;9* , *PHT1;2* et *PHT1;3* (Shin et al., 2004). Récemment, il est démontré que PHF1 (Phosphate Transporter Traffic Facilitator 1) facilite le transport des protéines PHT1 vers la membrane plasmique. De cette façon, PHF1 participe à la régulation du niveau d'activité du transport impliqué dans l'acquisition et l'homéostasie du Pi (González et al., 2005; Bayle et al., 2011; Chen et al., 2011b). Cependant le mécanisme par lequel PHF1 contrôle le fonctionnement de ces transporteurs est encore mal connu.

D'autre part, les gènes impliqués dans la mobilisation du Pi à partir du Po manifestent une induction en condition de carence. Dans ce contexte, deux ribonucléases (RNS1 et RNS2) chez *Arabidopsis*, caractérisées par leur implication dans la mobilisation du Po interne sont induites lors d'une déficience phosphatée (Bariola et al., 1994). L'expression d'une phosphatase acide *AtACP5*, connue pour son implication dans la mobilisation du phosphate et dans la le métabolisme des ROS dans les parties stressées ou sénescents de la plante, est également induite (del Pozo et al., 1999).

Une autre catégorie de gènes impliquée dans la réponse à la carence en Pi comprend les microARN, qui sont récemment classés comme des régulateurs impliqués dans de nombreux processus biologiques. En effet, en condition de carence, les miR399 sont hautement induits

chez *A. thaliana* (Aung *et al.*, 2006). En outre le motif conservé P1BS (PHR1-Binding Site) situé au niveau du promoteur des miR399, indique qu'ils sont régulés par PHR1, le facteur de transcription central de la voie de signalisation de la carence phosphatée. Chez *Arabidopsis* plusieurs autres facteurs de transcription pouvant être induits en cas d'insuffisance en Pi comme ZAT6 (Zinc finger *Arabidopsis* 6) (Devaiah *et al.*, 2007a), WRKY75 (Devaiah *et al.*, 2007b), bHLH32 (Chen *et al.*, 2007) et SPX1 (Duan *et al.*, 2008).

Avec le développement des techniques de transcriptomique, il est devenu possible d'analyser le profil d'expression des gènes au niveau du génome entier. Plusieurs études ont montré que les changements dans l'expression génique chez les plantes peuvent être détectés quelques heures après l'application du stress phosphaté (Hammond *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003; Mission *et al.*, 2005). Les réponses transcriptionnelles à court terme semblent être plus liées au stress de manière générale, tandis que les réponses à long terme ont été considérées comme plus spécifiques pour le manque du Pi (Figure 4; Hammond *et al.*, 2003).

Les données transcriptomiques (Affymetrix genome array genechip) d'*Arabidopsis* ont révélé l'induction de 612 gènes alors que 254 sont réprimés lors d'une réponse à la carence en Pi (Misson *et al.*, 2005). La classification fonctionnelle d'une partie de ces gènes a indiqué leur implication dans diverses voies métaboliques, le transport d'ions, la transduction du signal, la régulation transcriptionnelle, et d'autres processus liés à la croissance et au développement.

Le tableau ci-dessous résume les principaux gènes induits par la carence en P.

Tableau 2 : Les principaux gènes induits par la carence en P répartis en différentes classes fonctionnelles (D'après Mission *et al.*, 2005 ; Lin *et al.*, 2009).

Gènes	Classification/ description de la fonction	Références
<i>PHT1;1</i> (At5g43350) <i>PHT1;4</i> (At2g38940)	Transport du Pi transporteurs à haute affinité impliqués dans l'absorption et le transport du Pi	Mitsukawa <i>et al.</i> , 1997 Misson <i>et al.</i> , 2004
<i>PHT3</i> (At5g43360)		Mission <i>et al.</i> , 2005
<i>PHO1;H1</i>	chargement du Pi dans le xylème	Wang <i>et al.</i> , 2004
<i>SULTR 1;3</i> (At1g22150) <i>SULTR 3;4</i> <i>FER1</i> (At5g01600)	Transport et homéostasie du SO₄ et du Fe absorption du sulfate impliqué dans le stockage du Fe dans le chloroplaste	Mission <i>et al.</i> , 2005 Petit <i>et al.</i> , 2001
<i>CAX3</i> (At3g51860) <i>CAX1</i> (At3g08960)	autres transporteurs antiporteurs H ⁺ /Ca ²⁺ vacuolaires, impliqués dans la	Catala' <i>et al.</i> , 2003 Cheng <i>et al.</i> , 2003

	régulation de l'homéostasie des ions, le développement et les réponses hormonales	Cheng et al., 2005
* <i>WRKY 75</i> (At5g13080) * <i>ZAT6</i> (At5g04340) * <i>BHLH32</i> (At3g25710)	Transcription *facteur de transcription, régule positivement les réponses à la carence en Pi *facteur de transcription de type zinc finger C2H2, régule plusieurs gènes de réponse à la carence en P, contrôle l'architecture racinaire et l'assimilation du Pi *facteur de transcription bHLH, régulateur négatif des réponses à la carence en Pi	Devaiah et al., 2007a Devaiah et al., 2007b Chen et al., 2007
*miR399 * <i>At4</i> (At5g03545) <i>IPS1</i> (At3g09922) * <i>SPX1</i> (At5g20150) <i>SPX3</i> (At2g45130) * <i>PDR2</i>	Signalisation et perception *transporté via le phloème vers les racines, régule négativement PHO2 *ARN non codants, inhibant l'action des miR399 sur PHO2 *protéines à domaine SPX, régulent l'expression des gènes impliqués dans l'absorption et la remobilisation du Pi *module l'activité du méristème racinaire et l'architecture racinaire en fonction du statut externe en Pi afin de maximiser l'acquisition de cet élément	Chiou et al., 2006 Bari et al., 2006 Shin et al., 2006 Franco-Zorrilla et al., 2007 Duan et al., 2008 Lin et al., 2009 Ticconi et al., 2004
purple acid phosphatase (At1g52940) <i>PAP22</i> (At3g52820) <i>PAP10</i> (At2g16430) <i>PAP7</i> (At2g01880) acid phosphatase type 5 (<i>ACP5</i>) (At3g17790) <i>RNS1</i>	Phosphatases récupération du P à partir des composés organiques mobilisation et homéostasie du Pi ribonucléases, remobilisation du Po interne	Mission et al., 2005 del Pozo et al., 1999 Bariola et al., 1994
peroxidase (At1g34510) At5g05340 At5g06730 <i>PER73</i> (At5g67400) SOD/ GST <i>PDF2.3</i> (At2g02130) chitinase (At3g47540)	Stress enzymes liées à la réponse au stress oxydatif réponse aux stress biotiques	Mission et al., 2005
anthocyanidin synthase flavonone-3-hydroxylase	synthèse des anthocyanes	Mission et al., 2005

*phospholipase D (At3g05630) phospholipase C (At3g03540) * MGDG DGDG * SQD1 et SQD2	modulation des voies de biosynthèse des lipides *dégradation des phospholipides * synthèse des galactolipides * synthèse des sulfolipides	Mission et <i>al.</i> , 2005 Li et <i>al.</i> , 2006a Yu et <i>al.</i> , 2002
*galactinol synthase (At1g60470) *glucose-1-phosphate adenylyltransferase (At1g05610) *glutamate decarboxylase (At2g02010) *chlorophyll A-B binding family protein (At3g22840)	métabolisme laire biosynthèse des carbohydrates métabolisme des acides aminés	Mission et <i>al.</i> , 2005

Une autre analyse microarray a été menée par Woo et *al.* (2012) en étudiant séparément la réponse des feuilles et des racines des plantes d'*Arabidopsis* soumises à un stress phosphaté suivi d'une période de reprise (condition normale en Pi). Cette étude a indiqué qu'un total de 1257 gènes est différentiellement exprimé dans les racines soit en condition de carence ou après la reprise. Tandis que 182 gènes ayant des profils d'expression différents ont été identifiés dans les feuilles.

I.4.5. Mobilisation du phosphate interne

La carence phosphatée affecte rapidement les voies métaboliques du carbone. Elle favorise des voies alternatives telles que la glycolyse cytosolique et modifie le transport mitochondrial des électrons permettant le maintien de la respiration malgré le manque de Pi (Theodorou et Plaxton, 1993).

Pour faire face au manque de Pi, les plantes permettent la remobilisation du phosphate interne des feuilles sénescents vers les plus jeunes ou les racines. Il a été suggéré que la protéine PHO2 qui est fortement induite au niveau des feuilles sénescents pourrait être impliquée dans ce transport phloémique (Bari et *al.*, 2006). Une phosphatase acide pourpre AtPAP26 serait également impliquée dans la remobilisation du Po des feuilles sénescents (Robinson et *al.*, 2012)

Les plantes carencées récupèrent aussi le Po présent au niveau de la membrane plasmique sous forme de phospholipides, ces derniers étant remplacés par des sulfolipides et des galactolipides. Ainsi en condition de carence phosphatée, la proportion de mono- et digalactolipides et sulfolipides augmentent dans la membrane des thylakoïdes, ce qui permet de continuer la photosynthèse malgré la réduction de la teneur en phospholipides (Yu *et al.*, 2002; Andersson *et al.*, 2003). Des études de microarray chez *Arabidopsis* ont montré que les gènes codant des enzymes de dégradation des phospholipides comme les phospholipases C (At3g03530, At3g03540) et D (At3g05630), sont surexprimés au niveau des feuilles et des racines en cas de stress phosphaté, ce qui est en corrélation avec l'augmentation de la dégradation des phospholipides (Misson *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2005).

Quant à la biosynthèse des sulfolipides, elle fait intervenir deux gènes SQD1 et SQD2 dont l'expression augmente chez les plantes déficientes en P (Essigmann *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2002; Hammond *et al.*, 2003; Morcuende, *et al.*, 2007; Wasaki *et al.*, 2003).

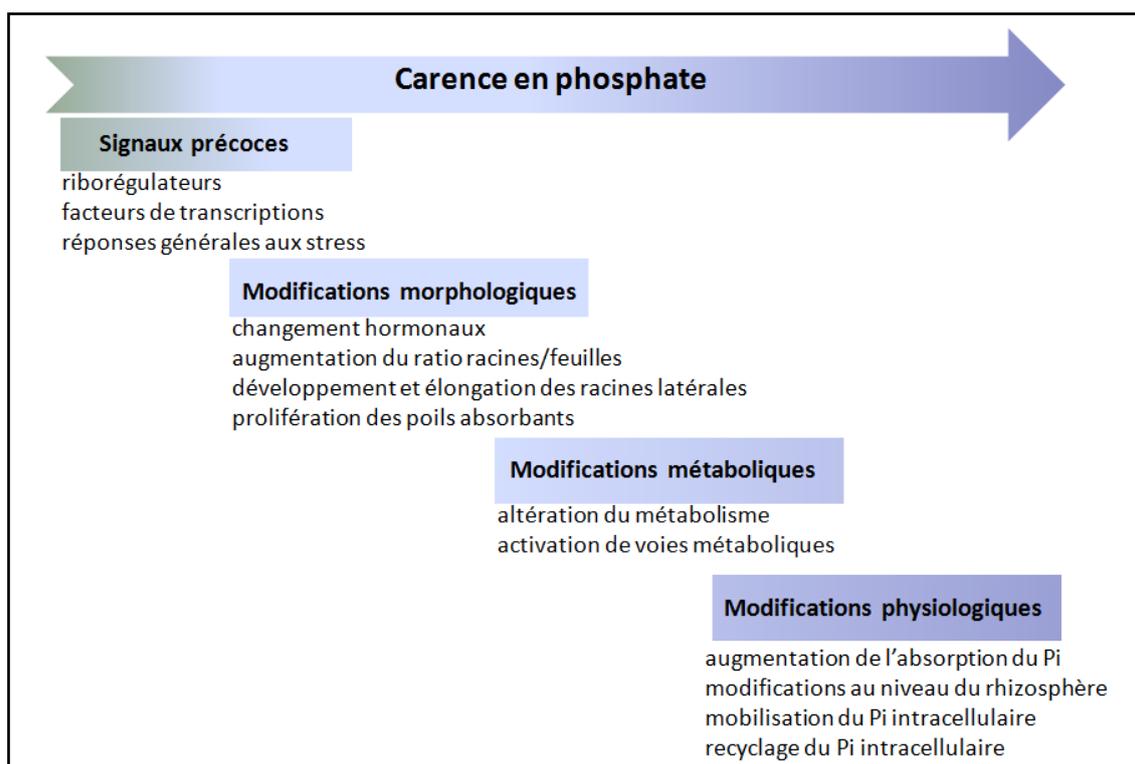


Figure 4 : Description des mécanismes de réponses mis en place pour répondre à la carence phosphatée selon une échelle arbitraire allant d'une carence courte à longue (d'après Hammond *et al.*, 2004).

1.5. La perception et la signalisation du Pi

Le contrôle de l'homéostasie du Pi et la mise en place de réponses adaptatives à la carence de cet élément nécessite des systèmes de perception et de signalisation locales capables de détecter et de refléter la teneur en Pi dans le milieu externe ainsi qu'un système de signalisation systémique circulant entre la partie aérienne et les racines (ou encore entre « source » et « puits ») pour rendre compte des changements du statut interne du Pi au sein de la plante entière (Chiou et Lin, 2011; Lin et al., 2013)

1.5.1. La perception du Pi

Il a été démontré que la pointe racinaire est le site de détection de la carence phosphatée (Svistoonoff et al., 2007). Jusqu'à ce jour aucun senseur intracellulaire ou membranaire de la teneur en phosphate n'a été identifié chez les plantes. Sur des cellules de tomate en culture, l'ajout du D-mannose ou d'autres métabolites piégeant le phosphate, engendre la diminution de sa concentration interne alors que celle du milieu extérieur reste constante. Dans ces expériences, les transcrits des RNases s'accumulent, réponse observée uniquement lors d'une déficience phosphatée. Ces observations supportent tout de même l'existence d'un mécanisme de perception intracellulaire (Kock et al., 1998).

Une étude plus récente a démontré que chez la levure le transporteur à haute affinité *Pho84* fonctionne en tant que transcepteur; un transporteur qui perçoit la teneur des nutriments de son environnement et active les voies de signalisation (Popova et al., 2010 ; Giots et al., 2003). De même chez *Arabidopsis* le transporteur *CHL1/NRT1.1* joue à la fois le rôle d'un transporteur et d'un senseur de nitrate via le changement dans le statut de phosphorylation (Ho et al., 2009). Dans ce contexte, les deux transporteurs majeurs de la famille PHT1, *PHT1;1* et *PHT1;4* (Shin et al., 2004) sont localisés au niveau de l'épiderme cellulaire des poils absorbants (Karthikeyan et al., 2002, Mudge et al., 2002), le site approprié pour la perception du Pi. D'après les résultats antérieurs, il est possible que les transporteurs de la famille PHT1 comme *PHT1;1* et *PHT1;4* perçoivent la variation des concentrations externes du Pi suite à l'altération du statut de phosphorylation ou à d'autres modifications post-traductionnelles. Cependant, des preuves expérimentales sont nécessaires pour soutenir cette hypothèse (Nagarajan et Smith, 2012; Zhang et al., 2014).

1.5.2. Voie de signalisation de la carence en Pi (locale et systémique)

Chez *A. thaliana*, le facteur de transcription *PHR1* de type MYB avec son homologue *PHL1* (*PHR1*-Like1) interagissent et sont capables de réguler une grande partie des réponses à la carence phosphatée en se liant aux promoteurs de leurs gènes cibles sur un motif consensus (GNATATNC) nommé P1BS (*PHR1* Binding Site (Rubio *et al.*, 2001 ; Bustos *et al.*, 2010)). L'activité de la protéine *PHR1* est régulée au niveau post-traductionnel par sumoylation par une enzyme de type E3 SUMO ligase appelée *SIZ1* (small ubiquitin-like modifier (SUMO) E3 ligase). Il est démontré que chez le mutant *siz1* les gènes de réponse à la carence en Pi ne sont plus induits (Miura *et al.*, 2005).

En condition de carence, l'expression du miR399 est positivement régulée par le facteur de transcription *PHR1*. Ce qui fait que miR399 arrive jusqu'aux racines via le phloème où il agit sur sa cible *PHO2* en se liant à l'ARNm de celle-ci et provoque son clivage (Lin *et al.*, 2008; Pant *et al.*, 2008). Sachant que *PHO2* code pour une ubiquitine E2 conjuguase (*UBC24*) qui régule négativement l'expression de gènes de réponse à la carence en P tels que *PHT1;8* et *PHT1;9*, la levée de l'inhibition sur les cibles de *PHO2* (suite à sa dégradation) améliore donc l'acquisition et le transport du Pi des racines vers la partie aérienne (Fujii *et al.*, 2005 ; Aung *et al.*, 2006; Bari *et al.*, 2006; Chiou *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2008).

Parallèlement, les ARN *At4* (*Arabidopsis thaliana* 4) et *IPS* (Induced by Pi Starvation) non codants induits lors de la carence possèdent une séquence partiellement complémentaire au miR399 (Shin *et al.*, 2006). Ce dernier peut alors se fixer à *IPS/At4* mais ne peut pas le cliver. Ainsi, miR399 se trouve séquestré par *IPS/At4* et ne peut pas agir sur sa cible *PHO2*. Ce système de régulation via une fausse cible ou « target mimicry » permet d'ajuster la quantité des protéines *PHO2* présentes et de réguler finement les réponses selon les besoins en Pi (Franco-Zorrilla *et al.*, 2007).

Des éléments de cette voie ont été identifiés chez le riz (Bari *et al.*, 2006 ; Zhou *et al.*, 2008), l'orge (Schunmann *et al.*, 2004a,b), le haricot (Valdés-López *et al.*, 2008) et *M. truncatula* (Branscheid *et al.*, 2010), indiquant que cette voie de régulation faisant intervenir *PHR1* pourrait être conservé chez les plantes (monocotylédones et dicotylédones).

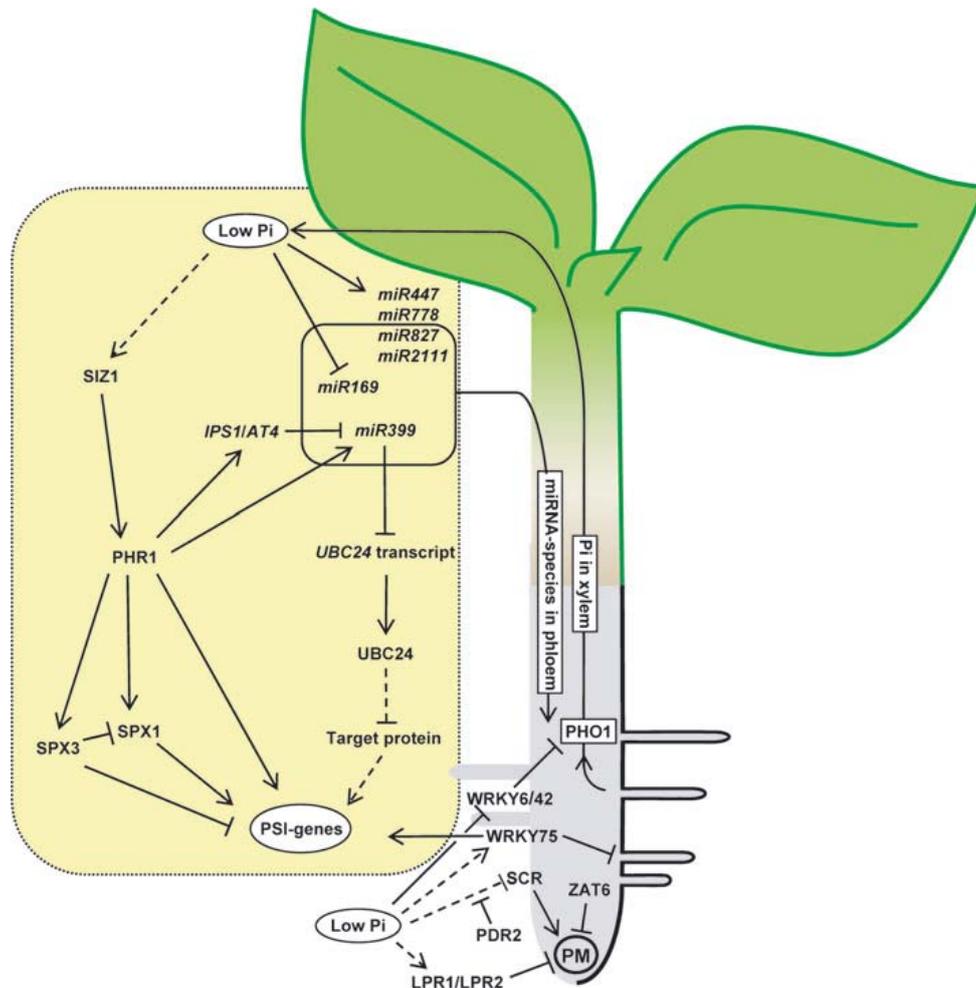


Figure 5 : Voie de signalisation de la carence phosphatée. Le facteur de transcription PHR1 est un régulateur clé des réponses lors de la carence en phosphate. Il est responsable de l'induction des gènes de réponse à la carence phosphatée. Alors que WRKY75 et ZAT6 sont impliqués dans la mise en place des réponses au niveau des racines. Le facteur de transcription PHR1 est régulé au niveau post-traductionnel par la protéine SIZ1, une SUMO E3 ligase (Miura et al., 2005), qui est capable de sumoyler la protéine PHR1. PHR1 régule transcriptionnellement le gène *IPS1* (Rubio et al 2001) qui code un ARN non codant partiellement complémentaire au *mir399*. Le riborégulateur *IPS1* appartient à une boucle de contrôle négatif de l'expression de *mir399* puisqu'il est capable de s'hybrider avec *mir399* et de bloquer son activité (Franco-Zorrilla et al., 2007). Une des cibles de *mir399* est *PHO2* (*UBC24* ; une ubiquitine E2 conjuguase). Les cibles directes de *PHO2* ne sont pas encore connues mais les transporteurs de phosphate *PHT1;8* et *PHT1;9* sont sur-exprimés chez le mutant *pho2* (Bari et al., 2006). *mir399* et autres miRNAs qui répondent à la carence en Pi sont transportés via le phloème permettant ainsi la signalisation à longue-distance issue des feuilles. ZAT6, LPR1/LPR2 et PDR2 font partie des mécanismes de régulation de l'activité du méristème primaire (PM) en réponse à la carence en P perçue dans la rhizosphère. PDR2 influence le facteur de transcription SCR (SCARECROW), qui est nécessaire pour le développement des racines. WRKY6 and WRKY42 sont des régulateurs transcriptionnels réprimant PHO1, qui code pour une protéine nécessaire au chargement de phosphate dans le xylème.

Flèches continues : indiquent une régulation positive ou un transport dans la plante. Lignes continues: indiquent une inhibition ou régulation négative. Flèches pointillées: désignent des voies de signalisation hypothétiques (D'après Nilson et al., 2010).

Chez les cellules vivantes, la transmission des informations est assurée par l'intégration des signaux locaux et systémiques, permettant la reprogrammation des processus cellulaires en réponse à des stimuli externes et à divers signaux internes (Turnbull et Lopez-Cobollo, 2013). Chez les plantes ces deux types de signaux, ont été mis en évidence par la technique du "split root" qui consiste à séparer le système racinaire d'une même plante en deux et à plonger chaque partie dans des milieux de concentrations différentes en phosphate. Dans ce type d'expérience, si les signaux produits en réponse à la carence opèrent uniquement au niveau des cellules dans lesquels ils ont été déclenchés, la régulation est locale. Si les signaux agissent à longue distance à travers les tissus vasculaires pour transmettre l'information entre les différentes parties de la plante en réponse à un changement du statut interne du Pi, la régulation est dite systémique (Lin et al., 2014).

L'étude transcriptomique menée sur des plantes d'*Arabidopsis* en "split root" montre que la régulation locale module l'expression des gènes régulés par la concentration externe du Pi et qui sont impliqués dans l'ajustement de l'architecture racinaire. Alors que les gènes impliqués dans la gestion du Pi interne (mobilisation, recyclage, métabolisme lipidique, etc..) sont régulés systématiquement (Linkor et al., 2002; Svistoonoff et al., 2007 ; Thibaud et al., 2010).

En raison de la multitude des fonctions dans lesquelles le Pi participe, les voies de signalisation sont interconnectés et vont induire des réponses adaptatives qui sont souvent le résultat d'une coordination entre ces deux voies (Chiou et Lin, 2011; Péret et al., 2011).

Le Pi lui-même, plusieurs phytohormones, des sucres, des miARN ainsi que le calcium sont considérés comme des signaux qui agissent localement ou à longue distance (Chiou et Lin 2011 ; Lin et al., 2014).

1.5.2.1. Les signaux transportés des racines vers les feuilles

Le signal phosphate

Le phosphite ou phosphonate (Phi) est un analogue assimilable mais non métabolisable (Carswell et al., 1996, 1997). Chez des plantes placées en condition de carence, traitées avec du phosphite (Phi), une bonne partie des réponses induites par la carence sont atténuées comme la réduction du ratio racine/feuilles, l'élongation des poils absorbants, l'accumulation d'anthocyane et l'induction de gènes répondant à la carence de phosphate. Le Phi mime ici la suffisance nutritionnelle indiquant que le Pi est capable d'agir comme un signal initial (Carswell et al., 1996, 1997; Ticconi et al., 2001; Danova-Alt et al., 2008; Rouached et al., 2011).

L'analyse d'un mutant *pho1* affecté au niveau du chargement du Pi dans le xylème et ayant une faible teneur en Pi dans les feuilles (Poirier et al., 1991) ne supporte pas cette hypothèse puisque les réponses induites par la carence sont supprimées même si les niveaux du Pi étaient faibles dans les feuilles. Ces résultats suggèrent que PHO1 pourrait charger dans le xylème des signaux autres que le Pi, régulant les réponses longue distance (Rouached et al., 2011).

La régulation systémique via les hormones strigolactones et cytokinines

Comme mentionné précédemment, la biosynthèse des SL est régulée positivement par la carence en Pi dans les racines (Kohlen et al., 2011). En effet dans des conditions de carence les plantes sauvages d'*A. thaliana* montrent une réduction de la ramification des parties aériennes. Cette réduction n'est pas observée chez les mutants *max1*, *max2* et *max4*. Ceci est en accord avec le rôle des SL dans l'inhibition de la ramification (Kohlen et al., 2011). Ces observations renforcent l'idée que les SL sont des signaux transportés par le xylème des racines jusqu'aux parties aériennes afin de réguler les changements de l'architecture des tiges feuillées en réponse à la carence phosphatée (Zhang et al., 2014). Par ailleurs, l'addition de CK dans le milieu réduit considérablement l'accumulation des anthocyanes et l'induction du gène *IPS1* dans les feuilles (Franco-Zorrilla et al., 2005). Ceci suggère l'implication de cette hormone aussi dans la répression de diverses réponses à la carence en P et ce après son transport via le xylème.

1.5.2.2. Les signaux longues distances issus des feuilles

Les miARN

Le miARN399 est le premier miARN qui a été caractérisé chez *Arabidopsis*. Il est fortement induit dans les tissus vasculaires en condition de carence en Pi. Des expériences de greffes ont mis en évidence que miR399 peut être considéré comme un signal mobile qui migre des feuilles vers les racines via le phloème pour réguler négativement PHO2 (Pant et al., 2008).

L'expression constitutive de miR399 supprime l'accumulation de l'ARNm de PHO2, même en présence de Pi et engendre un phénotype similaire au mutant *pho2* en termes de sur-accumulation de Pi dans les feuilles.

Outre la famille *miR399* qui régule systématiquement les réponses à la carence phosphatée, d'autres miARN sont régulés par le Pi chez *A. thaliana*. Plusieurs études de génomique et de transcriptomique chez différentes espèces indiquent qu'un grand nombre de petits ARNs sont différentiellement exprimés en fonction de la disponibilité en phosphate (Pant et al., 2009 ; Hsieh et al., 2009 ; Zhu et al., 2010 ; Valdes-Lopez et al., 2010 ; Lundmark et al., 2010) et aussi en fonction d'autres stress nutritifs ; ce qui suggère l'existence d'une interconnexion entre les voies de réponses à ces stress contrôlées par ces miARN (Hsieh et al., 2009; Pant et

al., 2009). Par exemple l'expression de miR395 et miR398 est induite respectivement par la carence en soufre et en cuivre mais elle est réprimée par la carence en Pi (Buhtz *et al.*, 2008; Kuo *et Chiou*, 2011).

Les sucres

Les sucres semblent aussi avoir un rôle de molécule signal au niveau systémique. En effet, une carence en Pi entraîne une accumulation de sucres et d'amidon dans les feuilles. Le transport des sucres contenus dans les feuilles via le phloème vers les racines en développement précède et participe à la mise en place d'une partie des réponses à la carence. Une inhibition de la synthèse ou du transport du sucre diminue les réponses à la carence et inversement un apport en sucre augmente l'expression de gènes induits lors de la carence phosphatée (Hammond *et White*, 2008). Des mutants *pho3* d'*A. thaliana* affectés au niveau du transporteur de sucre (SUC2) impliqué dans le chargement du sucrose dans le phloème montrent une diminution de l'activité phosphatase lors de la carence (Lloyd *et Zakhleniuk*, 2004).

Le calcium

Lorsque les racines de tomate sont soumises à une déficience phosphatée l'activité de Ca^{2+} -ATPase de la membrane plasmique, responsable des mouvements de calcium, augmente de manière significative (Muchhal *et al.*, 1997). Cette observation suggère l'implication des ions Ca^{2+} dans la signalisation de la déficience phosphatée. Chez *Arabidopsis* les transporteurs vacuolaire $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$, CAX1 (Calcium Exchanger 1) et CAX3 peuvent être également impliqués dans la régulation de l'homéostasie du Pi parce que le double mutant *cax1/cax3* qui est affecté dans l'homéostasie du calcium, montre une accumulation accrue du Pi dans les feuilles par rapport au sauvage (Cheng *et al.*, 2005). Ce qui suggère que ces transporteurs (CAX1 et CAX3) exercent une régulation négative sur les réponses des plantes à la carence en P et sur l'absorption du Pi. La détermination de la concentration du Pi dans la partie aérienne du mutant *cax1/cax3* greffé sur le porte-greffe sauvage (*cax/WT*) montre une concentration élevée similaire à celle détectée chez le double mutant. Dans le cas du greffage inverse *WT/cax*, la concentration du Pi au niveau de la partie aérienne est celle du *WT/WT*. Ces données suggèrent que les signaux systémiques issus de la partie aérienne sont responsables de la forte concentration du Pi chez le mutant *cax1/cax3*. Notons qu'en condition de carence en Pi les niveaux d'expression de miR399 et PHO2 détectés dans les racines de ce double mutant sont similaires à ceux enregistrés chez le sauvage. Ceci suggère que CAX1 et CAX3 agissent par une voie de signalisation indépendante de celle miR399- PHO2 (Liu *et al.*, 2011).

II. L'acide phytique :

II.1. Structure chimique et localisation

L'AP est un constituant des plantes qui représente 1 à 5 % du poids sec des grains de céréales, de plantes oléagineuses et des légumineuses. C'est une forme organique de P dont la nomenclature chimique est le *myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate (InsP₆) et de formule brute C₆H₁₈O₂₄P₆ (Figure 6).

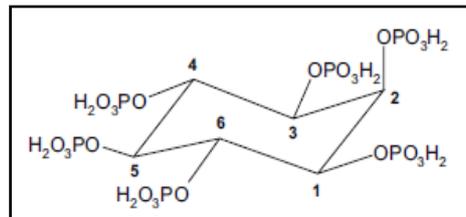


Figure 6 : Structure chimique de l'acide phytique. Acide phytique: *myo*-inositol hexakisphosphate (InsP₆)

Selon Reddy et al., (2002), l'InsP₆ existe principalement sous forme de complexe peu soluble de sel de calcium, de potassium ou de magnésium appelé phytate et s'accumule dans des corps protéiques (globoïdes). Dans les graines, les phytates représentent la principale réserve de P (≈ 75 à 85% de la quantité totale du P), de minéraux et d'énergie utilisée par la plantule lors de la germination.

Selon l'espèce, la quantité et la distribution des phytates dans les graines peuvent être très variables. Dans le cas de l'orge, du blé et du riz, les phytates sont majoritairement (80%) présents dans la couche d'aleurone et le son (téguments maternels) alors qu'une faible quantité s'accumule dans l'embryon. Au contraire dans les grains de maïs, les phytates sont surtout présents dans l'embryon et le scutellum (O'Dell et al., 1972). Dans le cas des graines de légumineuses, telles que le haricot, plus de 95% des phytates sont stockés dans les cotylédons (Ariza-Nieto et al., 2007). Chez l'espèce modèle *Arabidopsis*, celles-ci se concentrent le plus souvent dans l'embryon (Otegui et al., 2002). Au cours de la germination, l'AP est dégradé par des phosphatases spécifiques, dont les phytases, permettant la libération du Pi afin de soutenir la croissance des jeunes plantules (Gibson et Ullah, 1990 ; Raboy, 2003).

II.2. Fonctions et biosynthèse

L'AP ubiquitaire chez les eucaryotes, avec ces dérivés, il est impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires (Shears, 2001). Au niveau des graines, ce composé constitue non

seulement la forme majeure de stockage du P dans les grains mais aussi une source de minéraux et de *myo*-inositol, un important facteur de croissance (Maga, 1982; Harland et al., 1995). Les intermédiaires phosphorylés issus de l'hydrolyse de l'AP tels que le *myo*-inositol-1,4,5-trisphosphate (Ins(1,4,5)P₃) agit comme messenger secondaire dans la transduction des signaux cellulaires par la mobilisation du calcium des compartiments intracellulaires (Sakamoto et al., 1992), d'autres dérivés sont impliqués dans la régulation de la structure de la chromatine (Shen et al., 2003 ; Steger et al., 2003), dans l'apoptose (Agarwal et al., 2009), piègent efficacement les radicaux hydroxyles en se complexant avec le fer (ce qui confère à l'AP son rôle d'antioxydant naturel dans les graines en période de dormance (Graf et al., 1987), et sont impliqués dans la réponse aux stress (Munnik et Vermeer, 2010).

Le rôle de l'AP en tant que molécule de signalisation s'établit progressivement. Au début, il était difficile d'imaginer puisqu'il est présent en grande quantité dans les plantes. Toutefois il pourrait fonctionner comme le calcium dans le corps humain, présent essentiellement dans les os mais fonctionnant comme messenger secondaire sous forme de Ca²⁺ intracellulaire libre. Ainsi une grande partie d'AP chez les plantes n'a rien à voir avec la signalisation. Différents mécanismes de contrôle sont alors nécessaires pour différencier entre son rôle dans la signalisation et le stockage. En fait, il a été rapporté que l'AP joue le rôle d'une molécule de signalisation dans la fermeture des stomates induite par l'ABA (Lentiri-Chlieh et al., 2000 et 2003) et qu'il est le cofacteur du récepteur de l'auxine TIR1 qui régule l'expression des gènes médiés par l'auxine (Tan et al., 2007).

Deux voies de biosynthèse d'InsP₆ ont été rapportées chez les plantes; une voie dépendante des lipides et une autre entièrement indépendante des lipides (Brearley et Hanke, 1996a, 1996b). Il a été spéculé que le phytate présent dans les graines dérive de la voie indépendante des lipides et sert comme source de Pi, de *myo*-inositol et de minéraux pour les tissus en développement (Raboy, 2003) alors que la voie dépendante des lipides opère dans tous les tissus de la plante pour générer le phytate (InsP₆) et ses dérivés qui sont impliqués dans la signalisation (Shears 2001, 2009; Irvine, 2003, 2005; York, 2006; Alcazar-Roman et Went 2008; Letcher et al., 2008).

Ces deux voies diffèrent principalement par leurs étapes précoces menant à la synthèse du *myo*-inositol-trisphosphate (InsP₃) à partir du *myo*-inositol (Ins). Sachant que la synthèse du Ins commence par la conversion du D-glucose-6-phosphate en *myo*-inositol-3-phosphate (Ins(3)P₁). Cette réaction est catalysée par une D-*myo*-inositol-3-phosphate synthase (MIPS)

(Loewus et Loewus, 1983 ; Loewus et Murthy, 2000). L'Ins(3)P₁ ainsi formé est ensuite déphosphorylé pour donner l'Ins par une *myo*-inositol monophosphatase (IMP) qui est capable aussi de déphosphoryler le L-galactose 1-phosphate (L-Gal 1-P), un précurseur de la biosynthèse de l'acide ascorbique (Torabinejad et al., 2009, Laing et al., 2004). La réaction catalysée par IMP est réversible, une *myo*-inositol kinase (MIK) catalyse la réaction de phosphorylation (Shi et al., 2005; kim et al., 2008).

Dans la voie dépendante des lipides, l'Ins est converti sous l'action d'une phosphatidylinositol synthase (PtdIS) en phosphatidylinositol (PtdIns), qui va être séquentiellement phosphorylé par des phosphatidylinositol kinases pour produire le phosphatidyl inositol-4,5-bisphosphate PtdIns(4,5)P₂ ou (PIP₂). Cette molécule constitue le substrat d'une phospholipase C (PLC) conduisant à la libération du diacylglycérol (DAG) et d'Ins(1,4,5)P₃, une molécule centrale dans la transduction des signaux (Odom et al., 2000), qui va se fixer sur ses récepteurs, situés sur la membrane du réticulum endoplasmique (RE), contribuant ainsi à intensifier le signal Ca²⁺ en activant les canaux calcium au niveau du tonoplaste et permettant aussi de libérer le calcium d'origine intracellulaire dans le cytoplasme (Chinnusamy et al., 2010).

Concernant la voie indépendante des lipides, elle comprend une série d'étapes de phosphorylation aboutissant à la synthèse d'InsP₆ à partir d'Ins, grâce à des inositol phosphate kinases spécifiques. Comme déjà mentionné, la première étape de phosphorylation est celle catalysée par MIK qui consiste à convertir l'Ins en Ins(3)P₁. La production d'InsP₂ à partir d'Ins(3)P₁ nécessite une monophosphate kinase.

D'autres étapes de phosphorylation, sont nécessaires pour convertir l'InsP₃ (provenant des deux voies) en inositol phosphate plus phosphorylés; l'InsP₄, InsP₅ et InsP₆. Pour cela une inositol polyphosphate multikinase (IPK2 : inositol 1,4,5-tris-phosphate kinase) spécifique pour la phosphorylation d'Ins(1,4,5)P₃ en position 3 et 6 et une autre kinase nommée inositol 1,3,4-trisphosphate 5-/6-kinase (ITPK) vont aboutir à la formation d' Ins(1,3,4,5,6)P₅. Ce dernier par l'intermédiaire d'une inositol 1,3,4,5,6 pentakisphosphate 2-kinase (IPK1 : InsP₅ 2-kinase) va être phosphorylé en position 2 et aboutit finalement à la formation d'InsP₆ (Stevenson-Paulik et al., 2005; Sweetman et al., 2005).

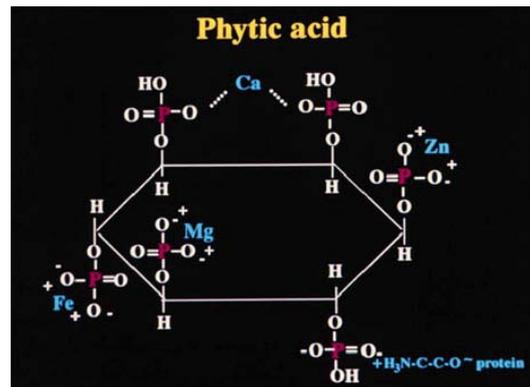


Figure 8 : Structure de l'acide phytique représentant les six phosphates avec les différentes possibilités d'interagir tant avec des cations métalliques qu'avec des résidus des protéines (Parra, 2001).

D'autre part, le phosphore phytique est généralement non disponible pour les animaux monogastriques vu l'absence de phytases intestinales nécessaires à la libération du Pi (Nys et al., 1997). Il est ainsi souvent nécessaire d'ajouter à la ration de ces animaux du Pi pour subvenir à leurs besoins nutritionnels en ce nutriment. Il semblerait toutefois que l'ajout et la consommation sont inefficaces et font que 70% de l'apport total en P est perdu dans les excréments (contenant le P phytique non digéré et l'excès du Pi). Ces excès en composés phosphatés, en plus du phosphore non utilisé provenant des engrais pourraient se retrouver dans les sources d'eau causant des problèmes d'eutrophisation (Haygarth et al., 1998 ; Miles et Sistani, 2002, Bouwman et al., 2011). Le phénomène d'eutrophisation consiste à la prolifération excessive et anarchique d'algues et de plantes aquatiques (responsables de consommation de l'oxygène dissout conduisant à l'asphyxie du milieu, de la production de composés toxiques lors de la photosynthèse, de la destruction d'habitats par colmatages des fonds des cours d'eau,...) nuisant à la faune aquatique.

Comme chez les animaux monogastriques, l'absorption des phytates est limitée chez les humains vu qu'ils ne disposent pas de phytases intestinales. La consommation de phytate en grande quantité perturbe en effet l'absorption des minéraux notamment le fer et contribue à une déficience minérale (en fer) comme c'est le cas dans certains pays en voie de développement où le régime alimentaire se compose essentiellement de céréales (World Health Organization, 2001).

L'ajout de phytase dans les rations des animaux monogastriques et la production de graines ayant une faible teneur en phytates sont devenues par conséquent des approches très attractives pour faire face aux problèmes nutritionnels et environnementaux liés aux phytates.

II.4. Les mutants pauvre en acide phytique (*lpa*: low phytic acid contents)

II.4.1. Production des mutants *lpa*

Diverses stratégies, génétiques et biotechnologiques, ont été adoptées pour réduire les teneurs en AP chez les plantes (Lucca *et al.*, 2001; Brinch-Pedersen *et al.*, 2003; Chiera *et al.*, 2004 ; Drakakaki *et al.*, 2005). La mutagenèse classique a permis de générer des mutants nommés *lpa* (low phytic acid) ayant un faible contenu d'AP (Raboy, 2009), et s'est avérée efficace chez les céréales, notamment le blé (Guttieri *et al.*, 2004), le maïs (Raboy *et al.*, 2000 ; Pilu *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2005), et le riz (Larson *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2008a, b). Les mutants de maïs *lpa1-1* et *lpa 2-1* montrent une réduction de la teneur d'AP au niveau des graines de 66% et 50% respectivement (Raboy *et al.*, 2000). Toutefois, cette approche se heurte à des problèmes sérieux, liés au fait que la réduction systémique des niveaux d'AP dans les mutants *lpa* peut affecter certaines caractéristiques agronomiques telles que le rendement des cultures (Roby, 2009). Pour cette raison Shi *et al.*, (2007) ont développé une approche plus ciblée pour inhiber par "gene silencing" l'expression du transporteur MRP de type ABC spécifiquement dans l'embryon. Ils ont ainsi réussi à réduire la teneur des phytates au niveau des grains en gardant un contenu élevé de Pi et sans affecter le poids sec des grains ni nuire à la germination. Au contraire, dans le cas du riz, une approche similaire visant à éteindre le gène OsMRP5 spécifiquement dans les grains a permis de réduire les niveaux d'AP mais a desservi l'émergence, la germination et le poids des grains (Li *et al.*, 2014). De tels résultats nous amènent à penser que cette stratégie ne peut être généralisée pour réduire les teneurs en AP sans impacter les performances agronomiques de la plante. Pour cela une alternative a été proposée qui consiste à manipuler les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'AP (Kuwano *et al.*, 2006; Kuwano *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2007). Par exemple chez *Arabidopsis*, une mutation au niveau du gène *IPK1* (inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase) affecte la synthèse d'AP et le mutant *Atipk1* montre une réduction de 80% dans la teneur en phytate (Stevenson-Paulik *et al.*, 2005). De même, Ali *et al.*, (2013 b) ont développé une approche permettant d'inhiber l'expression du gène *IPK1* par RNAi spécifiquement au niveau des graines. Ceci a abouti à la réduction de la teneur de phytates sans affecter la croissance et le

développement des plantes transgéniques de riz. Ces observations prouvent que la diminution de la teneur d'AP n'est pas nécessairement liée à la diminution de la vigueur des plantes.

Lorsque la mutation affecte les gènes impliqués dans la 1^{ère} étape de la voie de biosynthèse d'AP (MIPS, MIK, et IMP) tel est le cas de la répression du MIPS chez le riz (Ali *et al.*, 2013 a; Kuwano *et al.*, 2006, Kuwano *et al.*, 2009) ou le soja (Hitz *et al.*, 2002, Nunes *et al.*, 2006, Yuan *et al.*, 2007), les mutants *lpa* montrent une diminution des niveaux d'AP accompagnée d'une augmentation équivalente des niveaux du Pi. Mais lorsque la mutation touche l'un des gènes codant des inositol kinases (ex : *IPK1*, *IPK2*) agissant à la fin de la voie de biosynthèse comme observé chez *Atipk1.1* (Stevenson-Paulik *et al.*, 2005), *Osipk1* (Ali *et al.*, 2013 b) ou *Zmipk1* (Shi *et al.*, 2003, Shi *et al.*, 2005), les mutants montrent aussi une accumulation des inositols phosphates moins phosphorylés (jusqu'à cinq résidus de phosphates). D'autres mutants identifiés chez le riz (Xu *et al.*, 2009), le maïs, le soja (Shi *et al.*, 2007) et *A. thaliana* (Nagy *et al.*, 2009), qui sont affectés dans la compartimentation tissulaire, le transfert ou le stockage des phytates, produisent eux aussi des teneurs plus faibles en AP.

En outre, des tentatives d'amélioration de la biodisponibilité du Pi par l'hydrolyse d'AP à travers la transformation génétique des plantes par des phytases d'origine différente ont été réalisés avec succès (Brinch-Pedersen *et al.*, 2002, Lei *et al.*, 2013). Cette stratégie s'est avérée efficace pour produire des graines à faible teneur en AP (**voir partie IV**).

II.4.2. Caractéristiques des mutants *lpa*

La réduction de la teneur en phytates chez les mutants *lpa* affectent souvent la germination, l'émergence et le remplissage des graines ainsi que les réponses aux stress biotiques et abiotiques (Keller *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 2003; Meis *et al.*, 2003; Pilu *et al.*, 2005; Bregitzer et Raboy, 2006; Guttieri *et al.*, 2006; Murphy *et al.*, 2008; Doria *et al.*, 2009; Meng *et al.*, 2009). Cela n'exclut pas l'existence d'exceptions, à titre d'exemple le mutant d'orge *Hvlpal-1* montre des caractéristiques agronomiques similaires ou même meilleures que celles du parent sauvage (Bregitzer et Raboy, 2006). En outre le mutant d'*Arabidopsis* *Atmrp5* présente une tolérance à la sécheresse et est moins sensible à l'ABA (Klein *et al.*, 2003).

D'autres changements du développement racinaire et de la formation des poils absorbants ainsi que de la signalisation du Pi et des réponses à l'ABA et l'IAA ont été rapportés (Gaedeke *et al.*, 2001; Klein *et al.*, 2003; Stevenson-Paulik *et al.*, 2005). En effet des

mutations qui touchent les inositol phosphate kinases chez *Arabidopsis* (*atipk1*, *atipk2β*, *atitpk1* et *atitpk4-1*) aboutissent à des phénotypes plus sensibles à divers stress abiotiques (NaCl, mannitol et H₂O₂) par rapport aux mutants affectés au niveau des gènes intervenant dans les 1^{ères} étapes de la biosynthèse d'AP (*atmik1* et *at2pgk*) et dans le transport d'AP (*atmrp5*).

D'autre part, le mutant *atipk1* montre une perception altérée du Pi puisqu'il se comporte comme s'il était dans un environnement carencé en Pi et forme plus de poils absorbants (Stevenson-Paulik et al., 2005). Ceci suggère que l'AP pourrait intervenir dans la régulation de la perception du Pi.

D'une manière intéressante, la surexpression d'une phytase AtPAP15 appartenant au groupe des phosphatases acides pourpres, produit des mutants *lpa* ayant une réduction de 20 à 30% de la teneur en phytates foliaire. Ces mutants accumulent dans leurs tiges des niveaux d'acide ascorbique deux fois supérieurs à ceux des plantes sauvages et sont plus tolérants aux stress salin et osmotique et moins sensibles à l'ABA. Par contre, deux mutants d'insertion de T-DNA au niveau du gène *AtPAP15* ont révélé une augmentation de 15–20% du taux d'AP, une réduction de 30% de la teneur foliaire en AsA et sont plus sensibles aux stress abiotiques (Zhang et al., 2008; Kuang et al., 2009).

Les effets pléiotropiques observés chez plusieurs mutants *lpa* sont expliqués le plus probablement, par le fait que les métabolites de la voie de biosynthèse d'AP tels que le Ins, Ins(1, 4,5)P₃ et InsP₆ lui-même, pourraient jouer un rôle régulateur clé dans la transduction du signal et le contrôle des réponses des plantes aux contraintes environnementales (Munnik et Vermeer, 2010). Le tableau 3 résume les effets liés à quelques mutants *lpa*.

Tableau 3 : Exemples de mutants *lpa* isolés de différentes espèces végétales et leurs principales caractéristiques

Gène	espèces	Nom du mutant	Effet	Références
<i>MIPS1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>atips1-1</i> (Col), <i>atips1-2</i> (Ws)	*diminution du taux d'AP, Ins dans les feuilles *modification au niveau de la coiffe racinaire, des plantules plus courtes, cotylédons anormaux ...	Murphy et al., 2008 ; Meng et al., 2009
<i>MIPS1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>mips1-2</i> (Col), <i>mips1-3</i> (Col)	*réduction du taux d'Ins, AsA, phosphatidyl inositols * plantes de taille réduite, feuilles frisées, lésions spontanées, une sensibilité accrue à l'ABA et à	Donahue et al., 2010

			l'NaCl lors de la germination	
<i>MIPS2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>atips2</i> (Col)	*réduction du taux d'AP, dans les feuilles * sensibilité aux virus, champignons, bactéries	Murphy <i>et al.</i> , 2008 ; Kim et Tai, 2011 ; Luo <i>et al.</i> , 2011
<i>MIPS1</i>	<i>Glycine max</i>	LR33	* réduction du taux d'AP (50%), d'Ins, raffinose, et de stachyose * germination retardée	Hitz <i>et al.</i> , 2002 ; Meis <i>et al.</i> , 2003 ;
<i>MIPS</i>	<i>Oryza sativa</i>	antisense <i>RINO1</i> under <i>olesin</i> promoter (<i>Ole18</i>)	* réduction du taux d'AP (75%), *altération de l'embryon et de la couche d'aleurone mais pas d'effets négatifs sur le poids des graines, la germination et la croissance des plantes	Kuwano <i>et al.</i> , 2009
<i>IMP</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>vtc4</i>	réduction du taux d'Ins, AsA	Torabinejad <i>et al.</i> , 2009
<i>MIK</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>atmik-1</i>	* réduction du taux d'AP (62%), *repression des IPK2 β , ITPK1, ITPK4, MRP, 2PGK * germination affectée sur NaCl, mannitol, H ₂ O ₂	Kim et Tai, 2011
<i>MIK</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>lpa N15-186</i>	* réduction du taux d'AP (75%), * augmentation du taux d'Ins	Kim <i>et al.</i> , 2008
<i>IPK2β</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>ipk2β-2</i> T-DNA insertion	* réduction du taux d'AP (48%), *repression du MIK, ITPK1, ITPK4, 2PGK *induction des IPK1, MRP *affecte la germination en présence NaCl, mannitol, H ₂ O ₂	Kim et Tai, 2011
<i>ITPK1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>atitpk1</i>	* réduction du taux d'AP (46%), *repression du MIK et 2PGK *induction des IPK1, MRP * germination affectée en condition de stress (NaCl, mannitol, H ₂ O ₂)	Kim et Tai, 2011
<i>IPK1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>ipk1-1</i>	* réduction du taux d'AP (83%), *homéostasie du Pi altérée (feuilles plus petites et épinastiques dans un milieu ayant une concentration standard de Pi * plus de poils absorbants *capacité atténuée à percevoir le Pi dans le milieu extérieur	Stevenson-Paulik <i>et al.</i> , 2005
<i>IPK1</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Gm-lpa-ZC-2</i>	* réduction du taux d'AP (46%), *augmentation de la teneur d'Ins et des inositolphosphate moins	Yuan <i>et al.</i> , 2007

			phosphorylés *plantes plus courtes sans aucune réduction du rendement	
MRP	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>atmrp5-1</i> (Ws)	* résistant à la sécheresse, efficacité d'utilisation d'eau, fermeture des stomates à la lumière *sensibilité réduite à l'ABA pendant la germination	Klein et al., 2003
MRP	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>atmrp5-2</i> (Ws)	*hypersensibilité au stress salin	Lee et al., 2004
MRP	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>lpa1</i>	* réduction du taux d'AP (90%), * absence des effets négatifs sur les traits agronomiques réduction de 25% de la teneur en raffinose et accumulation importante des cations Fer (7 fois plus) dans les graines. * répression générale des gènes (<i>MIPS</i> , <i>IMP</i> , <i>IPK2</i> , <i>ITPKα</i> , <i>IPK1</i>) impliqués dans le voie de biosynthèse d'AP, *sensibilité à l'ABA lors de la germination corrélée avec la diminution du taux d'Ins	Campion et al., 2009
MRP	<i>Zea mays</i>	<i>lpa1-1</i>	* réduction du taux d'AP (66%), *répression du <i>MIPS</i> accumulation d'Ins * germination réduite, vigueur réduite en conditions de stress, morphologie altérée des globoïdes (nombre et taille)	Raboy et al., 2000 ; Shukla et al., 2004 ; Shi et al., 2007 ; Liu et al., 2005 ; Naidoo et al., 2012;
MRP	<i>Oryza sativa</i>	<i>Os-lpa-XS110-2</i>	* réduction du taux d'AP (20%), *réduction de la teneur en Ins, galactose * réduction du poids sec des grains, rendement faible en grains, réduction du taux de germination et du levée	Liu et al., 2007 ; Frank et al., 2007 ; Zhao et al., 2008; Xu et al., 2009;
MRP	<i>Oryza sativa</i>	<i>Os-lpa-XS110-3</i>	* réduction du taux d'AP (100%), *léthal à l'état homozygote	Liu et al., 2007 ; Xu et al., 2009;
PAP	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>OE-PAP15</i> surexpression	*diminution du taux d'AP (20-30%) avec augmentation de celui d'AsA dans les feuilles * meilleure tolérance au sel et une diminution de la sensibilité à l'ABA	Zhang et al., 2008
<i>Sultr3; 3</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>lpa1-1</i> (M422)	* réduction du taux d'AP (50%), *répression de <i>IMP</i> * augmentation du Pi	Bregitzer et Raboy, 2006 ; Raboy et al.,

			*une légère augmentation de taux d'Ins (1,2,3,4,6) P5 * la mutation n'affecte que l'aleurone. la sélection peut supprimer / réduire les traits négatifs	2015 ; Karner <i>et al.</i> , 2004 ; Dorsch <i>et al.</i> , 2003 ; Ye <i>et al.</i> , 2011
<i>Sultr3; 3</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>MH86-1</i> Γ	* réduction du taux d'AP (44%), *augmentation de la concentration du Pi * réduction du poids sec des grains, rendement faible en grains, germination affectée	Liu <i>et al.</i> , 2007 ; Zhao <i>et al.</i> , 2008;

II.4.3. Rôle des InsPs dans les réponses aux contraintes abiotiques

Après la perception des variations du milieu externe, les stimuli sont transférés dans le cytoplasme puis vers le noyau, ce qui provoque un changement de l'expression de gènes spécifiques via une cascade de transduction de signal médiée par l'intervention des messagers secondaires notamment le Ca^{2+} et les ROS, des protéines kinases/phosphatases, et des phytohormones. Les composés de la membrane plasmique jouent également un rôle important en tant que messager secondaires dans la signalisation transmembranaire (revue Taji *et al.*, 2006). Dans ce contexte, nombreuses études ont indiqué qu'au sein des cellules végétales les phosphoinositides et les inositolphosphates sont activés par différents stimuli externes. Et que les gènes codant pour les enzymes qui forment ces composés sont régulés par les stress abiotiques (Munnik et Vermeer, 2010) (**Figure 9**).

La phospholipase C (PLC) donne naissance à deux messagers secondaires le diacylglycérol (DAG) et aussi le *myo*-inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3 ; Ins(1,4,5)P₃) à partir de phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂ ; PIP2), le PPI le plus connu, lui-même produit par une phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase (PIP5K).

Le DAG produit reste ancré dans la membrane plasmique pour activer les membres de la famille de la protéine-kinase C (PKC) (Irvine 2003, 2005; Michell 2008; Berridge 2009) et il peut être catalysé par une DAG kinase (DGK) pour former l'acide phosphatique (PA) impliqué dans la signalisation du stress osmotique (Munnik et Testernik 2009). L'InsP₃ est libéré dans le cytosol pour activer les pompes ioniques et libérer le Ca^{2+} . Lors d'un traitement par l'ABA, une élévation rapide et transitoire de l'Ins(1,4,5)P₃ a été observé dans les cellules de garde de la fève (*Vicia faba*) (Lee *et al.*, 1996). De plus, des micro-injections d'Ins(1,4,5)P₃ dans les cellules de garde ont révélé la capacité de cette molécule à entraîner une augmentation de la concentration cytosolique en calcium (Gilroy *et al.*, 1990), qui est considérée comme l'étape clé dans la fermeture des stomates (Takahashi *et al.*, 2001).

L'augmentation d'Ins(1,4,5)P₃ dans les cellules de garde suggère que ces molécules peuvent agir comme messager secondaire dans la fermeture des stomates induite par l'ABA dans des conditions de déshydratation.

En outre, l'Ins(1,4,5)P₃ est rapidement métabolisé par deux voies enzymatiques qui se résument soit à une phosphorylation, soit à une déphosphorylation. En fait l'Ins(1,4,5)P₃ peut être phosphorylé via des inositolpolyphosphate multikinases (IPK2 et IPK1) pour générer l'InsP₆. Comme il peut former l'Ins(1,4)P₂ sous l'action de l'Ins(1,4,5)P₃ 5-phosphatase (Mg²⁺dépendante), la déphosphorylation peut se poursuivre jusqu'à la régénération du *myo*-inositol. Il a été démontré chez *Arabidopsis* qu'une mutation dans le gène *FRY1* codant une inositol polyphosphate-1- phosphatase impliquée dans le catabolisme de l'IP₃, augmente l'expression des gènes de réponse au stress et à l'ABA, ainsi qu'une hypersensibilité à l'ABA et aux stress (sécheresse et excès de sel) (Xiong et al., 2001). De plus en réponse à l'ABA, la quantité d'InsP₃ accumulée chez le mutant *fry1* est plus élevée que chez le sauvage. La tolérance aux stress abiotiques serait donc liée à la quantité d'InsP₃ (Xiong et al., 2001).

D'autres travaux ont par ailleurs démontré que le niveau d'InsP₆ dans les cellules de garde de *Solanum tuberosum* augmente rapidement (plus de cinq fois) après un traitement par l'ABA (Lemtiri-Chlieh et al., 2000). Cette augmentation cause la libération du Ca²⁺ à partir des sites de stockage intracellulaires qui entraîne l'inhibition des courants K⁺ à rectification entrante (Lemtiri-Chlieh et al., 2000 & 2003) et contribue à la fermeture des stomates. Ceci place, l'InsP₆ et l'InsP₃ parmi les acteurs majeurs de la fermeture des stomates en réponse à l'ABA dans les cellules de garde (Pata et al., 2010; Kim et al., 2010).

Plus récemment l'InsP₆ a été trouvé dans le récepteur de l'auxine (TIR1) (Tan et al., 2007), son précurseur l'InsP₅ est également découvert dans la structure cristalline du récepteur du jasmonate, COI1 (Sheard et al., 2010). Le fait que TIR1 et COI1 font partie de la famille des protéines F-box soulève ainsi l'implication des IPP dans un large éventail de voies de signalisation chez les plantes (Munnik, 2014).

Le *myo*-inositol montre également son implication dans le contrôle des réponses aux stress puisqu'il est considéré comme un précurseur pour plusieurs solutés compatibles (molécules d'ajustement osmotique) (Figure 9) comme le pinitol, qui s'accumule en réponse à un stress hydrique et dont la formation est corrélée à l'amélioration de la tolérance aux stress hydrique et salin (Vernon et Bohnert, 1992a,b). Ou encore pour les oligosaccharides de la famille du raffinose (RFOs) qui sont impliqués dans la protection des plantes contre la salinité, la sécheresse et le froid (Taji et al., 2002; Nishizawa et al., 2008; Valluru et Van den Ende,

2011). D'autres études ont démontré qu'une réduction de 30% de la teneur de ce composé au niveau des graines du mutant d'haricot *lpa1* (280-10) entraîne une hypersensibilité à l'ABA lors de la germination (Panzeri et al., 2011). En revanche, son augmentation chez le mutant AtPAP15, conduit à une sensibilité réduite à l'ABA associé à une accumulation importante d'acide ascorbique dans les feuilles (Zhang et al., 2008). Or, le *myo*-inositol peut servir de précurseur à la biosynthèse d'acide ascorbique chez les plantes (Lorence et al., 2004), qui est un important antioxydant (Noctor, 2006). Par conséquent, le phénotype tolérant observée chez les mutants AtPAP15 pourrait être corrélé à l'augmentation de la concentration foliaire d'AsA.

Dans l'ensemble, toute modification dans le flux des IPP peut soit affecter les processus de signalisation ou la production des solutés compatibles, ou même les deux (Figure 9). Par exemple chez le soja, une mutation qui affecte le MIPS réduit le contenu des graines en InsP₆ et celui en raffinose (Hitz et al., 2002). En plus, la surexpression de l'enzyme MIPS (PcINO1) isolé à partir du riz sauvage (*Porteresia coarctata*), augmente le niveau cellulaire d'inositol et améliore la tolérance des plantes transgéniques de tabac au sel (Majee et al., 2004 ; Das-Chatterjee et al., 2006). La manipulation du niveau intracellulaire des IPP peut avoir donc des effets positifs ou négatifs sur la réponse des plantes aux stress. Ceci est illustré par plusieurs autres exemples (revue Munnik et Vermeer, 2010).

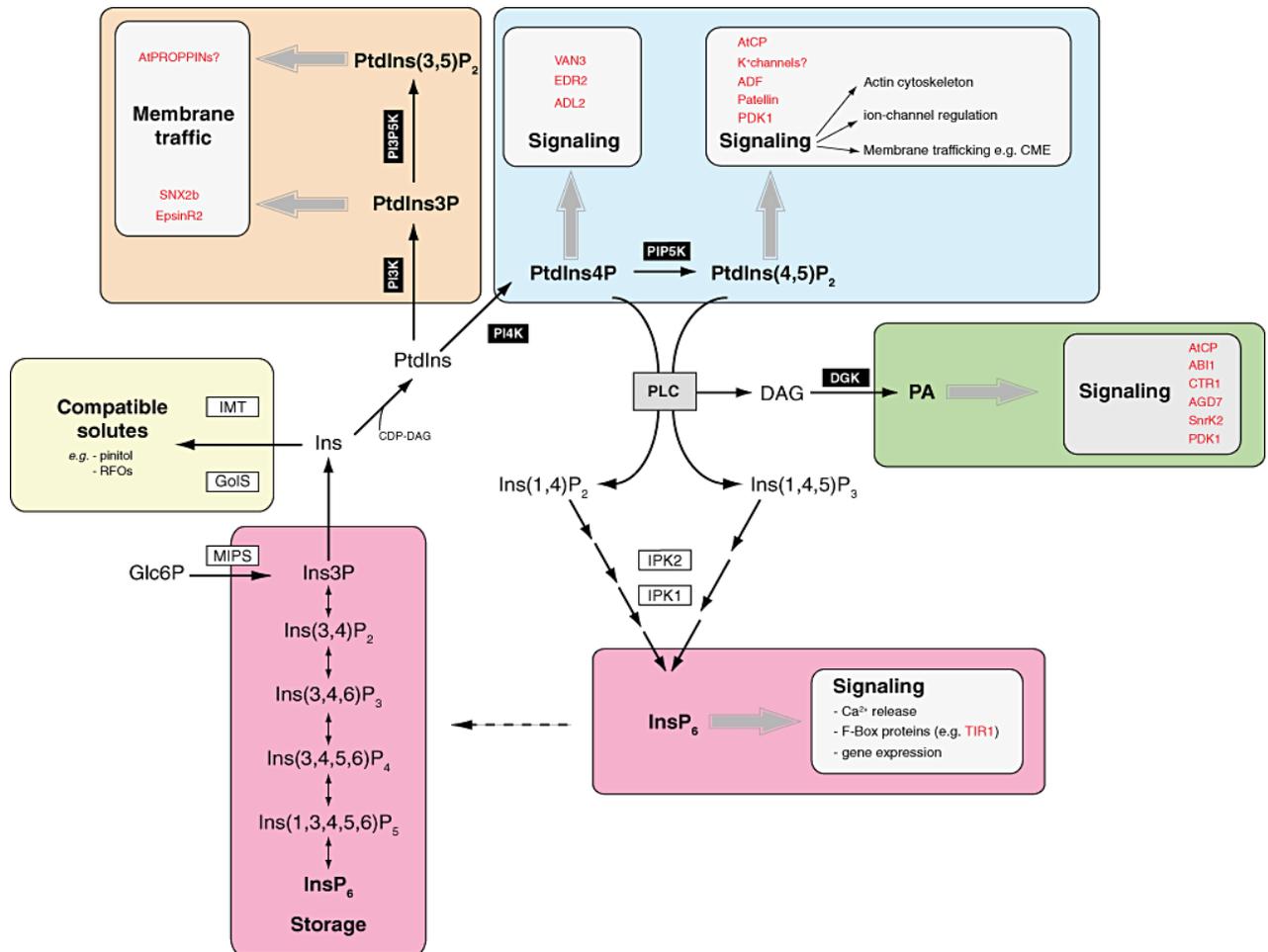


Figure 9: Variations du métabolisme des polyphosphoinositides et des inositolphosphates en réponse à la sécheresse (adapté de Munnik et Vermeer, 2010). Les variations métaboliques induites par la sécheresse peuvent contribuer à la tolérance au déficit hydrique de deux façons : (i) activation de voies de signalisation; (ii) production d'osmoprotectants. La voie de signalisation implique une phospholipase C (PLC) qui hydrolyse le phosphatidylinositol (PtdIns, PI) et/ou le phosphatidylinositolbisphosphate (PtdInsP₂, PIP₂) en inositol bisphosphate (InsP₂, IP₂) ou inositol trisphosphate (InsP₃, IP₃) qui peut être à son tour phosphorylé en inositol hexakisphosphate (InsP₆, IP₆) par les inositol phosphate multikinases (IPK2 et IPK1), ainsi qu'en diacylglycérol (DAG), converti à son tour en acide phosphatidique (PA). L'IP₆ produit induit la libération de calcium intracellulaire, régule l'expression de gènes et/ou active des voies de signalisation dépendantes des Fbox. L'IP₆ peut être également produit via un mécanisme « indépendant des lipides » suite à la phosphorylation de l'IP₃ issu du glucose-6-phosphate (Glc6P). L'IP₆ ainsi formé agit alors comme un osmoprotectant en condition de stress. Les polyphosphoinositides sont produits par des protéines kinases et des phosphatases avec des phosphates en position D3, D4 et/ou D5. Chaque polyphosphoinositide est impliqué dans des voies de signalisation distinctes et a des cibles différentes indiquées en rouge.

III. Interaction entre phosphate et autre éléments minéraux

III.1. Interaction entre phosphate et zinc

Le zinc est un micronutriment essentiel, il joue un rôle majeur dans le métabolisme cellulaire et essentiel pour de nombreux métallo enzymes et facteurs de transcription qui sont impliqués dans divers processus cellulaires.

Chez les plantes, la déficience en Zn est décrite par une nécrose entre les nervures, une déformation et une chlorose foliaire et une réduction de la biomasse et du rendement.

Le transport du Zn dans les plantes commence par son acquisition du sol par les racines, suivie de son chargement dans le xylème. Ces étapes de transport reposent sur une diversité de familles multigéniques codant pour des protéines capables de transporter le Zn, y compris les transporteurs *ZIP* (Zrt/IRT-like protein) (Grotz *et al.*, 1998; Guerinot, 2000; Palmer et Guerinot, 2009), les *CDF* (cation diffusion facilitator ; Mäser *et al.*, 2001), *AtHMA2* et son homologue *AtHMA4* membres de la sous-famille PIB-ATPase qui ont un rôle important dans le chargement du Zn dans le xylème (Hussain *et al.*, 2004; Verret *et al.*, 2004). Une régulation très fine des concentrations intracellulaires en Zn est nécessaire pour le maintien des fonctions du métabolisme cellulaire, ce qui implique probablement la régulation de ces transporteurs de Zn.

L'interaction entre la régulation de l'homéostasie du phosphore et du Zinc a été démontrée chez les plantes (Loneragan *et al.*, 1982; Cakmak et Marschner, 1986; Huang *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2001; Misson *et al.*, 2005; Bouain *et al.*, 2014a; Khan *et al.*, 2014). En fait une relation négative s'établit entre l'accumulation de ces deux éléments qui se résume par le fait que la carence de l'un entraîne la sur-accumulation de l'autre.

Les données transcriptomiques à partir des racines des plantes d'*Arabidopsis* déficientes en Pi ou en Zn ont montré l'induction de nombreux gènes liés au Pi (van de Mortel *et al.*, 2006), et que la carence en Pi modifie l'expression des gènes impliqués dans le maintien de l'homéostasie des métaux tels que le Zn et Fe (Misson *et al.*, 2005; Bustos *et al.*, 2010).

Pris dans leur ensemble, ces données transcriptomiques prouvent l'interconnexion entre les voies de signalisation du Pi et du Zn *in planta*, dans la mesure où plusieurs gènes qui sont induits par la carence en Zn sont réprimés par la carence phosphatée (Bustos *et al.*, 2010; Bouain *et al.*, 2014). Il est intéressant de noter que la majorité de ces gènes sont réprimés chez le mutant *phr1*. Cette observation supporte davantage l'implication de PHR1 dans la régulation de l'expression des gènes liés au Pi en condition de carence en Zn chez

Arabidopsis. Conformément aux travaux de Khan *et al.*, (2014) qui ont montré l'implication de *AtPHR1* dans l'interaction entre l'homéostasie du Pi et celle du Zn.

PHR 1 était connu comme étant un régulateur majeur de la signalisation de la carence en Pi à travers son implication dans la voie de régulation PHR1- miR399-PHO2 (Bari *et al.*, 2006). La suraccumulation du Pi dans les feuilles en réponse à une carence en zinc fait intervenir une voie de régulation autre que celle impliquée dans la régulation de la carence en Pi (PHR1-miR399-PHO2) (Khan *et al.*, 2014). Dans ce contexte Khan *et al.*, (2014) ont identifié deux gènes qui sont impliqués dans le contrôle de l'accumulation du Pi sous condition de carence en Zn, *PHO1* et son homologue *PHO1;H3*. Le rôle de PHO1 dans le chargement du Pi des racines vers les feuilles a été bien documenté (Hamburger *et al.*, 2002). Il est probablement l'une des cibles finales de la voie de signalisation de la carence en zinc. Puisque son niveau d'expression demeure inchangé en réponse à une carence en zinc, l'hypothèse proposée est que son activité serait régulée par le biais d'une interaction protéine-protéine, sachant qu'un mécanisme similaire impliquant PHO1 et PHO2 a déjà été rapporté (Liu *et al.*, 2012).

Le gène *PHO1; H3* semble être spécifiquement et fortement induit par la carence en zinc. Lorsqu'il est cultivé en condition sans Zn, le mutant *pho1;h3* accumule dans les feuilles une teneur plus élevée en Pi que les plantes sauvages contrairement aux conditions standard où le mutant et le sauvage accumule des niveaux identiques. En outre, la similarité de la localisation subcellulaire entre PHO1; H3 et PHO1 indique que ces deux protéines pourraient jouer un rôle similaire dans le transport du Pi des racines jusqu'aux feuilles (Khan *et al.*, 2014). Cependant, des études antérieures ont montré que *PHO1;H3* exprimé sous le contrôle du promoteur du *PHO1* n'arrive pas à compléter le mutant *pho1* (Stefanovic *et al.*, 2007). Ainsi il a été suggéré que PHO1; H3 régule négativement l'activité de PHO1. Cette hypothèse est appuyée par le fait que PHO1 semble être nécessaire pour la sur-accumulation du Pi dans les feuilles en réponse à une carence en Zn et que le double mutant *pho1 pho1;h3* montre une teneur foliaire en Pi équivalente à celle du mutant *pho1* indépendamment du statut du Zn dans le milieu de culture (Khan *et al.*, 2014). En effet un modèle intégratif de la régulation des gènes impliqués dans la réponse à la déficience en Pi et en Zn a été proposé (Figure 10; Bouain *et al.*, 2014; Khan *et al.*, 2014).

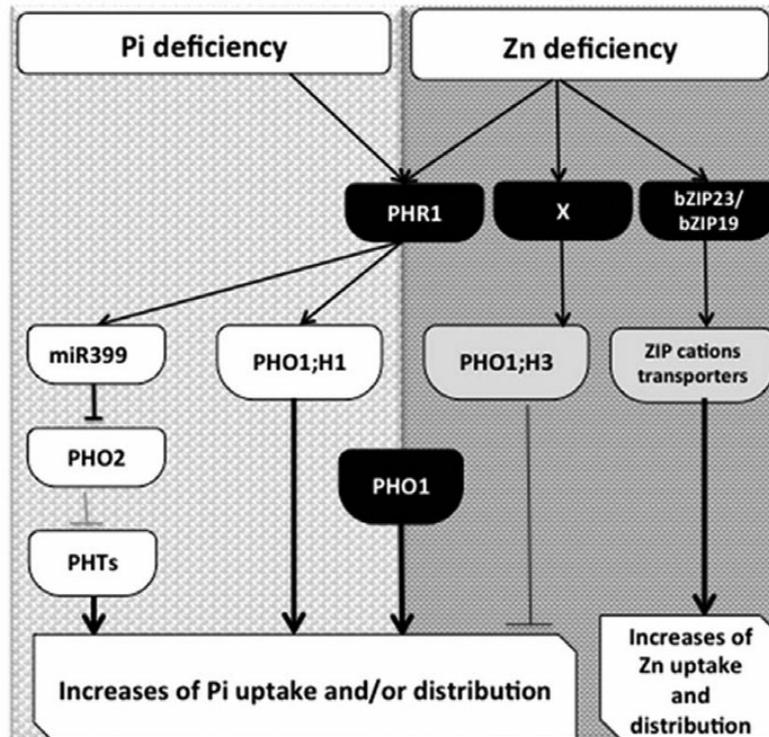


Figure 10 : Représentation schématique des interconnexions entre les voies de régulation impliquées dans la réponse des plantes à la carence en phosphate et en Zinc. En condition déficiente en Pi, la voie PHR1-miR399-PHO2-PHT est activée. Les voies de signalisation impliquant bZIP23 et bZIP19 et les gènes spécifiques dans le transport des cations sont activés en absence de Zn (Assuncao et al., 2013). PHO1;H3 qui est induite par la carence en zinc, et les protéines PHR1 et PHO1 contribuent à l'interaction Zn-Pi. Les effets régulateurs négatifs et positifs sont indiqués par des lignes grises et des flèches noires, respectivement.

III.2. Interaction entre phosphate et fer

Des liens physiologiques ont été établis entre le Pi et Fe (Hirsch et al., 2006; Ward et al., 2008). Dans le sol, le P est peu soluble et forme des précipités avec des cations tels que le Fe, ce qui baisse la disponibilité de ces deux éléments pour les plantes. La déficience en Pi est associée à la sur-accumulation des métaux Fe et aussi de zinc et d'aluminium. D'un point de vue développemental, l'inhibition de la croissance de la racine primaire en réponse à une carence en Pi est en partie due à la toxicité (via une sur-accumulation) du Fe (Ward et al., 2008; Ticconi et al., 2009).

Une fois absorbé par les racines, le Pi est transféré jusqu'aux parties aériennes, mais le fer peut interagir avec le Pi à l'intérieur des racines limitant ainsi son transfert vers les feuilles (Cumbus et al., 1977; Mathan and Amberger, 1977). Une telle interaction a été décrite aussi dans les feuilles, où un contenu élevé en Pi entraîne la chlorose même si le niveau de Fe est suffisant dans les feuilles (Dekock et al., 1978). Dans les graines, la majorité du Fe serait

associé au phytate sous forme de précipités vacuolaires dans les globoïdes. Ce qui indique que le phytate est un chélateur très puissant du fer (Lanquar et al., 2005). Par conséquent, les changements dans l'homéostasie du Pi influencent fortement la disponibilité du Fe.

À l'échelle moléculaire, l'analyse des données transcriptomiques des plantes déficientes en Pi ont révélé l'augmentation de l'abondance des transcrits des gènes de réponse à l'excès de fer et réciproquement une diminution des transcrits des gènes de réponse à la déficience en fer (Misson et al., 2005; Müller et al., 2007; Thibaud et al., 2010). Dans ce contexte, l'induction du gène *AtFER1* codant la ferritine, une protéine de stockage du Fe, en réponse à une carence en Pi a été interprétée comme une conséquence de l'augmentation de l'accumulation de Fe sous ces conditions (Hirsch et al., 2006). Chez le double mutant de perte de fonction des gènes *PHR1* et son homologue (*PHL1*) l'induction d'*AtFER1* n'est plus observée en absence de Pi indiquant que ces deux facteurs de transcription régulent l'expression de cette ferritine. Cependant l'activation de l'expression d'*AtFER1* par *PHR1* s'effectue indépendamment du statut de la plante en fer. En outre, la distribution altérée du fer chez le double mutant *phr1 phl1* révèle le rôle de ces deux facteurs de transcription dans la régulation de l'homéostasie du Pi et aussi celle du Fe (Bournier et al., 2013).

III.3. Interaction entre phosphate et sulfate

Il a été rapporté que lorsque des plantes d'*Arabidopsis* sont soumises à une carence en Pi les phospholipides sont remplacés rapidement par des sulfolipides, que ces derniers sont remplacés par des phospholipides en cas de carence en soufre (Essigmann et al., 1998; Hartel et al., 1998; Yu et al., 2002; Sugimoto et al., 2007). Un tel métabolisme de substitution entre ces deux éléments prouve une inter-dépendance nutritionnelle entre le Pi et le SO_4 .

Fait intéressant, deux gènes *SQD1* and *SQD2*, nécessaires pour le remplacement des phospholipides par des sulfolipides, contiennent dans leur région promotrice la boîte P1BS (*PHR1* Binding Site) et sont induits par la carence phosphatée d'une manière dépendante du facteur de transcription *PHR1* (Franco-Zorrilla et al., 2004; Stefanovic et al., 2007). Des études plus récentes ont révélé l'existence d'une interaction entre les voies de signalisation du Pi et du SO_4 régulée par *PHR1*. En effet, il a été démontré que la concentration en sulfate augmente dans les racines alors qu'elle diminue dans les feuilles chez les plantes d'*Arabidopsis* déficientes en Pi (Rouached et al., 2011). Ce qui indique la régulation adaptative des mécanismes du transport de SO_4 chez les plantes carencées en Pi et particulièrement de la distribution inter-organe de cet élément. En outre, il a été établi que

PHR1 est requis pour la mise en place de ces mécanismes de régulation probablement par la régulation de l'expression des transporteurs de SO_4 *SULTR1;3*, *SULTR2;1* et *SULTR3;4* (Rouached *et al.*, 2011).

IV. Les phytases :

La libération du P stocké sous forme de phytate se fait grâce à un groupe d'enzymes de type phosphatases spécifiques. Ces enzymes connues sous le nom de phytases (ou myo-inositol hexaphosphate phosphohydrolase), sont des phosphomonoestérases qui hydrolysent de manière séquentielle le phytate pour donner le P_i , des inositol phosphate moins phosphorylés, éventuellement le *myo*-inositol libre (Ins) et aussi des cations qui pourraient être liés à celui-ci par chélation (**Figure 11**).

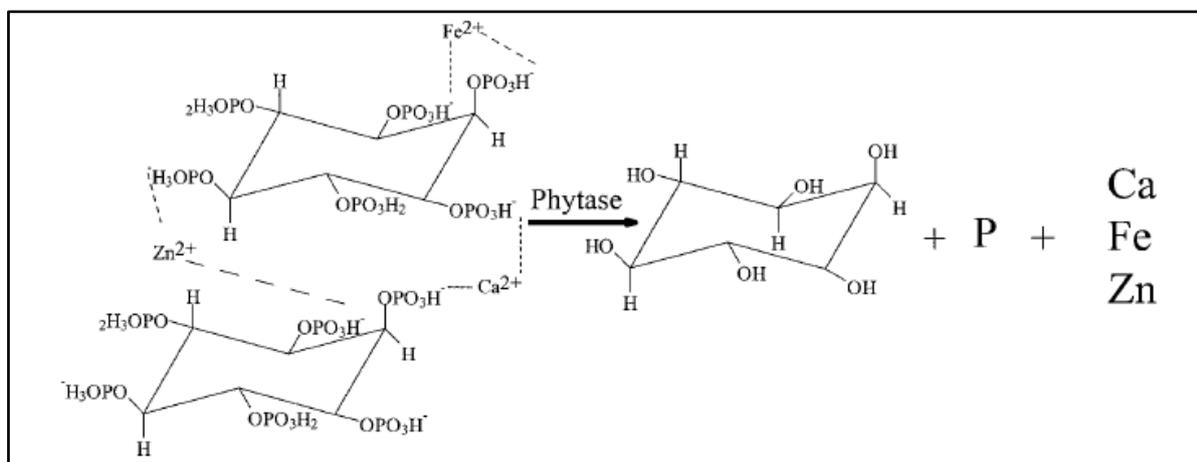


Figure 11: Mécanisme d'action d'une phytase sur l'acide phytique.

IV.1. Rôle des phytases

Les phytases sont très répandues dans la nature. Elles ont été détectées chez les micro-organismes, les végétaux et certains tissus animaux.

Chez les plantes, la phytase de blé est connue depuis longtemps, et d'autres phytases ou phosphomonoestérases ont été isolées à partir du maïs (Hubel et Beck, 1996), du Lys (Scott et Leowus, 1986), de la féverole (Greiner *et al.*, 2001), de l'orge (Greiner *et al.*, 2000), du riz (Hayakawa *et al.*, 1989), du soja (Gibson et Ullah, 1988), etc... Les différentes phytases présentes dans les graines agissent lors de la germination des semences (Hatazck *et al.*, 2001) pour assurer la libération du P_i ainsi que du *myo*-inositol qui est un important facteur de croissance.

Cependant l'activité de ces phytases endogènes est jugée incapable d'aider les plantes à utiliser le phytate lorsqu'il est présent dans le milieu extérieur comme seule source de P (Hayes *et al.*, 1999 et 2000, Richardson *et al.*, 1999 et 2000). Pourtant, chez certaines espèces de plantes les phytases sont sécrétées par les racines dans des conditions limitantes en P (Asmar, 1997; Li *et al.*, 1997a). L'augmentation des activités de phytases sécrétées sous la déficience en P est très significative. Pour le cas de la tomate, l'activité de la phytase sécrétée est environ 10 fois plus élevée que celle des plantes contrôles cultivées avec un apport suffisant en P (Li *et al.*, 1997). Ceci indique que la sécrétion de phytases sous des conditions stressantes en Pi chez certaines plantes pourrait constituer une stratégie efficace pour mobiliser les réserves de phytate du sol (Li *et al.*, 1997). Cependant, une étude plus récente montre que la majorité des plantes ne secrètent pas leurs phytases. Tel est le cas d'*Arabidopsis* où l'activité phytasique constitue moins de 0,8% de phosphomonoestérases totales dans les extraits racinaires et elle n'est pas détectable dans le milieu extérieur (Richardson *et al.*, 2001).

Ainsi la génération de plantes exprimant suffisamment de phytases (extra ou intracellulaires) permet d'améliorer l'acquisition du P à partir du phytate du sol et de développer des produits pour l'alimentation animale plus respectueux de l'environnement.

Chez les micro-organismes, les phytases sont synthétisées en réponse à un manque de phosphate. Différentes études montrent que les phytases microbiennes sont plus efficaces pour la libération de Pi que les phytases végétales (Tarafdar *et al* 2001). En effet chez les bactéries sécrétées telles que *Bacillus spp.* (Kerovuo *et al* 1998, Choi *et al* 2001), *Pseudomonas* (Irving *et Cosgrove*, 1971) et *Klebsiella* (Greiner *et al.*, 1997), les phytases sont sécrétées, contribuant ainsi à rendre le Pi issu de l'AP disponible pour les plantes. Dans ce contexte, les microorganismes de la rhizosphère produisant des phytases exogènes peuvent agir comme des PGPRs (plant-growth-promoting rhizobacteria) tout en stimulant la croissance des plantes suite à l'acquisition du Pi à partir du phytate du sol. (Richardson *et al.*, 2009 ; Konietzny *et Greiner*, 2004; Idriss *et al.*, 2002; Sajidan *et al.*, 2004 ; Maougal *et al.*, 2014).

À la différence des phytases végétales, les phytases microbiennes présentent deux optimums de pH situés à 2.5 et à 5.5, ce qui constitue un avantage pour l'utilisation alimentaire car elles restent actives dans les différentes parties du tractus digestif (Rama Rao, 2001 ; Frapin, 1996). Par ailleurs, elles sont plus résistantes à la chaleur, leur activité étant moins sensible aux procédés de fabrication alimentaire. Simon *et al.*, (1990) rapportent que

96% de l'activité de la phytase produite par *A. ficuum* est maintenue après passage de l'aliment à 50°C et 78°C.

Pour le cas des cellules animales, le rôle des phytases reste encore obscur. Toutefois, une enzyme, la multiple inositol polyphosphate phosphatase (MIPP) ayant une homologie au niveau d'une proportion de 18 acides aminés avec la phytase fongique (phytase A) d'*Aspergillus* en conservant le motif caractéristique de la famille HAP, possède une activité catalytique pour les inositol polyphosphates (Craxton et al., 1997).

IV.2. Classification et propriétés des phytases

Les phytases sont des hexakisphosphohydrolases qui hydrolysent les liaisons phospho-esters présentes dans l'AP. Deux types de classification de phytases ont été proposés. Une première classification basée sur la position du premier phosphate hydrolysé, permet de distinguer deux groupes :

Les 3-phytases (EC 3.1.3.8) : *myo*-inositol hexakisphosphate 3-phosphohydrolases débutent la déphosphorylation de l'AP sur la position 3 produisant du 1D-*myo*-inositol 1,2,4,5,6-pentakisphosphate et du Pi. Ce sont en général les phytases produites par des micro-organismes.

Les 6-phytases (EC 3.1.3.26) : *myo*-inositol hexakisphosphate 6-phosphohydrolases commencent la déphosphorylation de l'AP à la position 6 produisant du 1D-*myo*-inositol 1,2,3,4,5-pentakisphosphate et du Pi. Ce sont en général les phytases des céréales et les graines oléagineuses des plantes supérieures.

Dans certains cas, la déphosphorylation se poursuit jusqu'à la production de InsP₁ (Lei et al., 2003) et les produits finaux de la déphosphorylation complète de l'AP sont donc le *myo*-inositol et six phosphates inorganiques.

Une seconde classification basée sur la structure de la protéine, leur spécificité de substrat, leur pH optimal et leur mécanisme d'hydrolyse permet de distinguer quatre familles de phytases : les phytases appartenant à la famille des Histidine Acide Phosphatases (HAP, EC 3.1.3.8), les phytases en forme d'hélice β - β -propellar phytases (β PP, EC 3.1.3.8) ", les Phosphatases acides Pourpres (PAP, EC 3.1.3.2) et les phytases de type Protéine Tyrosine Phosphatases (PTP) (Ma et al., 2009).

Les HAPs phytases:

Ce groupe comprend essentiellement les phytases fongiques comme celles d'*Aspergillus niger* (Piddington et al., 1993), *A. fumigatus* (Pasamontes et al., 1997) et *A. aculeatus* (Ma et al., 2010), des phytases de levure comme celle de *Kodamaea ohmeri* (Li et al., 2009a) ainsi

que les phytases bactériennes comme celle d'*E. coli* (Dassa et al., 1990), *Citrobacter amalonaticus* (Luo et al., 2007), *Yersinia rohdei* (Huang et al., 2008) et *Klebsiella* sp.ASR1 (Sajidan et al., 2004) ainsi que certaines phytases de plantes et d'animaux.

Ces enzymes sont caractérisées par la présence du motif RHGXXRP très conservé au niveau de leur site actif. Elles utilisent l'histidine catalytique de ce motif pour effectuer une attaque nucléophile donnant un intermédiaire phospho-histidine au cours de la première étape de catalyse, suivie dans une deuxième étape, par l'hydrolyse de cet intermédiaire (Mitchell et al., 1997). La plupart des phytases disponibles actuellement sur le marché mondial sont des HAP d'espèces d'*Aspergillus*. Ces enzymes sont actives essentiellement à un pH acide, thermolabiles et possèdent une large spécificité de substrat puisqu'elles sont actives sur de nombreux phospho-esters (autres que l'AP) et sont capables de libérer jusqu'à cinq groupements Pi lorsque l'AP ne complexe aucun métal (Wyss et al., 1999 ; Oh et al., 2004).

Les PTPs phytases:

Parmi les membres de ce groupe, on cite les phytases de *Selenomonas ruminantium* (Chu et al., 2004) et *Mitsuokella multacida* (Gruninger et al., 2009). Les phytases de ce type sont également connues comme cystéine phytases, étant donné que la cystéine de leur site actif est conservée et joue un rôle important dans la catalyse. Ces enzymes hydrolysent jusqu'à cinq liaisons phosphate de l'AP à un pH optimal de 4 à 5,5 (Mullaney et Ullah, 2007 ; Puhl et al., 2007).

Les PAP phytases:

Elles sont principalement des phytases végétales, assurant l'acquisition du Pi et sa redistribution en raison de leur capacité à hydrolyser de nombreuses substrats phosphorylés (Cashikar et al., 1997; Lung et al., 2008). Tous les membres de ce groupe contiennent un ensemble caractéristique de 7 acides aminés «DDYNHHH» contenus dans les 5 motifs conservés DXG, GDXXY, G_NH(D/E), VXXH et G_HXH impliqués dans la coordination du métal dans le site diatomique chez les plantes (Hegeman et Grabau, 2001; Li et al., 2002). Parmi les PAPs, on cite : «GmPHY» exprimée dans les cotylédons de soja en germination (*Glycine max*) (Hegeman et Grabau, 2001) et PAPhy exprimée dans les feuilles et les racines de *Medicago truncatula* connue comme une phytase sécrétée contribuant à l'acquisition du Po (Xiao et al., 2005). Chez l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* 29 gènes PAP ont été identifiés dont plusieurs sont induits lors d'un manque du Pi incluant *AtPAP12* et *AtPAP26*; et qui permettent le recyclage du Pi intracellulaire en cas de stress phosphaté ainsi que la

remobilisation du Pi à partir des feuilles sénescents (Veljanovski et al., 2006; Hurley et al., 2010; Robinson et al., 2012). *AtPAP15* possède une activité phytase et son expression influence positivement la synthèse d'AsA (Zhang et al., 2008) alors qu'*AtPAP17* serait impliqué dans la mobilisation du P et dans le métabolisme des ROS lors de la sénescence (del Pozo et al., 1999).

Chez les céréales comme le blé, l'orge, le maïs et le riz, les PAP sont groupées en deux types ; celles qui sont exprimées dans les grains au cours de la germination et d'autres qui sont synthétisées et stockées durant le remplissage des graines (Dionisio et al., 2011).

Les β PP phytases :

Contrairement aux HAP, les β PP sont connues comme phytases alcalines. Ce groupe comprend essentiellement les phytases métallo-dépendantes originaires de *Bacillus*. A titre d'exemple on peut citer celles produites par *Bacillus subtilis* US417 (Farhat et al., 2008), *Bacillus amyloliquefaciens* sp. DS11 (Kim et al., 1998a), *Bacillus subtilis* VTTE-68013 (Kerovuo et al., 1998) et *Bacillus* sp. MD2 (Tran et al., 2010). Ces enzymes nécessitent le calcium pour leur activité catalytique et sont actives de manière optimale à des pH proches de la neutralité (6-8). En addition, elles sont thermostables et possèdent une forte spécificité pour l'AP (Fu et al., 2008). Elles hydrolysent préférentiellement une liaison phosphate sur deux et libèrent ainsi trois groupements phosphate au maximum en donnant l'InsP₃ comme produit final (soit Ins(1,3,5)P₃ ou Ins(2,4,6)P₃) (Hara et al., 1985; Kerovuo et al., 2000 ; Oh et al., 2004).

Les propriétés physico-chimiques de la phytase PHYU-S417 :

Les propriétés physico-chimiques de la phytase isolée de la souche de *Bacillus subtilis* PHY-US417 qui fait l'objet d'étude de cette thèse ont été largement étudiées (Farhat et al., 2008) et se résument comme suit:

* Effet de la concentration du substrat

La PHY-US417 montre une activité proportionnelle à la concentration de substrat (AP). Le maximum d'activité est atteint en présence de 3 mM d'AP et au-delà de cette concentration l'activité se stabilise et demeure constante.

* Effet de la température

Cette enzyme possède une température optimale d'activité de l'ordre de 55°C. A titre de comparaison, les phytases PhyC de *Bacillus subtilis* VTTE-68013 (Kerovuo et al., 1998) et *Bacillus subtilis* (Powar et Jagannathan, 1982), possèdent la même température optimale, tandis que celle de *B. amyloliquefaciens* TS-Phy est de 70°C (Kim et al., 1998). En revanche,

PHY-US417 se distingue par une plus forte thermostabilité par rapport à d'autres phytases (comme celle de *B.subtilis* VTTE -68013 (Kerovuo et al., 2000)), puisqu'elle maintient 77% de son activité après traitement thermique à 75°C durant 10 minutes en présence de 5 mM de CaCl₂. En absence de calcium, elle retient uniquement 22% de son activité après incubation 10 min à 60°C. Ceci prouve que la thermostabilité de cette phytase est améliorée par la présence de calcium (Farhat et al., 2008).

* Effet du pH

Comme la plupart des phytases du genre *Bacillus*, PHY-US417 possède un pH optimum dans la zone de neutralité (7.5). Cette enzyme garde une activité relative supérieure à 60% à des pH allant de 6 à 8.5 et elle est complètement inactive à des pH acides (≤ 4.5) ou fortement alcalins (≥ 10).

* Effet de la concentration du calcium sur l'activité de PHY-US417

Semblablement aux autres phytases calcium-dépendantes, PHY-US417 n'est active qu'en présence de calcium. A son pH optimum 7.5, l'activité maximale de cette enzyme est atteinte en présence de 1 mM de CaCl₂ (et garde plus de 75% de son activité à 10 mM CaCl₂) alors qu'à un pH acide 5.5 cette enzyme nécessite plus de calcium (5 mM) pour son activité maximale (Farhat et al., 2008). Ceci est probablement dû à une protonation des résidus de fixation du calcium dans l'enzyme et les groupements phosphates dans le substrat à pH acide (Oh et al., 2001).

* Effet des inhibiteurs

Il est établi que les phytases métallo-dépendantes de *Bacillus* sont fortement inhibées par l'EDTA. C'était le cas pour PHY-US417 qui est totalement inactivée à des concentrations d'EDTA ≥ 1 mM.

IV.3. Application des phytases :

Les phytases sont couramment utilisées comme additifs dans les rations des animaux monogastriques (Lei et Porress, 2003 ; Greiner et Knietzny, 2006) afin d'augmenter la valeur nutritionnelle des aliments tout en améliorant la biodisponibilité du P-phytique, des minéraux et des protéines. De même, l'addition de phytase a été suggérée pour dégrader les phytates dans les produits alimentaires riches en céréales afin de lutter contre la déficience minérale dont souffrent plusieurs personnes surtout dans les pays sous-développés (Cameri et al., 1998).

Plusieurs études ont montré que la capacité des plantes à acquérir le Pi à partir des phytates peut être améliorée lorsqu'une phytase purifiée est ajoutée dans le milieu de culture (Hayes et al., 2000 ; Findenegg et Nelemans 1993) ou lorsque les plantes sont cultivées dans des milieux inoculés avec des microorganismes ayant une activité phytase extracellulaire (Richardson et al., 2000 , Idriss et al., 2002).

* Ingénierie de plantes surexprimant des phytases

La génération de plantes transgéniques exprimant des phytases peut être utilisée comme alternative à l'addition de phytase que ce soit dans les aliments ou les milieux de culture. Ces plantes transgéniques sont considérées dans ce cas comme bioréacteur pour la production de phytase. Plusieurs phytases d'origine fongique, bactérienne ou végétale ont été exprimées dans divers espèces végétales soit de manière intracellulaire ou sécrétée afin d'augmenter la disponibilité des réserves de phosphate (dans les graines ou le sol) et d'améliorer la croissance des plantes dans des conditions limitantes en Pi.

À titre d'exemple l'expression de phytase bactérienne chez les plantes de tabac améliore la mobilisation du P présent dans les cellules et stimule la croissance des plantes transgéniques cultivées surtout en cas de stress phosphaté (Yip et al., 2003). En outre, l'expression constitutive d'une phytase recombinante (PhyA) d'*Aspergillus niger* chez des plantes de riz permet d'augmenter le contenu du Pi dans les plantes transgéniques de 57% par rapport aux plantes sauvages (Liu et al., 2006).

D'autres études ont consisté à cibler l'expression de gènes phytases dans les graines, qui sont destinées à l'alimentation animale pour résoudre les problèmes liés aux effets antinutritionnels des phytates (Pen et al., 1993 ; Ponstein et al., 2002).

D'autre part, l'expression des gènes codant pour des phytases dans les plantes transgéniques de manière sécrétée permet aux plantes de surmonter leur incapacité à acquérir le Pi à partir du phytate présent dans le milieu de culture et influence positivement leur croissance. A cet égard, plusieurs gènes codants des phytases ont été testés chez différentes espèces telles que la pomme de terre, le trèfle souterrain, le coton, le colza (*Brassica napus*), le trèfle blanc, le tabac et *Arabidopsis* (George et al., 2004; George et al., 2005; Liu et al., 2011; Ma et al., 2009; Wang et al., 2013; Xiao et al., 2005; Zimmeman et al., 2003 ; Richardson et al. 2001). Dans le cas de PHYA d'*A. niger*, sa sécrétion à partir des racines d'*Arabidopsis* a été réalisée en transférant la séquence codante de cette phytase fusionnée à un peptide signal d'une extensine de carotte (Richardson et al., 2001). En conséquence, l'activité

phytasique mesurée au niveau des racines des lignées transgéniques exprimant l'*ex::phyA*, augmente de 20 fois, et la croissance ainsi que la teneur en P de ces plantes sont comparables à celles des plantes témoins cultivées dans des conditions standard.

D'autres approches ont été développées afin d'assurer une expression de la phytase spécifique du système racinaire, étant donné que ce tissu constitue le site d'absorption du phosphate disponible pour les plantes. Ainsi, des plantes transgéniques de soja ont été générées suite à l'intégration du gène codant pour une phytase d'*A. ficuum* (AfPhyA) associé au peptide signal de la carotte extensine et mis sous le contrôle du promoteur du gène *Pky10* d'*Arabidopsis* codant pour une myrosinase racinaire et ont été utilisés pour que la phytase exprimée soit secrétée spécifiquement par les racines. L'activité phytasique et le niveau du Pi mesurés dans les racines de ces plantes transgéniques étaient respectivement 4.7 U/mg de protéine et 439 $\mu\text{mol/l}$ par rapport à 0.8 U/mg de protéine et 120 $\mu\text{mol/l}$ pour les plantes sauvages du soja utilisées comme contrôle (Li et al., 2009). De plus, Mudge et al., (2003), ont utilisé le promoteur d'un transporteur de phosphate PHT1-2 pour diriger l'expression du gène phytase (*phyA*) d'*A. niger* vers l'épiderme racinaire des plantes d'*Arabidopsis*. Ces plantes transgéniques sont capables d'utiliser le phytate comme source alternative de P en condition contrôlée.

Dans la plupart des cas, les effets positifs sur la croissance des plantes transgéniques qui exsudent des phytases sont observés dans des conditions de culture stériles mais pas en sol. En revanche, Zimmermann et al., (2003) ont rapporté que les plantes transgéniques de pomme de terre sécrétant une phytase par leurs racines acquièrent une meilleure assimilation du P-phytique en conditions non stériles (quartz, limon plus tourbe) arrosées par une solution contenant l'AP. De même, il a été démontré que la sécrétion de la phytase fongique *phyA* à partir des plantes transgéniques de tabac ne conduit à l'amélioration de la nutrition phosphatée dans un sol déficient en P que lorsque celui-ci est amendé avec le phytate (George et al., 2005).

Plus récemment, Ma et al., (2011), ont réussi à démontrer que l'expression d'une phytase isolée de *Medicago truncatula* (*MtPAP1*) sous le contrôle d'un promoteur du transporteur de phosphate *MtPT1*, et qui est spécifiquement secrétée par les racines en condition de stress phosphaté influence positivement la production de biomasse des plantes transgéniques de Luzerne (*Medicago sativa* L.) grâce à l'amélioration de l'utilisation du Po lorsqu'elles sont cultivées dans des conditions naturelles (sol) et sans ajout de P.

L'ensemble de ces approches biotechnologiques basées sur la transgénèse montre ainsi qu'il est possible d'améliorer la disponibilité du P-phytique et une telle avancée aura des effets bénéfiques considérables notamment dans le développement d'une agriculture durable plus respectueuse de l'environnement et ce en limitant l'usage excessifs des engrais phosphatés.



Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

I. Matériels biologiques

I.1. Matériel végétal et conditions de culture

Les plantes d'*Arabidopsis thaliana* sauvages écotype Columbia (Col-0) ont été utilisées au cours de ce travail. Les lignées transgéniques surexprimant PHY-US417 (avec une forme intracellulaire « PHY » et une forme sécrétée « ePHY ») obtenues suite à la transformation des plantes d'*Arabidopsis* Col-0. Le mutant *ipk1-1* (SALK_065337, [Stevenson-Paulik et al., 2005](#)). La lignée mutante *pht1;4* exprimant le gène rapporteur GUS sous le contrôle du promoteur *PHT1;4* (Pht1;4::GUS) ([Misson et al., 2004](#)) ainsi que les mutants *pht1;4* et *pht1;1-1;4* ([Shin et al., 2004](#)) ont été utilisés et fournis par Dr. Laurent Nussaume (CEA, Cadarache).

Pour l'ensemble des tests de culture *in vitro*, les graines des différentes plantes sont d'abord stérilisées par agitation pendant 5 min dans la solution de stérilisation (éthanol 50%, javel 37.5%, H₂O 12.5% (v/v)). Elles sont ensuite lavées 5 fois par l'eau stérile et séchées sur des filtres stériles sous hotte à flux laminaire. Ensuite, elles sont semées sur un milieu MS standard ([Murashige et Skoog, 1962](#)) (annexe 3), carencé en éléments minéraux (-P, -Zn, -Fe) ou additionné de NaCl, de mannitol ou d'ABA. Ces graines sont ensuite placées 2 jours à l'obscurité et à 4°C afin de synchroniser leur germination. Ensuite, elles sont cultivées en chambre de culture à 22°C avec 70 % d'humidité relative en conditions de jours longs (photopériode de 16 h jour/8h nuit).

La variété de Tabac *Nicotiana tabacum cv.Xanthi* a été utilisée lors des tests de co-culture avec les plantes transgéniques qui sécrètent la phytase (e-PHY). Les graines de tabac sont semées sur milieu MS solide pendant 15 jours. Les jeunes plantules sont transférées par la suite sur un support en plastique dans des boîtes magenta contenant du MS liquide à côté des lignées sécrétrices de phytase (ePHY) ou des plantes sauvages (Col-0).

I.2. Souches bactériennes

I.2.1. *Escherichia coli*

La souche d'*Escherichia coli* employée dans les expériences de transformations lors des différents clonages est la souche *TOP10*. Cette souche dérive de la souche DH5 α et possède le

génotype suivant F-*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *deoRn* *nupG* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL*(Str^R) *endA1* λ^-

I.2.2. *Agrobacterium tumefaciens*

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 est utilisée dans les expériences de transformation des plantes. Cette souche est résistante à la rifampicine et à la gentamycine.

Toutes les souches recombinantes ont été cultivées sur milieu LB liquide (NaCl 10 g.L⁻¹, tryptone 10 g.L⁻¹, extraits de levure 5 g.L⁻¹) sous agitation et en présence des agents sélectifs appropriés. Pour la culture en milieu solide, le milieu LB est additionné d'agar à 1,5% (p/v).

I.3. Vecteurs de clonage

Les vecteurs de clonage qui ont été utilisés lors de ce travail sont les suivants :

- **pCAMBIA 1302** (<http://www.cambia.org/daisy/cambia/585>) : C'est un vecteur binaire de taille 10549 pb utilisé couramment pour l'expression stable de transgènes par transformation de plantes. La sélection du plasmide dans les bactéries se fait en présence de kanamycine. Il contient entre les bordures droite et gauche de l'ADN-T, le promoteur 35S du CaMV, un site de clonage multiple, le terminateur Nos-polyA et le gène *HPTII* (qui confère à la plante une résistance à l'hygromycine) sous le contrôle des promoteur et terminateur CaMV 35S. L'origine de répllication est reconnue par les réplicases d'*E.coli* et d'*Agrobacterium*. Ce plasmide a été utilisé pour le clonage du gène *PHY-US417* (accession n° AM501550) de *B. subtilis* dans les sites *BglIII* et *SpeI* (forme intracellulaire) et de celui-ci fusionné à la séquence codante du peptide signal de l'extensine d'*Arabidopsis* Ext3 dans les sites *SpeI* et *PmlI* (forme sécrétée).

- **pGEM-T Easy (Promega)** (3015 pb) : Ce vecteur est utilisé pour le clonage des produits d'amplification par PCR dans *E. coli*. Ce plasmide linéaire possède une thymidine à chacune de ses extrémités 3'OH, permettant d'augmenter l'efficacité de ligation des produits PCR obtenus avec l'ADN polymérase. Celle-ci rajoute en effet une molécule d'ATP aux extrémités 3'OH des fragments d'ADN qu'elle génère. Il possède le gène de résistance à l'ampicilline et un site multiple de clonage (MCS) localisé dans le gène *lacZ'* codant pour le peptide α de la β galactosidase. Le clonage d'un fragment d'ADN empêche alors la synthèse de la galactosidase et les clones recombinants (colonies blanches) sont détectés en présence de l'IPTG et du X-GAL.

Les cartes de restriction des vecteurs utilisés sont indiquées dans l'annexe n°1.

II. Méthodes:

II.1. Méthodes de clonage moléculaire

II.1.1. Réactions d'amplification par PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

Des amorces spécifiques ont été employées dans des réactions de PCR permettant l'amplification de la totalité de la forme mature du gène *PHY-US417*. En outre, ces amorces contiennent à leurs extrémités 5' des séquences additionnelles correspondant à des sites de restriction permettant l'insertion ultérieure des fragments PCR dans le vecteur de clonage. Les séquences des amorces utilisées pour le clonage du gène *PHY-US417* (formes intracellulaire et secrétée) sont indiquées dans l'annexe n°4.

L'amplification s'effectue dans un thermocycleur Gene AmpPCR System 9700 comme suit : tout d'abord l'ADN subit une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 4 min. S'en suit une série de 30 cycles de polymérisation commençant par une nouvelle étape de dénaturation à 95°C pendant 30 sec, d'une étape d'hybridation des amorces sur les deux brins d'ADN (30 à 45sec) à la température d'hybridation des amorces (calculée en fonction du nombre de paires A/T et G/C selon la formule $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$) et d'une étape d'élongation à 72°C qui dépend de la taille du fragment à amplifier (1min / kb) et la processivité de la polymérase utilisée.

Composition du milieu réactionnel : 1 à 20 ng de matrice ADN, $2.5 \mu\text{l}$ du tampon (10X) fourni avec l'enzyme (contenant du MgCl_2), 1 μl de dNTP (10 mM), 1 μl de chacune des deux amorces (10 μM), 1 μl de la Taq DNA polymérase ou la Pfu polymérase (0.5 à 1 U). Le volume final est ajusté à 25 μl avec de l'eau bidistillée stérile.

II.1.2. Digestion enzymatique de l'ADN

La digestion de l'ADN (produits de PCR, vecteur) s'effectue dans un volume réactionnel de 20 μl contenant : 1-5 μg de l'ADN à digérer, 10 U d'endonucléase (Promega) et le tampon approprié pour chaque enzyme. Le mélange est incubé pendant 2 heures à la température optimale de l'enzyme utilisée.

Dans le cas d'une double digestion, on effectue une 1^{ère} digestion suivie d'une précipitation éthanolique et d'un traitement avec le fragment de klenow (pour rendre franche l'extrémité du site coupé, en cas du clonage au niveau du site Pml1 du vecteur binaire pCAMBIA1302). Ensuite, cet ADN est de nouveau précipité à l'éthanol avant de subir une deuxième digestion permettant ainsi de libérer le fragment désiré. Le résultat de la digestion est vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose.

II.1.3. Précipitation à l'éthanol

La précipitation est réalisée en ajoutant 0.1 volume d'acétate de sodium 3 M, pH 5.2 et 2,5 volumes d'éthanol absolu. Les tubes sont placés sur la glace pendant 20 min, l'ensemble est centrifugé 15 min à 12000 rpm. Après élimination du surnageant, le culot est lavé à l'éthanol 70%. Enfin, il est séché et repris dans 20 µl de H₂O.

II.1.4. Obtention de bouts francs par l'utilisation de la Klenow

Les extrémités cohésives sont transformées en extrémités franches sous l'action du grand fragment de l'ADN polymérase I (ou fragment de Klenow). La réaction est réalisée dans un volume 20 µl contenant : 16 µl de l'ADN précoupé, 2 µl du Tampon de Klenow (10X), 1 µl Klenow, 1 µl dNTP(2 mM). La réaction se fait pendant une heure à 37°C avant d'être arrêtée par chauffage à 75°C pendant 20 min.

II.1.5. Purification des fragments

Les fragments d'ADN résultant d'une PCR ou d'une digestion sont séparés sur un gel d'agarose, la bande d'ADN d'intérêt (qui correspond à l'insert ou au vecteur linéarisé) est découpée sous rayonnement ultraviolet (UV) puis purifiée en suivant les recommandations du kit "Wizard SV gel and PCR Clean-up" (Promega). L'ADN purifié est repris dans 30 à 40 µl d'eau pure.

II.1.6. Ligation vecteur-insert

Le fragment d'ADN à cloner et le vecteur dans lequel il doit être inséré sont mis en présence d'un µl de T4 DNA ligase (1U/µl; Promega), 4 µl de tampon de la ligase (5X) et dans un volume final 10 ou 20 µl. Les proportions d'insert et de vecteur sont mélangées afin d'avoir un rapport molaire insert/vecteur d'au moins 3. La réaction de ligation est réalisée pendant une nuit à 16 °C. Concernant la ligation dans le vecteur pGEM-T Easy la réaction s'effectue à 4 °C durant une nuit dans un volume final de 10 µl contenant le vecteur, l'insert, 3 U de T4 DNA ligase (Invitrogen) et le tampon fourni avec l'enzyme.

II.1.7. Transformation des bactéries compétentes

Préparation des cellules compétentes par méthode chimique

Les bactéries d'*E. Coli* sont rendue compétentes suite à une fragilisation chimique au calcium à froid de la paroi et de la membrane plasmique. Ce traitement permettrait la formation de pores dans la paroi et faciliterait l'entrée de l'ADN à l'intérieur de la bactérie (Sambrook et al., 1989).

Pour ce faire une pré-culture de 0,5 ml d'*E. coli* TOP10 est inoculée dans 50 ml de LB. Cette culture est incubée à 37°C sous agitation à 200 rpm jusqu'à atteindre une DO_{600 nm} entre 0,3 et 0,5. La culture est centrifugée à 4°C pendant 5 min à 4000 rpm. Le surnageant est éliminé et

le culot est lavé avec 15 ml de CaCl₂ (0.1 M) froid pour fragiliser les parois des cellules. Les cellules sont ensuite placées sur la glace durant 30 min puis centrifugées à 4 °C pendant 5 min à 4000 rpm. Après élimination du surnageant, on ajoute au culot 1 ml de CaCl₂ (0.1M) froid. Les cellules compétentes obtenues sont enfin aliquotées dans des tubes stériles et conservées à -80 °C en présence de glycérol (25 % final).

Transformation bactérienne par choc thermique

À 100µl de cellules compétentes, on ajoute 10µl du produit de ligation puis on mélange doucement. On incube ce mélange pendant 30 min sur la glace, ensuite on applique un choc thermique à 42°C pendant 90 secondes. Les cellules sont rapidement placées sur la glace pendant 2 min avant d'y ajouter 0,9 ml de LB. Après une incubation pendant une heure à 37 °C sous agitation (200 rpm), on étale les cellules sur des boîtes de Pétri contenant du LB solide contenant l'antibiotique approprié (100 µg/ml d'ampicilline ou 50 µg/ml de kanamycine). Les boîtes sont enfin incubées toute la nuit à 37°C.

Pour des transformations avec le vecteur pGEM-T easy, les cellules compétentes sont étalées sur milieu LB solide contenant non seulement de l'ampicilline mais additionné de X-gal (50 µg/ml) et d'IPTG (100 µg/µl) et sont incubées une nuit à 37°C. Ces composés permettent de distinguer les bactéries qui ont incorporé le vecteur portant l'insert par criblage des colonies blanches (avec insert) des colonies bleues (sans insert).

La vérification de la réussite du clonage peut être réalisée par PCR directement sur colonies, par digestion de l'ADN plasmidique extrait à partir des clones recombinants et aussi par le séquençage de l'ADN obtenu.

II.1.8. PCR sur colonies

Les colonies bactériennes sont analysées par PCR afin de vérifier la présence du plasmide recombinant dans les bactéries transformées. L'utilisation de couples d'oligonucléotides adéquats permet de détecter la présence de l'insert. Une colonie est repiquée sur une nouvelle boîte gélosée pour conserver le clone, puis diluée dans 25 µl de milieu réactionnel. Les ingrédients et les conditions de PCR sont celles décrites précédemment (section II.1.1).

II.1.9. Séquençage et analyse bioinformatique

Le séquençage, effectué au service de séquençage automatisé (ABIPrism3100 ; Applied Biosystem), repose sur la méthode de Sanger et *al.* (1977). Les alignements des séquences nucléotidiques et protéiques, ainsi que les comparaisons de séquences avec les banques de données ont été réalisés avec le programme BLAST disponible sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. L'édition des alignements a été réalisée par le logiciel BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

II.1.10. Extraction d'ADN plasmidique par la méthode de lyse alcaline (mini préparation)

Les clones recombinants sont mis en culture dans 2 ml de milieu LB liquide à 37°C pendant une nuit sous agitation, en présence des antibiotiques adéquats. Le lendemain, 1,5 ml de cette culture sont utilisés pour extraire l'ADN plasmidique en suivant ces étapes: le culot bactérien récupéré après centrifugation est resuspendu dans 200 µl du tampon I (Glucose 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTANa₂ 10 mM) provoquant l'éclatement de la cellule bactérienne. L'ensemble est gardé 5 min sur la glace. Ensuite, on ajoute 400 µl du tampon II (NaOH 0,2 N ; SDS 1%) et on mélange les tubes par inversion plusieurs fois. L'ensemble est gardé pendant 5 min à température ambiante pour permettre la lyse. Puis, on ajoute 300 µl de tampon III (acétate de sodium 5M, 11.5 ml acide acétique glacial, 28.5 ml H₂O) avec incubation 5 min sur la glace pour précipiter les protéines, les ARN de haut poids moléculaire et l'ADN chromosomique bactérien. Par la suite, une centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 min permet de récupérer le surnageant dans de nouveaux tubes. L'ajout de 0.6 volume d'isopropanol sur le surnageant récupéré permet de précipiter l'ADN tout en gardant ce mélange sur la glace pendant 5 min. Après une centrifugation à 12000 rpm pendant 15 min et à 4°C, le culot d'ADN est lavé avec de l'éthanol à 70%, et séché. Enfin l'ADN est resuspendu dans 50 µl de tampon TER (Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 1mM et la RNase (10 µg/ml)) en l'incubant une heure à 37 °C, ce qui permet d'éliminer le reste d'ARN.

II.1.11. Electrophorèse en gel d'agarose

Les fragments d'ADN obtenus par digestion enzymatique ou suite à une amplification par PCR sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose. L'électrophorèse permet de séparer des fragments d'ADN en fonction de leur taille. La visualisation de l'ADN est réalisée grâce à la fluorescence du bromure d'éthidium (BET 0,2 µg/mL), intercalé entre les paires de base, sous rayons UV. Après suspension de l'agarose (0,8 à 2% selon la taille des fragments) dans un tampon TAE (TAE 1x : Tris-HCl, acide acétique glacial 40 mM pH 8, EDTA 1 mM), celui-ci est solubilisé par l'action de la chaleur et le gel est formé lors du retour à la température ambiante. L'ADN, est suspendu dans un tampon de charge (Tris-HCl 2 mM pH8, EDTA 10 mM, saccharose 5%, bleu de bromophénol 0,01%), puis déposé dans les puits du gel, soumis à un champ électrique (100 V) dans la cuve d'électrophorèse (contenant du TAE) où il va migrer vers le pôle positif. Un marqueur de taille (λ PstI) est utilisé comme référence pour déterminer la taille de l'ADN.

II.2. Transformation d'*Arabidopsis thaliana* par floral dip (Clough et Bent, 1998)

II.2.1. Préparation et transformation des cellules compétentes d'*Agrobacterium tumefaciens* :

Les bactéries sont mises en culture à 30°C dans un milieu LB liquide additionné de rifampicine en agitation, jusqu'à une valeur de $DO_{600\text{ nm}}$ de l'ordre de 0.6. Les tubes sont ensuite mis à centrifuger à 4000 rpm pendant 5 min. Le culot obtenu est resuspendu avec du $CaCl_2$ (10 mM) après lavage à l'eau stérile. Une fois préparées, les cellules compétentes sont aliquotées dans des tubes et mises sur la glace pendant 20 min. Pour la transformation, 1 µg de plasmide pCAMBIA1302 portant la construction d'intérêt est ajouté aux 100 µl de suspension de cellules compétentes puis mises en incubation pendant 30 min sur la glace. Les tubes sont ensuite transférés quelques secondes dans l'azote liquide et directement placés dans un bain marie à 37°C pendant 5 min. 800 µl LB liquide sont alors ajoutés et les cultures sont incubées pendant 2-3 heures sous agitation. Enfin, la suspension est étalée sur des boîtes de Pétri contenant le milieu LB solide additionné de 50 µg/ml de kanamycine et 30 µg/ml de rifampicine et mises en incubation pendant 2 jours à 30°C.

II.2.2. Préparation des plantes :

Les plantes d'*A. thaliana* destinées à la transformation, ont été cultivées en terreau pendant 1 mois jusqu'à l'obtention d'hampes florales. Quelques jours avant la transformation, les hampes florales des plantes d'*Arabidopsis* sauvage ont été coupées pour favoriser la pousse de nombreuses hampes secondaires et donc d'avoir plus de transformants. Il est préférable aussi d'éliminer les siliques des nouvelles hampes. Les boutons floraux destinés à la transformation doivent être fermés.

II.2.3. Préparation des bactéries et transformation des plantes :

Une préculture des bactéries transformées sert à ensemercer la culture finale de 500 ml, contenant les mêmes antibiotiques (kanamycine et rifampicine), jusqu'à ce que la $DO_{600\text{ nm}}$ atteigne 0.8. Les bactéries sont ensuite collectées par centrifugation 5 min à 5000 rpm à température ambiante et reprises dans une solution de trempage (saccharose 5%, ½ MS, détergent SILWET L-77 500 µl, 200 µM acétosiryngone, qsp H_2O 1L). Les bactéries resuspendues dans 1 L de cette solution sont incubées 30 min à température ambiante afin de permettre l'induction des gènes *Vir* (nécessaires à l'infection). Les boutons floraux sont ensuite trempés dans ce mélange pendant 90 secondes. Ensuite, les plantes sont placées 24 heures dans une mini-serre à l'obscurité avant de les remettre en serre. Après floraison, l'arrosage des plantes est supprimé et les graines matures sont récoltées.

II.3. Sélection et analyse moléculaire des lignées transgéniques

Les graines récoltées sont stérilisées puis ensemencées sur milieu MS contenant 15 µg/ml d'hygromycine permettant la sélection des transformants d'*Arabidopsis*. Les transformants sont analysés par PCR suite à l'extraction d'ADN génomique afin de vérifier la présence du transgène. L'analyse de son expression a été réalisée par RT-PCR sur les ARNs totaux. Des lignées transgéniques homozygotes ont été générées à partir de la 3^{ème} génération (T3). Le nombre de copie du transgène a été estimé à partir des résultats de ségrégation du marqueur de sélection *HPT*.

II.3.1. Extraction d'ADN génomique (méthode rapide pour le criblage des plantes transgéniques par PCR)

L'ADN a été extrait à partir de jeunes feuilles d'*Arabidopsis thaliana* selon les étapes suivantes : les feuilles fraîchement récoltées sont broyées dans un tube eppendorf contenant 200 µl de tampon d'extraction (Tris 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 250 mM, SDS 0,5%) avec des pilons. Sur le broyat obtenu on rajoute 200 µl du même tampon. L'ensemble est incubé sur la glace pendant quelques minutes. Après on centrifuge les tubes pendant 5 min à 12 000 rpm. La phase aqueuse est prélevée et les acides nucléiques sont précipités par l'ajout d'un volume d'isopropanol, puis incubé 2 min à 4°C. Après centrifugation 5 min à 12000 rpm, le culot obtenu est rincé avec 500 µl d'éthanol 70%, laissé ensuite 2 heures à 4°C. Enfin on centrifuge pendant 5 min à 12 000 rpm, le culot obtenu est séché et repris dans 50 µl d'eau bidistillée stérile.

II.3.2. Extraction au Trizol des ARN totaux des plantes

Deux cents mg de matériel végétal sont broyés dans l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre fine à laquelle on ajoute 1 ml de Trizol (Invitrogen) et on incube le mélange pendant 5 minutes à température ambiante afin de dissocier les complexes nucléoprotéiques. Par la suite, on ajoute 200 µl de chloroforme et on agite les tubes vigoureusement pendant 15 secondes avant de les incuber 2 min à température ambiante. Après la centrifugation des échantillons à 12000 rpm pendant 15 minutes à 4°C, on récupère la phase aqueuse, on ajoute 500 µl d'isopropanol pour précipiter l'ARN et on incube pendant 10 min à température ambiante. Après centrifugation à 12000 rpm pendant 10 min à 4°C, le culot translucide est lavé avec de l'éthanol 70 % et centrifugé (5 min, 4°C, 10 000 rpm). L'éthanol est éliminé et le culot est séché avant d'être repris dans 50 µL d'eau traitée au DEPC. Les ARN extraits sont quantifiés puis utilisés dans les expériences de RT-PCR.

II.3.3. Traitement des ARNs à la DNase

Afin d'éliminer toute trace d'ADN génomique résiduel, les ARNs totaux subissent un traitement à la DNase I (Invitrogen). Ce traitement consiste à incuber pendant 15 min à température ambiante le mélange réactionnel contenant 2 à 4 µg d'ARN, l'enzyme à raison de 1U/µg d'ARN, 1 µl du tampon 10X fourni avec l'enzyme et de l'eau (prétraitée par du DEPC) q.s.p. 10µl. La réaction est stoppée en ajoutant au mélange 1 µL d'EDTA 25 mM suivie d'une incubation à 65°C pendant 10 min.

II.3.4. Transcription inverse

La transcription inverse a pour but de transcrire l'ARN messager (ARNm) en ADN complémentaire (ADNc), en utilisant une transcriptase inverse. L'amorce utilisée est un oligo-dT qui s'hybride à la queue poly-A des ARNm. Cette technique est appliquée en utilisant le kit M-MLV Reverse transcriptase (Invitrogen) et à partir de 1 µg d'ARN totaux traités à la DNase. Les ARN sont dénaturés à 80°C pendant 5 minutes dans un volume final de 10 µl (ajusté par addition d'eau). Le traitement à forte température permet d'enlever les structures secondaires des ARN. Immédiatement après, le tube est plongé dans la glace. Après une brève centrifugation, 4 µl de tampon de réaction fourni avec l'enzyme, 1 µl de DTT 0,1 M, 1 µl de RNase OUT (Recombinant RNase Inhibitor, Invitrogen 40 U/µl) et 1 µl de M-MLV (Invitrogen, 200 U/µl), 500 ng oligo-dT₍₁₈₎ et 1µl de mélange de dNTP (10 mM), sont ajoutés dans un volume final de 20 µl. Après un mélange par inversion, le tube est incubé à 37°C pendant 1 heure. L'enzyme est ensuite inactivée à 70°C pendant 15 minutes. Les ADNc obtenus sont dilués pour effectuer les réactions PCR.

II.4. Analyse de l'expression des gènes

II.4.1 Extraction des ARN totaux avec le mini Kit "Qiagen RNeasy"

Cette méthode a été effectuée dans le but d'extraire les ARN des plantes, pour les utiliser dans des expériences de RT-PCR en temps réel. Le kit "RNeasy Mini Kit" (Qiagen), dont le principe est basé sur la fixation sélective de l'ARN sur une résine (gel de silice) contenue dans une colonne. Ainsi, les tissus congelés (quelques dizaines de mg de racines) sont broyés par agitation en présence d'une bille d'acier de 3 mm de diamètre (Broyeur Retsch® mixer mills MM400, 25 agitation.s⁻¹, 1 min). La poudre obtenue est reprise dans un tampon dénaturant à base d'isothiocyanate de guanidine (tampon RLT, utilisé à raison de 500 µl par 100 mg d'échantillon) additionné de β-Mercaptoéthanol (1 µl pour 100 µl de tampon de lyse), et l'ensemble est homogénéisé par pipetages. Le mélange est déposé sur une première colonne et centrifugé pendant 2 min à la vitesse maximale. L'éluat est additionné de 0,5V d'éthanol puis

transféré sur une deuxième colonne et centrifugée pendant 15 sec à 8000 g. La colonne est lavée par 700µl de tampon RW1. Les ARN liés à la colonne sont traités deux fois par un tampon de lavage RPE (500 µl) afin d'éliminer toute trace d'éthanol par une centrifugation à 10 000 rpm pendant 15 sec, puis de 2 min. L'élution des ARN est enfin réalisée dans de nouveaux tubes en déposant 30 µl d'eau RNase-free (RNase-free water) sur la colonne, l'éluat est récupéré en centrifugeant la colonne à 10000 g pendant 1 min.

Les ARNs totaux ainsi extraits sont dosés par spectrométrie à 260 nm (NANODROP 1000 spectrometer, Thermo Scientific, Wilmington, USA) et les résultats sont analysés avec le logiciel ND- 1000 V3.7.1. La pureté des ARNs est vérifiée par la mesure des ratios DO_{260}/DO_{280} et DO_{260}/DO_{230} qui doivent être entre 1,8 et 2. Enfin la qualité des ARN est appréciée aussi par électrophorèse sur gel d'agarose.

II.4.2. Quantification de l'accumulation des transcrits par q-PCR

Avant l'amplification par PCR quantitative les ARN totaux subissent un traitement à la DNase I suivi d'une transcription inverse comme décrit précédemment. Les amorces utilisées pour l'analyse de l'expression relative des différents transporteurs (de P, de sulfate) dans les conditions de carence en phosphate ou non sont indiquées dans l'annexe. L'amplification est réalisée à l'aide du réactif SYBR Green LightCycler®480 (SYBR Green I Master, Roche, IN, USA) en plaque de 384 puits (Hard-Shell® 384-Well Skirted PCR Plates, Roche, Mannheim, Allemagne) dans un LightCycler® LC480 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) selon les instructions du fournisseur avec de 1 µl d'ADNc dans un volume final de 10 µL contenant 1 µM de chacune des amorces. Les cycles sont ceux d'une PCR classique mais avec des temps beaucoup plus courts. Pour l'ensemble des gènes testés, le programme utilisé est le suivant:

5 min à 95°C **étape de dénaturation** (1 cycle)

20 s à 95 °C **étape de la PCR** (45 cycles)

15 s à 60°C

20 s à 72°C

5 s à 95 °C **étape de Fusion "melting curve"**(1 cycle)

1min s à 60°C

15 min Augmentation de la température de 60°C à 95°C

30s à 40°C **étape de refroidissement** (1 cycle)

Pour l'analyse du niveau d'expression du gène, on se base sur le calcul du $\Delta\Delta CT$ entre le gène cible et le gène de référence, selon une procédure adaptée à partir de la méthode appelée " $\Delta\Delta CT$ " (Livak et Schmittgen, 2001). Dans cette méthode les auteurs utilisent une formule arithmétique pour calculer le rapport de l'abondance d'une séquence cible dans un échantillon

à l'abondance de cette même séquence dans un second échantillon "contrôle", en normalisant avec un gène de référence. Les différences ΔCT entre les valeurs de CT du gène cible (transporteur) et du gène de référence (UBQ10) sont déterminées pour l'échantillon à analyser (condition de stress) et l'échantillon "contrôle" (condition standard).

$$\Delta CT_{\text{éch}} = CT(\text{cible}_{\text{éch}}) - CT(\text{référence}_{\text{éch}})$$

$$\Delta CT_{\text{cont}} = CT(\text{cible}_{\text{cont}}) - CT(\text{référence}_{\text{cont}})$$

Ensuite, le $\Delta\Delta CT$ entre le contrôle et l'échantillon est calculé: $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{éch}} - \Delta CT_{\text{cont}}$.

Enfin, l'analyse théorique indique que le rapport d'expression normalisé du gène cible, par rapport au contrôle, est obtenu par la formule $2^{-\Delta\Delta CT}$.

II.4.3. Révélation de l'activité Gus

L'activité de la β -glucuronidase, est révélée par incubation des plantes à 37°C pendant 1 à 18h dans une solution contenant le substrat chromogénique de cette enzyme (5-bromo-4-chloro-3-indolyl b-D-glucuronide cyclohexylammonium salt (X-Gluc) dans le tampon sodium phosphate 50 mM, pH 7; 0.5 mM $K_3(Fe[CN]_6)$, 0.5 mM $K_4(Fe[CN]_6)$, 0.1% Triton X-100). Ensuite la dépigmentation du matériel végétal a été effectuée par incubation dans l'éthanol 70% pendant quelques heures. Les photos des racines sont prises avec la loupe binoculaire (Zeiss Olympus BH-2, Volketswil, Switzerland).

II.5. Etude de l'activité phytasique chez les lignées transgéniques

II.5.1. Préparation des extraits protéiques

Le matériel végétal (jeunes plantules) est broyé en présence d'un volume du tampon d'extraction (MES 15 mM (pH 5.5), $CaCl_2$ 1 mM, EDTA 0,5 mM) équivalent à trois fois la masse initiale du matériel végétal. L'homogénat est centrifugé 15 min à 20 000g à 4°C. Le surnageant est de nouveau centrifugé pendant 5 min à 12000 rpm à 4°C puis récupéré est placé immédiatement à -20°C.

II.5.2. Dosages des protéines

Les protéines sont quantifiées par la méthode de Bradford (1976). Cette quantification des protéines est basée sur la modification de la longueur d'onde maximale d'absorption du bleu de Coomassie G250 une fois fixé sur les protéines (de 460 à 595 nm). L'échantillon protéique est mélangé ainsi avec 1 ml de la solution de Bradford, le tout est incubé 10 min à température ambiante. La lecture de la DO_{595} du mélange ainsi que le traçage de la courbe étalon établie à partir de concentrations connues de BSA (entre 0 et 25 $mg \cdot ml^{-1}$) nous permet de calculer la quantité de protéines totales.

II.5.3. Détermination de l'activité phytasique par la méthode du bleu de molybdate

Après extraction des protéines à partir des plantes sauvages ou des lignées transgéniques (L7 et L9) 100 µg de l'extrait protéique est utilisé pour réaliser le dosage de l'activité phytasique. Quant au dosage de l'activité phytasique dans l'exsudat racinaire des lignées sécrétrices de phytase on récupère directement le milieu de culture liquide. Dans les deux cas on effectue le dosage des protéines avant de déterminer l'activité phytasique en suivant ces étapes :

Tout d'abord l'échantillon protéique (A) (100 µl) est incubé 5 min à 37° C puis il est additionné d'une solution substrat (contenant 100 mM d'acétate de sodium (pH 7.5) et 2 mM du substrat de l'AP (Na-InsP6, P-8810, Sigma)), après une légère agitation ce mélange est incubé pendant 30 min à 55°C dans notre cas (Température optimale pour la phytase PHY-US417). Après ajout de la solution stop (TCA 10% (p/v)) suivi de la solution de coloration (contenant 100 mM d'ammonium molybdate, l'acide sulfurique (98%) et le sulfate de fer (2,7%)), les tubes sont incubés pendant 10 min à température ambiante puis sont centrifugés pendant 10 min à 4 000 rpm. La mesure de l'absorbance à 820 nm de l'échantillon A et de son blanc l'échantillon A0 (où on ajoute la solution stop sur l'extrait avant de mettre le substrat) a été effectuée contre un Blanc B (sans extrait protéique). Ainsi l'activité phytasique se calcule à partir du Pi libéré au cours de la période d'incubation, une unité d'activité phytasique (FTU) correspond à la quantité d'enzyme qui libère 1 µmol d'orthophosphate inorganique/min dans les conditions de l'essai. Cette activité est calculée par la formule suivante :

$$U = \frac{K \times (A - A0)}{S \times m \times 30} \times F$$

Avec **U** = activité de l'échantillon exprimée en U/g

K = pente de la courbe d'étalonnage préparée en utilisant des solutions de concentrations connues en KH_2PO_4 (0 ; 0.8 ; 1.6 ; 2.4 ; 3.2 et 4 mM).

F = facteur de dilution

S = volume de l'échantillon (ml)

m = masse de l'échantillon (g)

30 = temps de la réaction (min)

II.5.4. Détection de l'activité phytasique secrétée par les racines des lignées transgéniques

La visualisation de l'activité phytasique secrétée par les racines des lignées transgéniques dans un milieu solide contenant l'AP phytique comme seule source de P a été effectuée par un test de coloration avec le réactif du Rose de Wade (0,3 % d'acide sulfosalicylique et 0,03% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en reposant sur le fait que l'acide sulfosalicylique forme en solution un complexe coloré en rose-violet (en milieu acide) avec le fer (Latta et Eskin, 1980). Ce complexe se décolore en présence d'acide phytique, car le fer va être capté par l'acide phytique, qui a un pouvoir chélateur plus fort que celui de l'acide sulfosalicylique. Ainsi les graines des lignées transgéniques e-PHY avec les graines du WT sont cultivées sur milieu (MS-P+AP), trois semaines. Les boîtes sont ensuite immergées dans le réactif du Rose de Wade, puis sont rincées avec l'eau pure.

II.6. Détermination de la teneur en phytate dans les graines d'*Arabidopsis*

Le contenu en phytate dans les graines a été déterminé comme décrit par Haug et Lantzsch (1983). L'extraction a été faite en incubant 4 mg de graines dans 0,4 N de HCl en agitation pendant 3h30 min à température ambiante. Les tubes sont centrifugés pendant 15 min à 4000 g. Trois cent cinquante μl de surnageant obtenu est additionné de 700 μl d'une solution ($\text{NH}_4\text{Fe(III)-sulfate}$ 0.02% préparée dans HCl 0.2N). Le mélange est incubé 30 min à 95°C, refroidi dans la glace pendant 15 min, puis mis en agitation 20 min et centrifugé (30 min, 4 000 g, température ambiante). Le surnageant est transféré dans de nouveaux tubes en verre contenant une solution de 1 % (p/v) 2,2'-bipyridine préparée dans 1 % d'acide thioglycolique (v/v). La lecture de la DO s'effectue à 519 nm. En se référant à la courbe d'étalonnage du phytate (dont les concentrations varient entre 1 à 100 $\mu\text{g/ml}$), la concentration de phytate des échantillons peut enfin être déterminée.

II.7. Coloration histologique du fer au Perls/DAB

Pour le suivi de la mobilisation du fer au cours de la germination, les embryons matures sont obtenus par dissection des graines imbibées dans de l'eau et stockées à 4°C à l'obscurité pendant 2h. Puis les plantules sont semées sur ½ MS sans saccharose ni Fer pendant 2 jours (jours longs, 16h de lumière) à 21°C. Une coloration au Perls/DAB est réalisée sur les embryons matures et les plantules selon le protocole décrit par Roschzttardt *et al.* (2009). Un pigment brun révèle la présence de Fer.

II.8. Extraction et dosage des ions

II.8.1. Extraction et dosage des anions majeurs par HPIC

Les teneurs en anions (phosphate et sulfate) ont été réalisées comme décrit par Rouached et *al.*, (2008). Ainsi, après détermination de la masse de la matière fraîche (feuilles et racines collectées séparément), les anions sont extraits par incubation des tissus dans de l'eau Milli-Q à 70°C durant 60 min. Le surnageant est récupéré après centrifugation à 4°C pendant 10 min à vitesse maximale puis filtré. La quantification des anions majeurs a été effectuée par HPIC (High-Performance Ionic Chromatography ; LC20 Dionex) en utilisant une colonne IonPac AS11 et un gradient NaOH (1-35,4 mM). La concentration en NaOH a été augmentée de façon linéaire de 3,5 à 5 mM en 3 min, puis de 5 à 35,4 mM en 8 min. L'identification et la quantification de chaque anion ont été effectuées en utilisant le logiciel Chromeleon (Dionex).

II.8.2. Extraction et dosage colorimétrique du phosphate inorganique (Pi)

L'analyse du contenu en Pi a été réalisée (sur les parties aériennes) par dosage colorimétrique comme décrit par Khan et *al.*, (2014). Les échantillons ont été rincés avec de l'eau désionisée pour éliminer les traces du Pi. 10 à 20 mg d'échantillons sont mis dans des tubes eppendorf contenant 1 ml d'eau pure et chauffés à 70 °C pendant 30 minutes. On récupère le surnageant (100 µL) auquel est ajouté un mélange composé de 600 µl de molybdate d'ammonium, 100 µl d'acide ascorbique (10 %) et 200 µl d'eau pure. L'ensemble des tubes à analyser ainsi que ceux de la gamme étalon de KH₂PO₄ (de concentrations croissantes 0, 25, 50, 250, 500, 1000 µM) sont incubés à 42 °C pendant une heure. Ensuite, l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 820 nm à l'aide du spectrophotomètre (Beckman Coulter DU[®]520 Spectrophotometer). En se référant à la courbe d'étalonnage, la concentration en Pi des échantillons peut être déterminée par la formule suivante :

$$C = \frac{\text{Abs}}{\text{K}} \times 1000 \times \text{Pf}$$

C : concentration de Pi exprimée en µmole/g matière fraîche

Abs : absorbance à 820 nm des échantillons analysés

K : pente de la courbe d'étalonnage

Pf : poids frais des échantillons, (g)

II.8.3. Extraction et dosage de Zn

Le matériel végétal collecté (≈ 20 mg) doit être préalablement desséché à l'étuve à 70°C . Trois réplicats de matière sèche de chaque échantillon sont incubés dans ≈ 20 ml d'acide nitrique (HNO_3 , 0,5%) pendant 30 min à 80°C puis sont laissés pendant une nuit à température ambiante. Ceci permet l'extraction totale des éléments de l'échantillon. Le contenu en Zn est déterminé par spectrophotomètre à absorption atomique (Perkin-Elmer Analyst 200). Une gamme étalon (de solution $\text{Zn SO}_4 \cdot 7(\text{H}_2\text{O})$) a été effectuée en parallèle pour le dosage du Zn.

II.9. Evaluation du statut oxydatif

II.9.1. Dosage du MDA (test de peroxydation lipidique)

La méthode la plus utilisée pour l'estimation *in vitro* de la peroxydation des lipides membranaires dans les systèmes biologiques est le dosage du malondialdéhyde (MDA) par la réaction de l'acide thiobarbiturique (TBA). Le dosage du MDA repose sur la formation en milieu acide et à chaud entre le MDA et deux molécules de TBA, d'un pigment rouge absorbant à 532 nm. Les mesures sont réalisées sur des feuilles de plantes d'*Arabidopsis* (stressées ou contrôles). Environ 100 mg de matière fraîche sont homogénéisés dans 1 mL de TCA 0,1% (p:v). L'homogénat est centrifugé à 12 000 g pendant 15 min à 4°C , puis 0,5 ml de surnageant est ajouté à un mélange TBA 0,5% (p:v) et TCA 20% (p:v). Le mélange réactionnel est incubé à 95°C pendant 30 min. Ensuite, la réaction est arrêtée par un refroidissement immédiat dans un bain de glace. Après clarification de l'échantillon par centrifugation 10 min à 10000 g l'absorbance du surnageant obtenu est lue à 532 nm. La valeur d'absorption non-spécifique à 600 nm est aussi lue puis soustraite et la concentration du complexe MDA-TBA (pigment rouge) est calculée à partir du coefficient d'extinction ($\Sigma = 155 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et les teneurs en MDA sont exprimées en nmol g^{-1} MF.

II.9.2. Détermination de la teneur en peroxyde d'hydrogène

Le dosage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est basé sur le fait que cet oxydant réagit avec les ions iodure (I^-) en milieu acide pour produire le diiode I_2 . Cinq cents mg de matériel végétal (collectés de plantes d'*Arabidopsis* soumises ou non au stress) sont homogénéisés avec 5 ml de TCA 0,1% (p:v) puis centrifugés pendant 15 min à 12000g. Le surnageant est filtré puis 0,5 ml du filtrat est mélangé avec 0,5 ml du tampon phosphate (10 mM, pH7) et 1 ml d'iode de potassium (KI, 1M). Les mesures de la densité optique du mélange sont réalisées à 390 nm. Le taux de H_2O_2 a été estimé en utilisant une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions en utilisant des solutions de concentration connues en H_2O_2 allant de 0,1 mM jusqu'à 1 mM. Les teneurs en H_2O_2 sont exprimées en $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF.

II.9.3. Détection du peroxyde d'hydrogène par le DAB

L'accumulation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans les feuilles de plantes a été détecté par méthode colorimétrique en utilisant la coloration par 3,3'-diaminobenzidine (DAB) selon le protocole décrit par Daudi et O'Brien (2012). En fait, le peroxyde d'hydrogène entraîne une oxydoréduction avec polymérisation de la molécule de DAB donnant un précipité de couleur brune qui peut être observé même à l'œil nu. Les feuilles ont été incubées dans une solution contenant 1 mg/ml DAB dissous dans l'acide HCl (pH= 3,8) et la solution a été infiltrée sous vide dans les feuilles. Après dépigmentation dans une solution bouillante d'éthanol, les feuilles sont conservées dans le glycérol (30%) et les photos sont prises par la suite avec un microscope stéréoscopique (Leica MS5).

II.9.4. Détection du superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) par Nitro Blue-Tetrazolium (NBT)

Le NBT est utilisé comme sonde qui permet de marquer spécifiquement l'accumulation de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$. Ainsi, les plantules (stressées ou non) sont infiltrées sous vide par une solution de NBT (0.1 mg. ml⁻¹ NBT, 25 mM HEPES, pH 7.6) et sont incubées pendant 2h à l'obscurité. Après dépigmentation avec l'éthanol absolu la couleur bleue indique la formation des superoxydes et les photos sont prises par la suite avec un microscope stéréoscopique (Leica MS5).

II.10. Dosage des chlorophylles

Des feuilles fraîches ont été prélevées pour déterminer la teneur de chlorophylle totale. Les fragments de feuilles (100 mg pour chaque échantillon) sont incubés pendant 72 heures à l'obscurité et à froid dans 5 ml d'acétone 80 %. Après, la DO du surnageant est mesurée à 647 et 663 nm. La quantité de chlorophylle est calculée d'après Arnon (1949) selon la formule suivante:

$$\text{Contenu en chlorophylle (mg. g}^{-1}\text{ MF)} = [((20.21 \times (DO_{647}) + (8.02 \times (DO_{663})) \times V] / M$$

avec **V** = volume d'acétone ajouté ; **M** = masse fraîche prélevée des feuilles

II.11. Détermination de la concentration de proline

La concentration de la proline a été déterminé selon le protocole de Bates et *al.*, (1973). Le principe de cette méthode est basé sur l'emploi de la ninhydrine (hydrate de tricétohydrindène) qui réagit avec les acides aminés en donnant un chromophore acides aminés-ninhydrine. Cependant pour la proline la fonction imine fournit une teinte rouge rosé qui présente un maximum d'absorption à 520 nm. Le chromophore proline-ninhydrine est préalablement extrait par le toluène.

Ainsi 0,1 g de feuilles fraîches ont été homogénéisées avec 2 ml de méthanol (40%). L'homogénat est chauffé à 85°C pendant 1h. Après refroidissement, on ajoute 1 ml d'une solution contenant (300 ml d'acide acétique, 80 ml d'acide orthophosphorique, 25 mg de ninhydrine et 100 ml d'eau). Ce mélange est mis à l'ébullition pendant 30 min avant de le placer sur la glace. Le mélange est ensuite extrait en ajoutant 5 ml de toluène, et en mélangeant pendant 15 à 20 secs. Deux phases apparaissent, une phase inférieure dépourvue de proline et une supérieure contenant la proline. L'absorbance est lue à 520 nm et la concentration en proline a été déterminée à l'aide d'une courbe étalon réalisée dans les mêmes conditions. Les teneurs mesurées ont été rapportées au poids frais de l'échantillon et exprimées en $\mu\text{mol proline g}^{-1}$ MF.

II.12. Détermination des teneurs en acide ascorbique (AsA)

L'acide L-ascorbique (ou vitamine C) intervient en piégeant très efficacement les radicaux superoxydes et hydroxyles, le H_2O_2 , le HOCl et l' $^1\text{O}_2$. Il a été extrait par l'homogénéisation d'environ 100 mg de poudre congelée de feuilles dans 600 μl de TCA 6% (p/v). L'homogénat est centrifugé à 11000g pendant 25 min à 4°C. Les surnageants ont été utilisés pour la détermination de l'AsA. Les concentrations d'AsA ont été déterminées selon la méthode d'Okamura (1980) modifiée pour une détermination en micro-plaque (Murshed et al., 2008). Cette méthode colorimétrique est basée sur la réduction de l'ion ferrique par l'acide ascorbique en milieu acide et en présence de 2,2'dipyridyl. Le complexe ainsi formé absorbe à 550 nm. Pour le dosage, 20 μl de l'extrait sont mis en contact avec 20 μl du Tampon phosphate (mélange de deux solutions stock de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ et de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ jusqu'à obtenir un pH 7.4, 0.4M). Après 20 min d'incubation à 37° C, on rajoute 10 μl de tampon phosphate, on mélange puis on ajoute 80 μl du réactif A (TCA (4,6%), acide orthophosphorique (H_3PO_4 ; 85%), chlorure ferrique (FeCl_3 0,6%)) et B (2,2'dipyridyl dissous dans l'éthanol (70%)). Après incubation 40 min à 42° C, l'absorbance est mesurée à 550 nm à l'aide du lecteur VICTOR₂[™] (MULTILABEL COUNTER, life sciences). Une solution standard d'AsA 5 mM est préparée en parallèle et servira à effectuer la courbe d'étalonnage pour la quantification de l'AsA exprimé en $\mu\text{mol/g}$ de MF.

II.13. Détermination *in vitro* des activités des enzymes antioxydantes

II.13.1. Préparation des extraits protéiques

Les protéines ont été extraites par homogénéisation de \approx 0,2 g de matières fraîches dans 1 ml de tampon d'extraction qui contient (100 mM Tris-HCl pH8, 10 mM KCl, 10 mM EDTA pH8, et 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF)). Après clarification de l'extrait par centrifugation 30 min à 12000 g à 4 °C, les surnageants sont placés à -20°C. La concentration

en protéines de chaque échantillon est dosée par la méthode de Bradford (1976) comme décrit précédemment avant de mesurer les activités des enzymes antioxydantes.

II.13.2. Dosage de l'activité superoxyde dismutase (SOD)

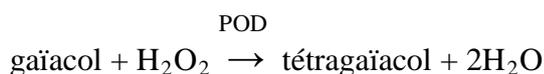
Les SOD évitent l'accumulation de l' $O_2^{\bullet -}$ en catalysant la dismutation du $O_2^{\bullet -}$ en H_2O_2 selon la réaction suivante : $2 O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

Le dosage de l'activité de la SOD repose sur l'inhibition de la photoréduction du nitrobleu de tétrazolium (NBT) par l'anion superoxyde O_2^- produit suite à la photoréaction de l'oxygène et de la riboflavine en présence d'un donneur d'électron comme la méthionine. La présence de la SOD dans l'extrait inhibe la réduction photochimique de NBT en bleu (d'où l'atténuation de la coloration bleue). Une unité d'activité SOD est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour une inhibition de 50 % du taux de réduction du NBT ($NBT_{ox} + O_2^{\bullet -} \rightarrow NBT_{red}$). Les extraits enzymatiques (la même concentration protéique utilisée pour tous les échantillons) ont été mis en présence du mélange réactionnel qui contenait du tampon phosphate de potassium à 50 mM (pH 7,8), de 13 mM méthionine, de nitro bleu tétrazolium (NBT) à 75 μ M, d'EDTA à 0,1 mM, de riboflavine à 2μ M. Le mélange a été exposé à un faisceau de lumière blanche pendant 20 min. La couleur bleue développée dans la réaction a été mesurée à 560 nm. Le blanc est placé directement à l'obscurité. Le maximum de réduction photochimique du NBT est déterminé à partir d'un mélange réactionnel sans extrait enzymatique exposé également à la lumière. L'activité SOD est exprimée en unités par mg de protéines.

Le H_2O_2 produit est également toxique pour la cellule, il est pris en charge par les catalases et les peroxydases, en le réduisant en H_2O . Les catalases semblent jouer un rôle important en présence d'une forte concentration de H_2O_2 , alors que les peroxydases assurent l'élimination de ce dernier mais en faible quantité.

II.13.3. Dosage de l'activité peroxydase

La mesure de l'activité enzymatique de la peroxydase se fait par l'intermédiaire d'un donneur d'électron, ici le gaïacol (méthoxy 2-phénol) qui s'oxyde en présence d'enzyme et d'eau oxygénée donnant une coloration orange, celle du tétragaïacol selon la réaction suivante :

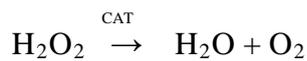


Ainsi, cette activité enzymatique mesurée par spectrophotométrie est basée sur l'augmentation de l'absorbance à 470 nm due à la polymérisation du gaïacol en tétragaïacol en présence de peroxyde d'hydrogène. Le volume réactionnel contient 50 mM du tampon phosphate de

potassium (pH=7), 9 mM de H₂O₂, du gaïacol 0.5% et un aliquot d'extrait protéique. L'activité enzymatique de la peroxydation est suivie au cours du temps par la mesure de l'absorbance à 470 nm toutes les 20 secondes. L'activité enzymatique est exprimée en μmoles de tétragaïacol formés par min par mg de protéines en utilisant la valeur de coefficient d'extinction de tétragaïacol (Σ : 26,6 mM⁻¹.cm⁻¹).

II.13.4. Dosage de l'activité catalase

Les CAT ont comme rôle de dégrader le H₂O₂ en catalysant la réaction suivante :



Le peroxyde d'hydrogène absorbe à 240 nm, sa transformation en présence de catalase sera donc suivie par une diminution de l'absorbance au cours du temps. Ainsi la décomposition du H₂O₂ est mesurée par spectrométrie à une longueur d'onde de 240 nm selon la méthode adaptée de Luck (1965). Le mélange réactionnel contient une solution de H₂O₂ (10 mM, préparée dans le tampon phosphate 50 mM, pH 7) et l'extrait enzymatique. La lecture de la DO est réalisée à 240 nm toutes les 15 secondes pendant une minute. La pente décroissance de la courbe exprimant la DO en fonction du temps permettra de calculer l'activité de la CAT exprimée en unités par mg de protéines totales.



Résultats et Discussion

Chapitre I :

**Etude de l'effet de la surexpression de la phytase de *Bacillus subtilis*
PHY-US417 sur la capacité à améliorer la mobilisation du P à partir de
l'AP chez les plantes d'*Arabidopsis thaliana***

Etude de l'effet de la surexpression de la phytase de *Bacillus subtilis* PHY-US417 sur la capacité à améliorer la mobilisation du P à partir de l'AP chez les plantes d'*Arabidopsis thaliana*

La production de graines riches en Pi et en même temps pauvres en AP est fortement souhaitable que ce soit pour l'alimentation des animaux monogastriques ou pour les humains. Pour ce faire plusieurs stratégies basées sur l'emploi de différentes phytases ont été proposées. Des travaux de recherche réalisés au sein du laboratoire d'Enzymes et de Métabolites des Procaryotes (LEMP) ont permis d'isoler une nouvelle phytase à partir de la souche *Bacillus subtilis* PHY-US417 (Farhat *et al.*, 2008).

Ainsi, dans ce chapitre nous nous sommes intéressés de tester l'effet de l'activité de cette phytase PHY-US417 ajoutée dans le milieu ou exprimée via transgénèse sur la croissance des plantes d'*Arabidopsis thaliana in vitro* dans des conditions limitantes en P.

I. Effet de l'ajout de la phytase de la souche *Bacillus subtilis* US417 sur la croissance des plantes d'*Arabidopsis thaliana in vitro*:

Afin de tester la contribution de la phytase PHY-US417 à la croissance des plantes dans des conditions déficientes en P, on a effectué un test de croissance sur des plantules d'*Arabidopsis in vitro*. Pour cela, les graines sauvages (WT Col-0) d'*Arabidopsis* ont été mises à germer sur milieu MS qui contient les éléments minéraux nécessaires à la croissance. Une fois enracinées, les plantules ont été transférées sur les milieux suivants: MS, MS sans P, MS sans P contenant 0.33 mM d'AP additionné ou non de phytase extraite de la souche US417 (26 U/ml).

Après deux semaines de culture *in vitro*, une nette différence au niveau de la croissance des plantules, de leurs surfaces foliaires et de leurs racines a été observée. Les plantules transférées sur le milieu MS considéré comme milieu témoin poursuivent leur croissance normalement. Par contre, les plantules transférées sur milieu MS sans P présentent une croissance ralentie qui se traduit par des plantules chétives, des feuilles naines et anthocyanées, et des racines très peu développées (**Figure 12-A& B**). Ces résultats sont attendus puisque le P est un élément minéral nécessaire à la survie et au développement des plantes.

Lorsque l'AP a été fourni (0,33 mM) comme seule source de P dans le milieu de culture, la croissance des plantules est également inhibée, mais d'une façon moins prononcée que celle des plantes cultivées sur un milieu dépourvu en P.

En transférant les plantules sur un milieu dépourvu de P, contenant 0.33 mM d'AP et additionné de phytase purifiée PHY-US417, les plantules croissent beaucoup mieux, et atteignent une taille dépassant légèrement celle des plantules cultivées sur milieu MS standard (**Figure 12-A & B**).

L'ajout de la phytase dans le milieu semble avoir un effet positif sur le développement des racines. Ceci est visible en observant les racines entières des plantules transférées sur les différents milieux (**Figure 12-B**). De plus, nous avons constaté une augmentation de ≈ 5 fois du poids frais des feuilles et des racines en comparaison avec des plantes témoins (**Figure 12-C**).

Il convient ici de préciser que PHY-US417, comme les autres phytases en forme d'hélice β (β PPs), permet d'hydrolyser l'AP et de libérer 3 groupements Pi pour générer finalement l'InsP₃ (Kerovuo *et al.*, 2000, Greiner *et al.*, 2007). Ainsi l'ajout de 0,33mM d'AP entraîne la libération de ≈ 1 mM Pi une concentration équivalente à celle utilisée dans le milieu MS standard.

Ces résultats confirment que l'enzyme PHY-US417 ajoutée dans le milieu est active et capable de stimuler la croissance de plantes d'*Arabidopsis* dans des conditions limitantes en P, vraisemblablement par l'hydrolyse d'AP présent dans le milieu de culture ce qui conduit à l'augmentation de la biodisponibilité du Pi.

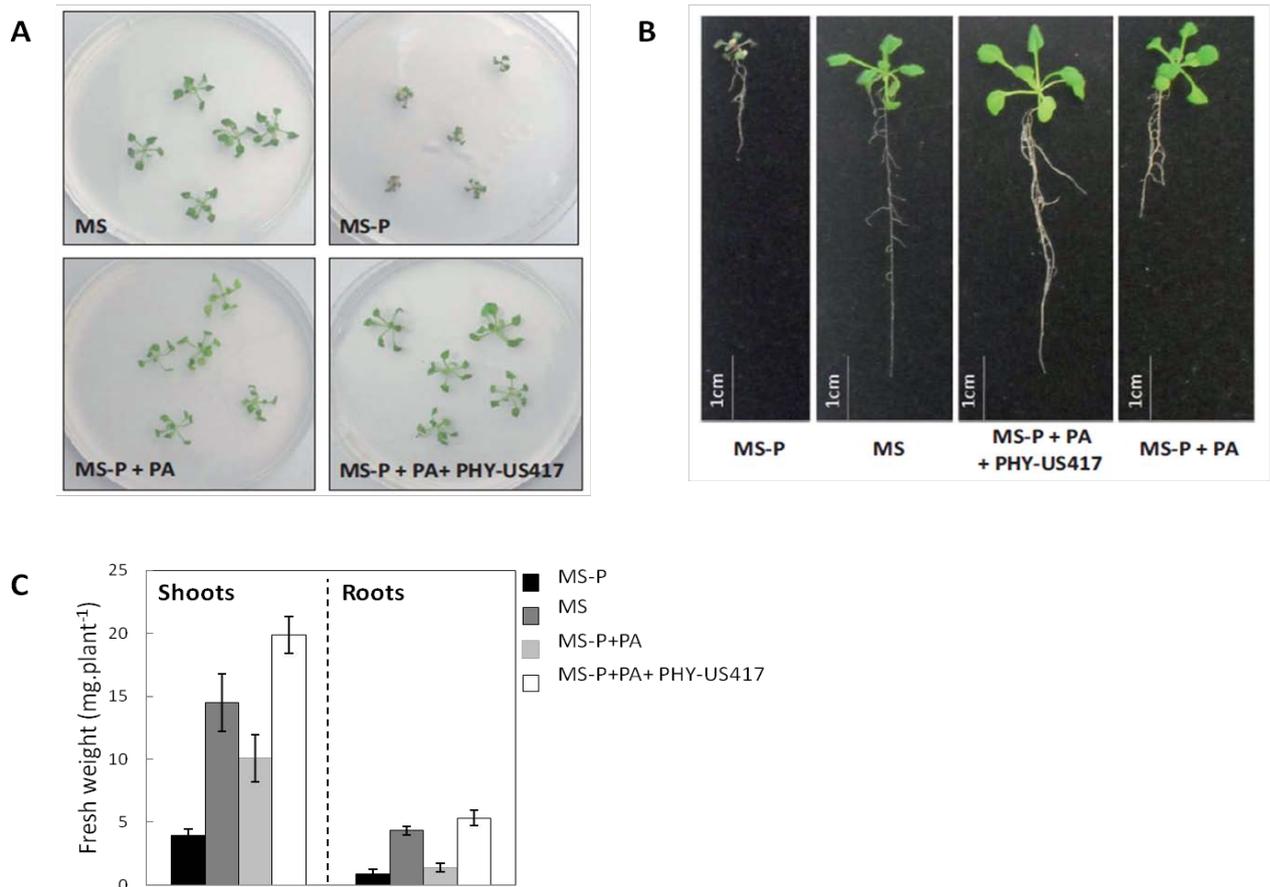


Figure 12: Effet de l'addition de la phytase PHY-US417 sur la croissance des plantes sauvages d'*Arabidopsis in vitro*. (A) Les plantules ont d'abord été cultivées sur milieu MS pour une semaine puis transférées sur un milieu MS standard (MS avec 1 mM de Pi, en tant que contrôle) ou un milieu MS déficient en P (MS-P), en absence ou en présence de 0,33 mM d'acide phytique (PA) et de phytase PHY-US417 (6,5 U). (B) Photos représentatives des racines des plantes cultivées dans les conditions ci-dessus, prises 15 jours après le transfert. (C) Poids frais des tiges et des racines des plantes cultivées dans les conditions indiquées en (A). Les mesures ont été enregistrées 15 jours après le transfert. Les données sont les moyennes de trois répliques indépendantes. Chaque réplique correspond à l'analyse des tiges et des racines collectées à partir d'un pool de six plantules.

II. Effet de la surexpression de la phytase PHY-US417 chez *Arabidopsis thaliana* :

II.1. Production de plantes transgéniques d'*Arabidopsis* surexprimant la forme intracellulaire de PHY-US417 :

L'amélioration observée suite à l'ajout de la phytase PHY-US417 dans des conditions limitantes en P nous a incité à étudier l'effet de la surexpression du gène *PHY-US417* chez *Arabidopsis*. Pour cela la totalité de l'ORF codant pour la forme mature de cette phytase a été clonée en premier lieu dans le vecteur binaire pCAMBIA1302 sous le contrôle du promoteur

constitutif 35S du CaMV(virus de la mosaïque du chou-fleur) et le terminateur du gène codant pour la nopaline synthase (Nos polyA). Ce vecteur contient en outre le gène de résistance à l'hygromycine (*HPT*) pour la sélection des plantes transgéniques.

La construction pC1302-*PHY-US417* (**Figure 13-A**) a été utilisée par la suite pour la transformation des plantes d'*Arabidopsis* par *Agrobacterium*. Plusieurs transformants ont été sélectionnés sur un milieu contenant l'hygromycine.

La vérification de l'intégration du gène *PHY-US417* dans le génome des plantes transformées a été réalisée par PCR en utilisant 2 couples d'amorces. Le premier couple d'amorces permet l'amplification d'un fragment de 1 Kb correspondant au marqueur de sélection *HPT*. Le deuxième couple d'amorces permet une amplification d'un fragment d'ADN de 1080 pb qui couvre la phase codante du gène *PHY-US417*. Les résultats des amplifications par PCR indiquent que les différents transformants (génération T1) testés ont intégré le T-DNA contenant le gène *PHY-US417* (**Figure 13-B**).

En outre, on a étudié le niveau d'expression du gène *PHY-US417* par RT-PCR. Les produits d'amplification par RT-PCR spécifiques pour *HPT* montrent des niveaux d'expression comparables dans la plupart des lignées indiquant la stabilité du T-DNA intégré dans les génomes de ces lignées. Par contre, le niveau d'expression du gène *PHY-US417* semble présenter des niveaux d'expression variables (**Figure 13-C**).

Deux lignées homozygotes (génération T3) L7 et L9 intégrant une copie du gène *PHY-US417*, ont été sélectionnées pour la suite des analyses.

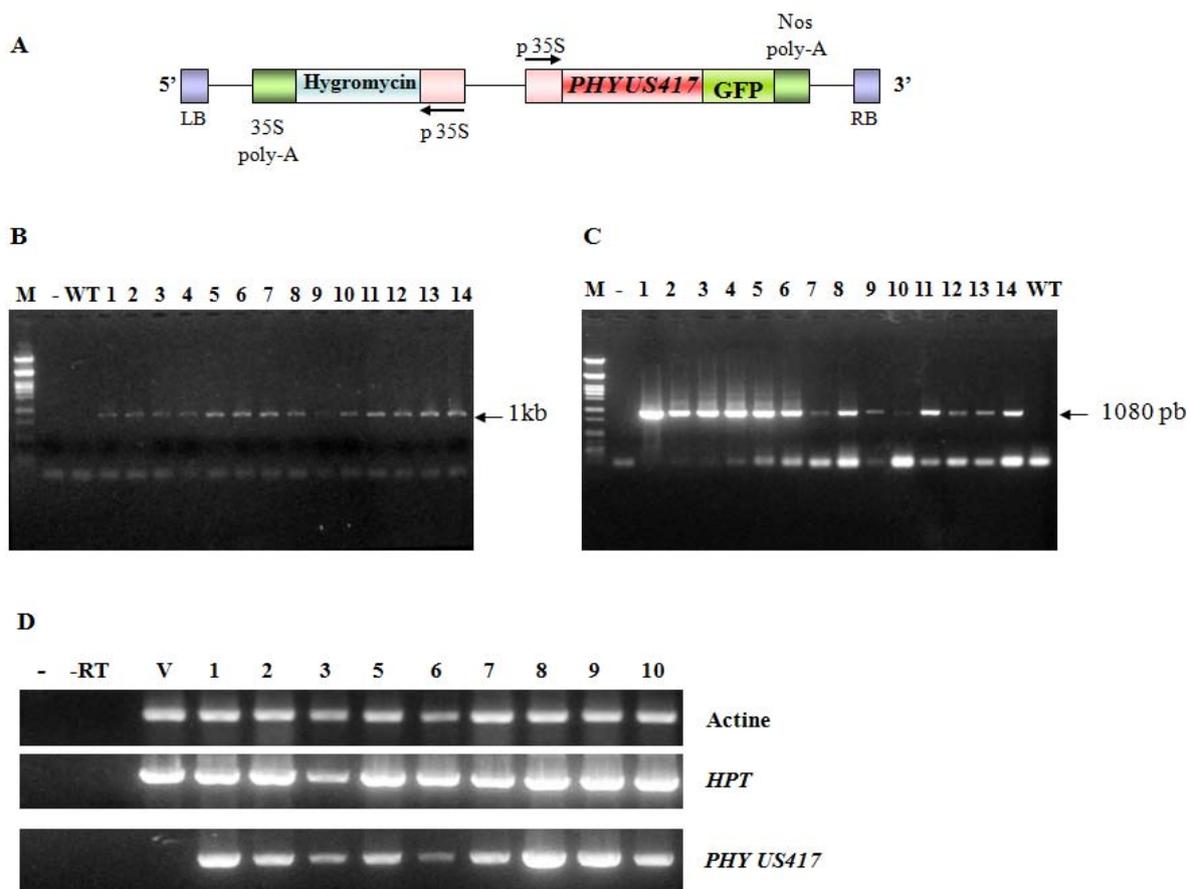


Figure 13 : Production de plantes transgéniques surexprimant le gène *PHY-US417*.
A : Carte physique de la construction pC1302-*PHY-US417*. Détection par PCR des gènes *HPT* (**B**) et *PHY-US417* (**C**) chez les plantes transgéniques. **M:** marqueur de taille λ PstI; **-:** H₂O; **1 à 14 :** ADN de différentes lignées transgéniques. **WT:** ADN de sauvage. (**D**) Analyse de l'expression de *PHY-US417* par RT-PCR. **-:** contrôle négatif (H₂O); **-RT:** sans reverse transcriptase; **V:** produit d'amplification par RT-PCR à partir de la lignée intégrant le vecteur vide. **1 à 10:** produits d'amplification par RT-PCR à partir des lignées intégrant *PHY-US417* (L1, L2, L3, L5, L6, L7, L8, L9, L10).

II.2. Dosage de l'activité phytasique et du taux d'AP chez les plantes transgéniques:

Dans le but de mesurer l'activité phytasique des plantes transgéniques surexprimant *PHY-US417*, on a commencé par l'extraction de protéines totales solubles à partir de jeunes plantules des deux lignées L7 et L9 cultivées préalablement sur milieu MS. Ensuite, 100 μ g de protéines totales de chaque échantillon ont servi pour le dosage de l'activité phytasique par la méthode du Bleu de Molybdate (Engelen *et al.*, 1994).

Ces dosages ont été effectués dans les conditions optimales pour la phytase PHY-US417 (pH 7,5 et 55°C) mais pas pour les phytases endogènes d'*Arabidopsis*. Nos résultats ont montré que l'activité phytasique mesurée chez les lignées transgéniques L7 ($1.31 \pm 0,81$ U / g FW) et L9 ($4.79 \pm 0,64$ U / g FW) est d'environ 8 à 28 fois plus élevée que celle des plantes sauvages

(0.17 ± 0.04 U/g FW). Ce résultat avec les données de l'expression de *PHY-US417* démontrent que les lignées transgéniques d'*Arabidopsis* peuvent produire une forme active de cette phytase.

À la lumière de ces résultats, on s'attend à ce que l'augmentation de l'activité phytasique résulte en une diminution du contenu d'AP. Pour cela le dosage d'AP à partir des graines des deux lignées transgéniques L7 et L9 et des plantes sauvages (Col-0) a été effectué par colorimétrie comme décrit par Haug et Lantzsch (1983).

Comme le montre la figure 14, les deux lignées transgéniques contiennent des teneurs en AP nettement inférieures (réduction de 40%) que celles enregistrées chez le témoin (Col-0), démontrant ainsi que l'activité phytase enregistrée au niveau des plantes transgéniques aboutit à la diminution du contenu d'AP.

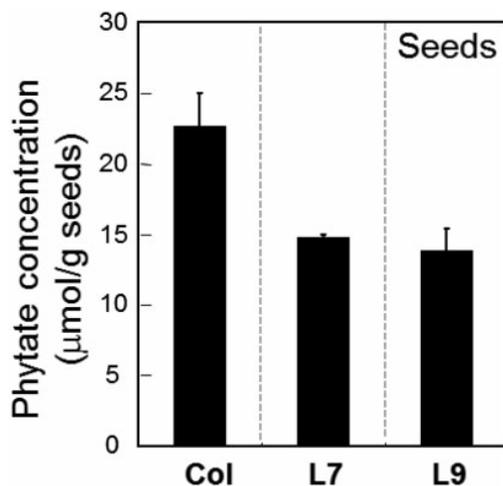


Figure 14: Dosage de la concentration de phytate à partir des graines des plantes sauvages et des deux lignées transgéniques (L7 et L9). Les concentrations en phytate ont été déterminées par méthode colorimétrique comme décrit précédemment (Haug et Lantzsch, 1983) et exprimé en $\mu\text{mol PA/g seeds}$. Les données sont les moyennes de trois répétitions indépendantes. Chaque répétition a été obtenue à partir de l'analyse des graines collectées à partir d'un pool de six plantes.

II.3. Effet de la surexpression de *PHY-US417* sur la croissance des plantes transgéniques dans des conditions de carence en P:

Dans le but d'étudier l'effet de la surexpression de *PHY-US417* sur la croissance des plantes transgéniques en conditions de stress phosphaté. Les graines des deux lignées transgéniques L7 et L9 ont été germées dans des conditions de carence en P (MS-P) en variant la période de stress 5, 10, 15 et 20 jours. Après, les plantules ont été transférées sur milieu MS standard pour 10 jours supplémentaires. Le mutant *ipk1-1* ayant une réduction d'environ 80% de la teneur en AP par rapport au sauvage (Stevenson-Paulik et al., 2005) a également été inclus dans cette

expérience. Les lignées transgéniques, et dans une moindre mesure le mutant *ipk1-1*, montrent une meilleure reprise de croissance (**Figure 15- A**) après un stress en P par rapport aux plantes contrôle (Col-0).

En fait, au bout de 10 jours de croissance sur un milieu MS, les lignées L7 et L9 ont montré plus de vigueur, qui se traduit par une augmentation (jusqu'à 50%) du poids frais et sec de la partie aérienne et en particulier du système racinaire par rapport aux plantes sauvages (**Figure 15- B & C**). Ces données montrent que la surexpression de la phytase bactérienne favorise la croissance des lignées transgéniques après une carence en P.

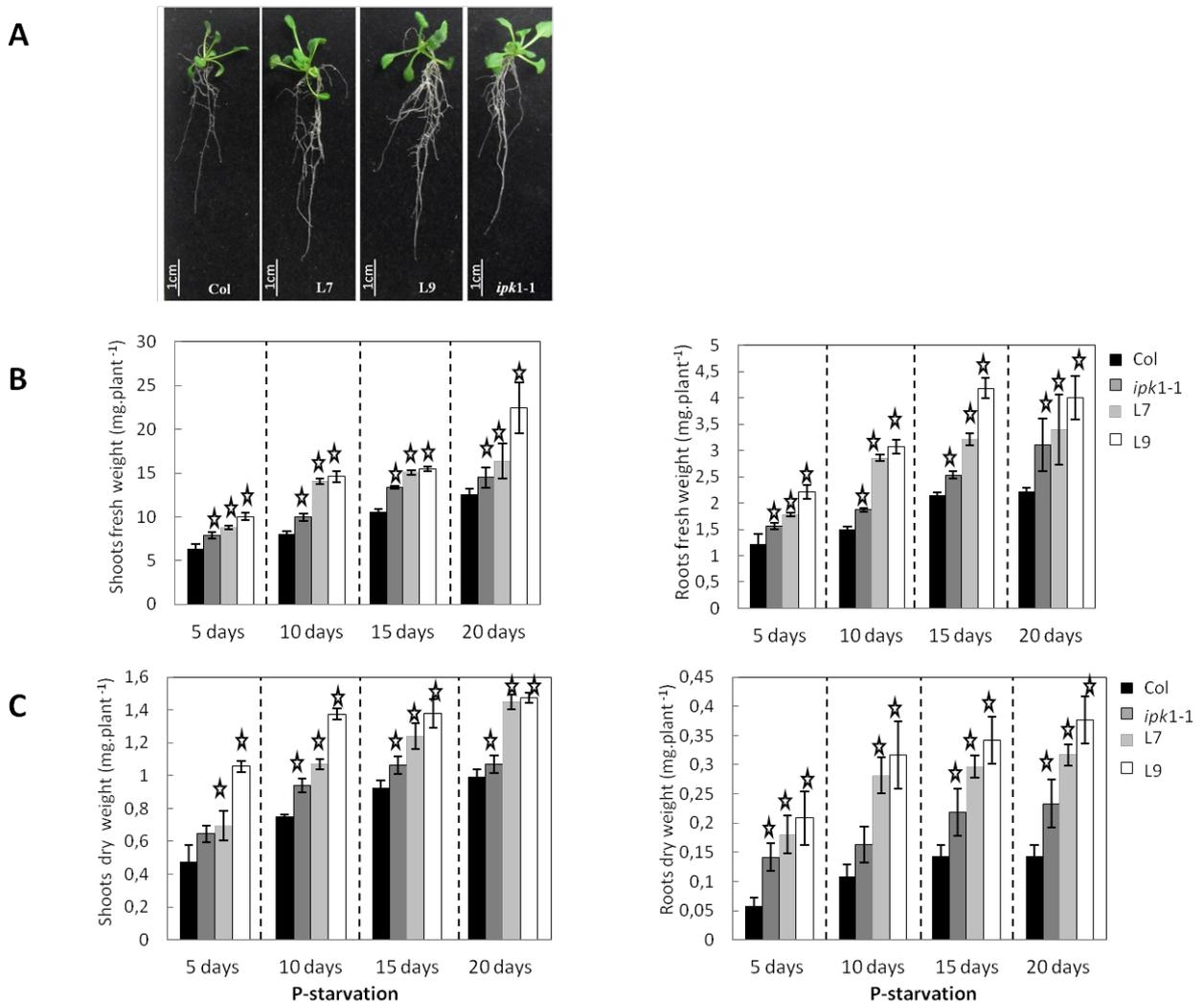


Figure 15: Analyse de la reprise de la croissance des lignées transgéniques après leur germination dans des conditions de carence en P.

Les plantules ont été germées pendant 5, 10, 15 et 20 jours sur un milieu MS-P et ont été ensuite transférées sur milieu MS standard pendant 10 jours.

A : Photo représentative des plantules Col, L7, L9 et *ipk1*, prise 10 jours après le transfert sur milieu MS (+ Pi), suite à leur croissance sur un milieu déficient en P (MS-P) pendant 15 jours. **B, C :** Mesure du poids frais et sec des racines et des feuilles après transfert. Les résultats présentés correspondent aux moyennes obtenues à partir de sept plantes et de trois répétitions biologiques.

II.4. Remobilisation du fer chez les lignées transgéniques

L'AP est stocké dans les graines dans des vacuoles de stockage protéique sous forme de sels mixtes, constitués de différents cations métalliques tels que le Fer. Chez *Arabidopsis*, il a été démontré que pendant la germination, le pool de fer est remobilisé à partir des embryons matures pour alimenter les autres tissus afin d'assurer le développement de la jeune plantule (Roschzttardt et al., 2009). Ici l'effet de la diminution de la teneur en AP sur la mobilisation du stock de fer au cours de germination a été étudié en développant un test de détection histochimique spécifique de ce cation (Roschzttardt et al., 2009). Ce test a été réalisé aussi bien chez les lignées transgéniques que chez le mutant *Atipk1-1*. Le résultat du test de coloration a montré que la concentration du Fe dans les embryons matures est identique entre les lignées testées et le contrôle (Col) (Figure 16-A). Deux jours après la germination on remarque que la concentration du fer dans les tissus vasculaires des lignées transgéniques ainsi que chez le mutant *ipk1-1* est nettement inférieure à celle du contrôle (Figure 16- B). Cette observation indique que les lignées mutantes (L7, L9, *ipk1-1*) acquièrent une meilleure capacité à mobiliser le fer, contrairement aux plantes sauvages. Ces données suggèrent fortement que la diminution du taux d'AP suite à la surexpression de PYH-US417 améliore la remobilisation du fer au cours de la germination. Il est en outre important de souligner que le pouvoir germinatif des graines des lignées L7 et L9 n'est pas affecté par la baisse de la teneur en AP. Jusqu'à présent, seules quelques études ont décrit un potentiel normal de germination suite à la réduction du taux d'AP. C'est le cas par exemple du riz où l'inhibition de l'expression du gène candidat *IPK1* aboutit à réduire considérablement le taux d'AP au niveau des graines sans affecter la croissance et le développement des plantes transgéniques (Ali et al., 2013). De manière similaire, la mutation du gène *IPK1* chez *Arabidopsis* affecte sévèrement la synthèse d'AP sans altérer la germination des graines et l'apparence des cotylédons (Stevenson-Paulik et al., 2005). Il est donc possible que les lignées transgéniques rapportées dans cette étude ainsi le mutant *ipk1-1*, pauvres en AP, maintiennent un bon potentiel germinatif grâce à la l'amélioration de la biodisponibilité du Fer et à priori d'autres cations (Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+}) qui sont liés à l'AP.



Figure 16 : Coloration histochimique du fer au Perls/DAB indiquant la remobilisation du fer lors de la germination chez les plantes sauvages (WT) le mutant *ipk1-1* et les deux lignées transgéniques L7 et L9 à partir des embryons matures extraits de graines (A) et de plantules germées deux jours sur milieu liquide sans fer (B).

II.5. Effet de la surexpression de PHY-US417 sur le contenu en phosphate et en sulfate chez les plantes transgéniques :

Nous avons ensuite investigué l'effet de la diminution du taux d'AP suite à la surexpression de la phytase PHY-US417 sur le contenu des principaux anions inorganiques, y compris le Pi. Les plantes ont été cultivées sur un milieu carencé en P pendant 15 jours. Ensuite quelques plantules ont été transférées sur un milieu standard contenant 1 mM Pi pour 10 jours supplémentaires. Les analyses chromatographiques sur les extraits végétaux des lignées testées ont révélé que dans des conditions de carence en P (-P), les plantes transgéniques accumulent 40 à 50% plus de Pi dans leurs tiges que les plantes WT (**Figure 17-A**). Une fois transférées sur milieu additionné de Pi (+P), la différence entre les plantes WT et les surexprimeurs de phytase est atténuée. Aucune différence significative n'a été enregistrée au niveau des racines entre les lignées testées, ni en condition de carence (-P), ni durant la phase de récupération (transfert sur +P). De manière intéressante, les plantes transgéniques accumulent dans leurs tiges, des niveaux de sulfates nettement supérieurs (45%) à ceux des plantes sauvages que ce soit en conditions d'absence ou de présence de Pi. Cependant la différence avec les plantes sauvages reste moins importante en ce qui concerne les concentrations de SO_4 enregistrées dans les racines (**Figure 17-B**). Il est possible que le contenu élevé en sulfate compense la diminution du contenu du Pi au niveau des tiges. Ainsi,

ces résultats indiquent, qu'en condition de carence en P, la surexpression de PHY-US417, pourrait affecter la distribution inter-organes du Pi et du sulfate.

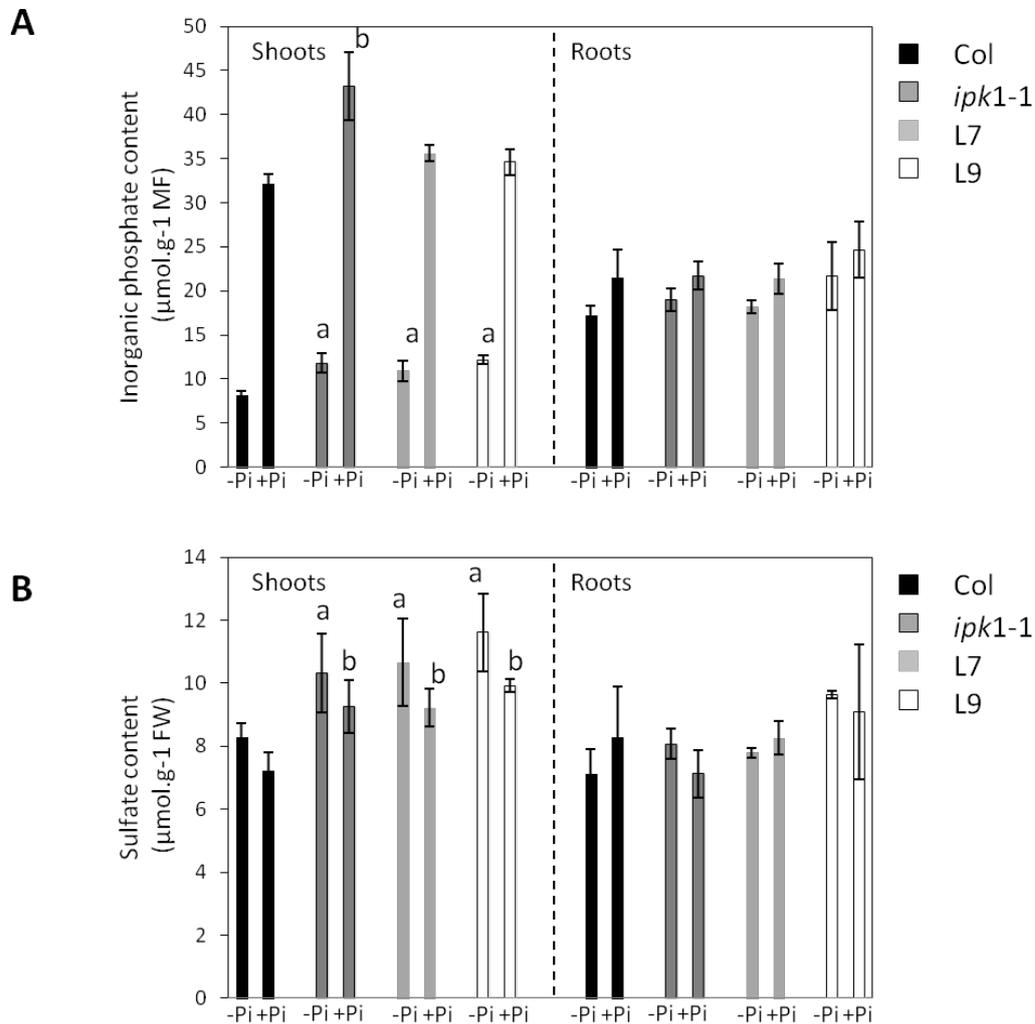


Figure 17: Effet de la surexpression de PHY-US417 sur le contenu du Pi et SO₄ au niveau des plantes transgéniques. Les teneurs foliaire et racinaire en anions majeurs Pi (A) et sulfate (B) (exprimées en µmol/g de masse fraîche) ont été déterminées par HPIC chez les lignées transgéniques (L7 et L9), le mutant *ipk1-1* et les plantes sauvages. Les plantes testées sont cultivées en absence du P (-P ; avant transfert) pendant 15 jours puis transférées sur milieu MS pour 10 jours supplémentaires (+P ; après transfert). Les valeurs présentées sont les moyennes de trois répétitions biologiques. Chaque répétition correspond à l'analyse des feuilles ou de racines collectées séparément à partir d'un pool de six plantules. (a) et (b) indiquent une différence statistiquement significative (P < 0,05) avec les plantes WT (Col).

II.6. Niveau d'expression des transporteurs de SO₄ et de Pi chez les lignées transgéniques :

Pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels la surexpression de PHY-US417 affecte la distribution inter-organes du Pi et de SO₄, nous avons étudié les profils d'expression d'un nombre de transporteurs de Pi, SO₄ et de NO₃ (pris comme témoin).

Pour cela, des RT-PCR quantitatives ont été réalisées pour mesurer le niveau d'expression des transporteurs de phosphate (*PHT1;1* et *PHT1;4*) (Misson *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2004), de sulfate (*SULTR1;1* et *SULTR1;2*) (Yoshimoto *et al.*, 2002), de nitrate (*NRT1;1* et *NRT2;1*) (Forde, 2000; Tsay *et al.*, 2007), et les gènes qui sont impliqués dans le chargement du phosphate (*PHO1*, *POH1;H1*) (Stefanovich *et al.*, 2007) dans le xylème ainsi que le gène *IRT1* impliqué dans l'absorption du fer (Vert *et al.* 2002). Ces analyses ont été menées sur les lignées transgéniques L7 et L9 en parallèle avec le mutant *ipk1-1* cultivées sur un milieu carencé en P pour 15 jours avant leur transfert sur milieu standard pour 10 jours supplémentaires.

Les résultats obtenus (**Figure 18**) montrent qu'à l'opposé des plantes sauvages, les gènes *PHT1;1*, *PHT1;4*, *PHO1;H1* et *SULTR1;2* sont induits au niveau des racines aussi bien chez les transgéniques que chez le mutant. Aucun changement significatif n'a été observé dans les niveaux d'expression des deux transporteurs de nitrate testés et du gène *IRT1*.

Ce résultat indique clairement que la surexpression de la PHY-US417, et par conséquent la réduction du niveau d'AP, peut affecter à la fois le transport du SO₄ et du Pi chez les plantes d'*Arabidopsis*.

Une interaction entre l'homéostasie du Pi et du SO₄ et a été déjà rapportée aux niveaux physiologiques et moléculaires (Rouached *et al.*, 2011) mais aucun métabolite impliqué dans cette homéostasie n'a été identifié chez les plantes supérieures. Notre résultat place l'AP comme un candidat intéressant qui pourrait être impliqué dans les cascades de signalisation régulant l'expression des transporteurs du Pi et SO₄ chez les plantes.

Dans le même contexte, une mutation non-sens d'un transporteur de sulfate HvST (*Hv SULTR3;3*) est à l'origine d'un phénotype *lpa* chez le mutant d'orge *lpa1-1*, caractérisé par une diminution de 50% du taux d'AP avec une augmentation équivalente des niveaux du Pi. Les auteurs suggèrent que ce transporteur peut être impliqué dans la synthèse d'AP (Ye *et al.*, 2011). Récemment Zhao *et al.*, (2016) ont décrit un mutant MH86-*lpa* de riz (brun) qui montre une réduction (43.9–35.2%) de la concentration en AP et aussi une augmentation importante de celle du Pi (108–170%) malgré cela la concentration en P totale montre une

réduction de (27,52 -18,9%). Ceci est dû au fait que l'augmentation de la quantité du Pi était inférieure à la diminution de la quantité d'AP. Cette mutation n'a pas abouti à la production des intermédiaires inositol polyphosphate (comme inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate). Fait intéressant, cette mutation touche aussi le transporteur sulfate *OsSULTR3;3*, impliqué probablement dans le transport du sulfate, et il en résulte un changement des concentrations du phosphate et du sulfate aussi bien dans les tissus végétatifs que les graines, renforçant ainsi la possible interconnexion entre l'homéostasie et/ou la signalisation du Pi et du SO₄.

Dans cette étude malgré la réduction du taux d'AP chez le mutant *MH86-lpa*, les auteurs font pencher la balance en faveur l'implication du transporteur *OsSULTR3;3* dans la régulation de cette interconnexion plutôt qu'à l'AP car ils n'ont pas observé de changements similaires de métabolites chez d'autres mutants *lpa* de riz (Frank et al., 2007).

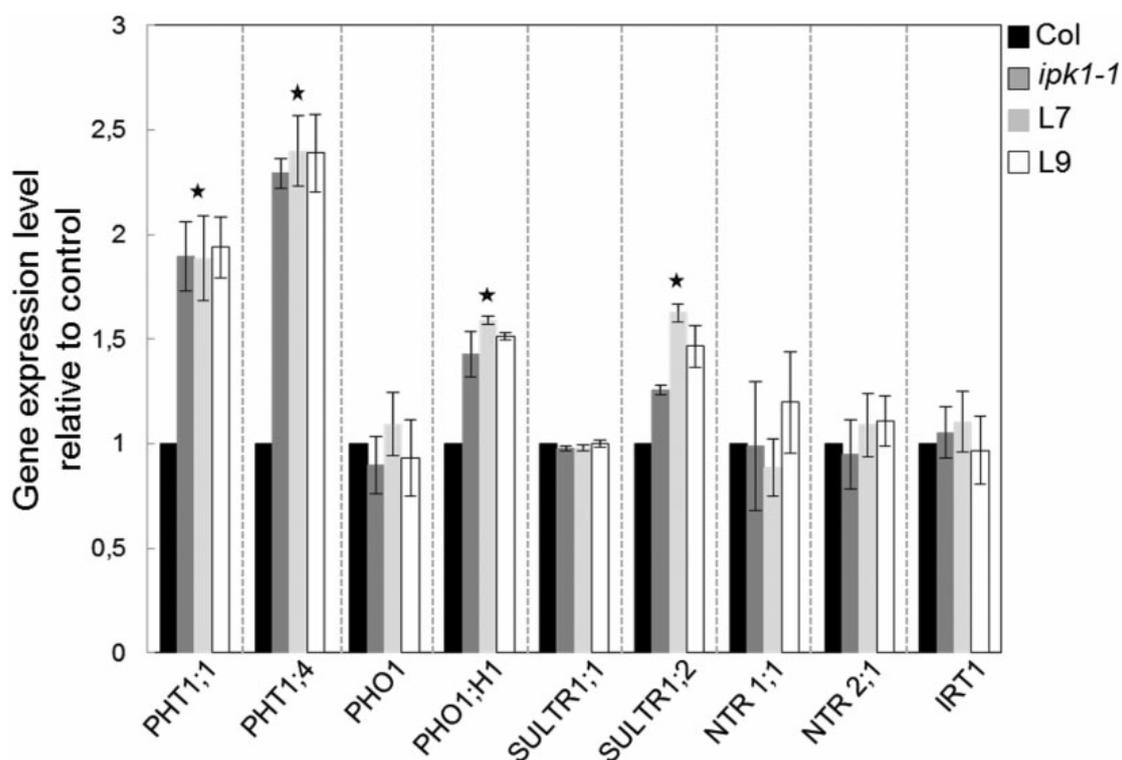


Figure 18: Niveaux d'expression des gènes impliqués dans le transport du Pi (*PHT1;1*, *PHT1;4*, *PHO1* et *PHO1;H1*), sulfate (*SULTR1;1* et *SULTR1;2*), nitrate (*NTR1;1* et *NTR2;1*) et fer (*IRT1*) chez les plantes WT, le mutant *ipk1-1* et les deux lignées transgéniques L7 et L9. Ces plantes ont été cultivées en absence de Pi pendant 15 jours, elles ont ensuite été transférées sur milieu standard pour 10 jours. Les racines ont été récoltées et les niveaux d'expression des transporteurs indiqués ci-dessus ont été quantifiés par RT-qPCR en utilisant le gène *UBQ10* (*At4g05320*) comme gène de référence. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart type. Trois répétitions biologiques ont été réalisées et chaque répétition a été obtenue à partir de l'analyse des racines récoltées de six plantules. (*) : Statistiquement significatif.

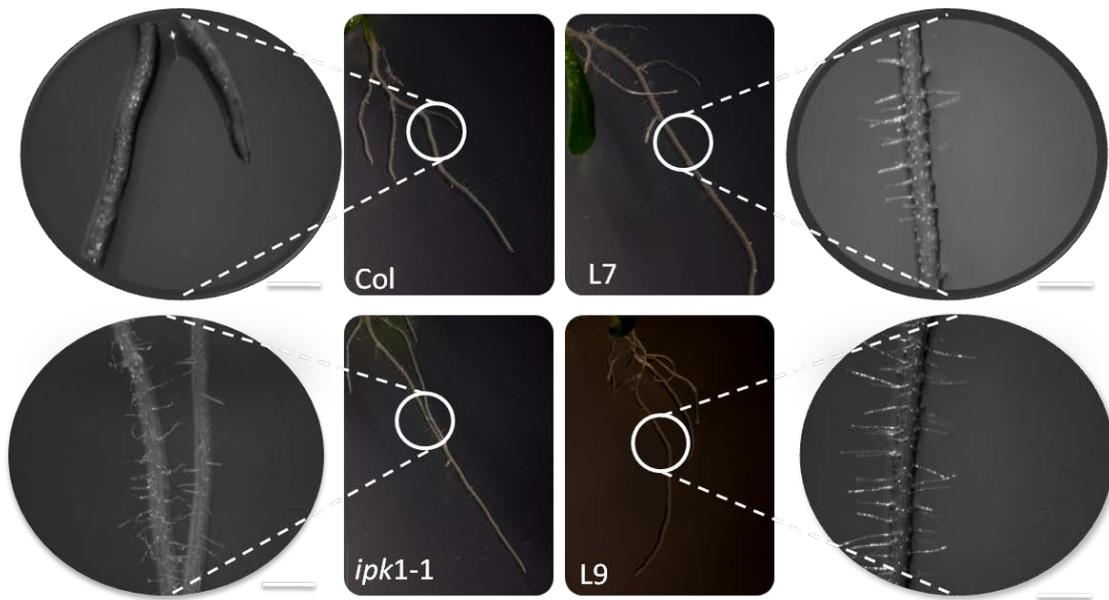
II.7. Effet de la surexpression de PHY-US417 sur la perception et la signalisation phosphatées :

Etant donné que l'homéostasie du P semble être altérée chez les plantes transgéniques (comme chez le mutant *ipk1-1*), et que celles-ci montrent une meilleure croissance racinaire après une carence phosphatée, on s'est interrogé si la sensibilité de ces lignées au Pi extérieur est aussi modifiée.

Pour cela, les graines des différents génotypes, sauvages et transgéniques ont été mises à germer sur milieu sans phosphate pendant 5 jours puis les plantules sont transférées sur milieu MS standard (+1 mM Pi) pour 5 jours supplémentaires. Ensuite, les observations microscopiques des racines ont montré que les lignées transgéniques et le mutant *ipk1-1* continuent à produire des poils absorbants même en conditions standards (1 mM Pi). En revanche ces poils absorbants étaient totalement absents au niveau des racines des plantes WT (**Figure 19- A**). Ces résultats sont conformes avec ceux déjà rapportés chez le mutant *ipk1-1* (Stevenson-Paullik *et al.*, 2005), et suggèrent fortement que la surexpression de cette phytase bactérienne réduit la capacité d'*Arabidopsis* à percevoir les niveaux extracellulaires du Pi vu que ces lignées transgéniques perdent la capacité de limiter la formation des poils absorbants en présence de Pi.

Afin de renforcer notre hypothèse, nous avons analysé le niveau d'expression de deux gènes *IPS1* et *AT4* qui sont 2 ARNs non codants impliqués dans la voie de signalisation du P et qui sont induits suite à une carence en P (Shin *et al.*, 2006 ; Franco-Zorrilla *et al.*, 2007). Dans notre cas, ces deux gènes marqueurs sont induits chez les lignées transgéniques même en conditions standards mais à des niveaux inférieurs en comparaison avec le mutant *ipk1-1* (**Figure 19- B**). Par conséquent, ce résultat renforce l'idée que la diminution des niveaux d'AP, soit dans les lignées transgéniques surexprimant *PHY-US417* ou dans le mutant *ipk1-1* affecte la signalisation du Pi chez *Arabidopsis*.

A



B

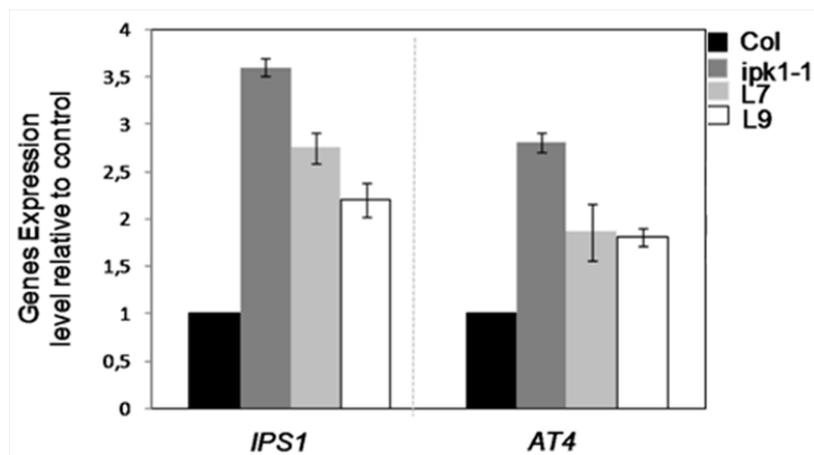


Figure 19 : La surexpression du *PHY-US417* altère la perception et la signalisation chez les plantes d'*Arabidopsis*. (A) Des photos représentatives de la racine primaire et des poils absorbants des plantes sauvages, transgéniques et du mutant, âgées de 10 jours. Les plantes ont été cultivées 5 jours sur MS-P puis transférées 5 jours de plus sur MS+P. Les images ont été prises par microscopie optique (Olympus système d'imagerie Soft). Les parties des racines qui ont été choisies pour l'examen de la formation des poils absorbants sont présentées dans des fenêtres supplémentaires. (B) Niveaux d'expression des 2 gènes marqueurs *IPS1* et *AT4* chez le WT, le mutant *ipk1-1* et les deux lignées transgéniques L7 et L9 à partir de 10 plantules cultivées comme décrit dans (A). Les niveaux d'expression de ces 2 ARN non codants ont été quantifiés par RT-qPCR en utilisant le gène *UBQ10* (*At4g05320*) comme gène de référence. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart type de trois répétitions biologiques.

Conclusion

Les résultats présentés dans ce chapitre montrent que la phytase PHY-US417 ajoutée au milieu a la capacité de stimuler la croissance des plantes d'*Arabidopsis in vitro* dans des conditions de carence en P.

En outre, les plantes transgéniques d'*Arabidopsis* surexprimant cette phytase présentent des activités phytasiques nettement supérieures aux plantes sauvages. L'augmentation de cette activité est corrélée avec une diminution du taux d'AP dans les graines de 40%. Cette réduction n'a pas affecté la formation des graines et leur potentiel de germination. En fait l'hydrolyse de l'AP grâce à la surexpression de cette phytase permet de libérer non seulement les groupements phosphates mais aussi les cations essentiels pour le métabolisme des plantes, comme démontré pour la remobilisation du fer, qui paraît plus importante chez les transgéniques lors de la germination. Un tel résultat représente la première illustration expérimentale d'un lien entre l'AP et la remobilisation du fer lors du développement des jeunes plantules.

De plus, des analyses physiologiques ont montré que lorsque les lignées transgéniques qui sur-expriment la phytase et le mutant *ipk1-1* sont soumises à un stress phosphaté elles montrent une croissance nettement meilleure aux plantes WT (Col). L'augmentation des niveaux intracellulaires du Pi et du sulfate chez les lignées testées (L7, L9 et *ipk1-1*) permet d'expliquer cette performance observée surtout lors de la reprise des plantes après une carence phosphatée. Cette altération du statut interne de ces deux éléments a été confirmée par l'induction de quelques transporteurs de Pi et de SO₄. A ces résultats s'ajoute l'induction de deux gènes impliqués dans la voie de signalisation du P (*IPS1* et *AT4*). Ceci nous amène à conclure que l'AP constitue non seulement une forme de stockage au niveau des graines mais pourrait agir aussi comme une molécule de signalisation qui régule l'interaction entre l'homéostasie du phosphore et celle du sulfate.

Chapitre II :

Etude de l'implication de l'acide phytique dans l'interconnexion entre les voies de signalisation régulant l'homéostasie du phosphore et du zinc

Etude de l'implication de l'acide phytique dans l'interconnexion entre les voies de signalisation régulant l'homéostasie du phosphore et du zinc

Au niveau cellulaire, les charges négatives des groupements phosphates au niveau des inositol phosphates de l'InsP₃ à InsP₆ (acide phytique) leur donne la capacité de former des précipités avec le Ca²⁺, le Mg²⁺ et le K⁺ et également avec les métaux comme le Fe²⁺, le Zn²⁺ et le Mn²⁺ (Bohn *et al.*, 2008 ; Greiner *et al.*, 2006). La capacité de se lier à ces cations est plus importante pour InsP₆. *In vitro*, il a été démontré que la liaison d'InsP₆ avec le métal Zn et Cu est plus forte que celle avec le Fe²⁺, Mn²⁺ et Ca²⁺ (Vohra *et al.*, 1965 ; Persson *et al.*, 1998 ; Maddaiah *et al.*, 1964). *In vivo*, la liaison d'InsP₆ à ces cations ne suit pas nécessairement cet ordre d'affinité. En fait, les cations Mg²⁺, K⁺ et Ca²⁺ ou Ca²⁺, K⁺ et Fe²⁺ montrent la plus haute affinité pour l'InsP₆ respectivement chez le blé et le riz (Bohn *et al.*, 2007 et 2008 ; Iwai *et al.*, 2012).

Ces données, nous ont amené à penser à une possible relation entre l'AP et l'homéostasie de certains éléments autres que le P. On s'est ici plus particulièrement intéressé à investiguer si l'AP pourrait être impliqué dans l'interconnexion entre les voies de signalisation régulant l'homéostasie du P et du Zn.

I. Étude de la réponse des plantes à faible teneur en phytate à la carence en minéraux :

Dans le but de tester l'effet de la réduction du taux d'AP sur la réponse des plantes à la carence d'autres minéraux, nous avons initié une série de tests de croissance sur les lignées transgéniques L7 et L9 *in vitro* dans différentes conditions de carence en appliquant des traitements simples (-P / -Zn) et combinés (-P-Zn) tout en intégrant le mutant *ipk1-1*. Après 20 jours de croissance, le système racinaire des lignées transgéniques présente un développement nettement supérieur à celui des plantes sauvages en condition de carence en zinc (**Figure 20- A & B**). En revanche, cette amélioration n'est pas assez claire chez le mutant *ipk1-1* en condition -Zn. Cette observation révèle que la réduction du taux d'AP est associée à un meilleur maintien de la croissance racinaire sur un milieu dépourvu de Zn chez les lignées transgéniques (L7 et L9), en comparaison avec les plantes contrôles (Col). Cette amélioration du développement racinaire est encore visible chez les lignées transgéniques même en condition de double carence (-P-Zn).

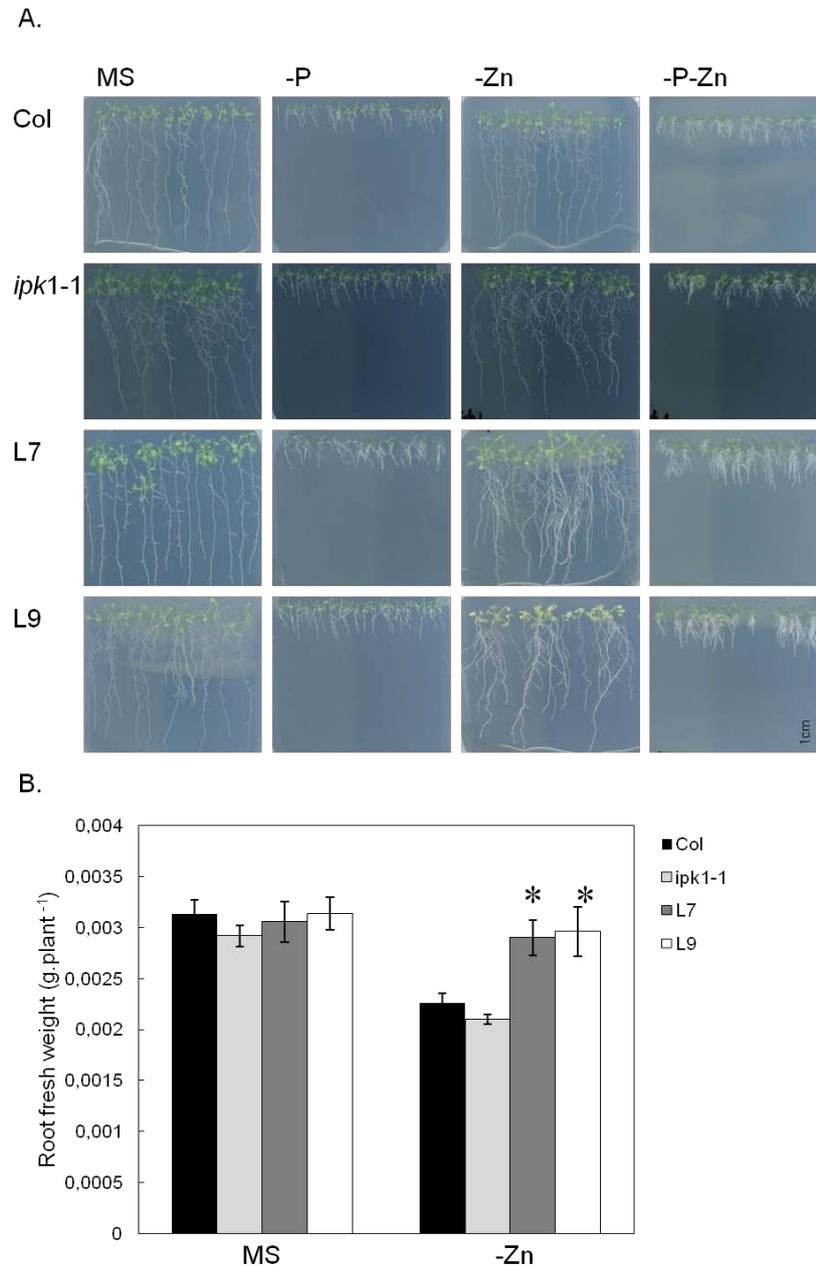


Figure 20: Effets de la carence en Zn, en Fe et en Pi sur la croissance des génotypes étudiés (Col, *ipk1-1*, L7, L9). **A.** Les graines ont été semées directement sur les différents milieux indiqués et les plantules ont été photographiées après 20 jours de croissance. Ces tests ont été menés 3 fois et ont abouti aux mêmes résultats. **B.** Poids frais des racines des plantules cultivées 20 jours sur milieu MS complet (MS) ou déficient en Zn (-Zn). Les valeurs sont des moyennes de 3 répétitions. Les astérisques (*) indiquent une différence statistiquement significative ($P < 0,05$) avec les plantes d'*Arabidopsis* sauvages (Col).

II. Effets de la réduction du taux d'AP sur l'accumulation du Pi et du Zn

Ces tests physiologiques ont été suivis par des dosages de la concentration Pi et du Zn dans les feuilles pour évaluer l'effet de la réduction du taux d'AP sur l'accumulation de ces deux éléments dans différentes conditions de culture, à savoir carence en P, en Zn ou en condition standard (MS). Pour cela, les plantes ont été cultivées pendant 20 jours en présence ou en absence de P ou de Zn, puis les feuilles collectées ont servi pour la détermination du contenu en Pi et en Zn. La teneur en Pi a été déterminée par le test du molybdate (Ames, 1966) et celle du Zn à l'aide d'un spectrophotomètre à absorption atomique. Les résultats obtenus sont illustrés par la **figure 21**. Dans les conditions standards (milieu MS), la teneur en Pi chez les lignées transgéniques (L7 et L9) et aussi chez le mutant *ipk1-1* augmente d'environ deux fois par rapport aux plantes sauvages (Col). Dans un milieu MS carencé en P, la teneur en Pi diminue fortement par rapport au milieu standard chez tous les génotypes testés mais comme attendu les lignées transgéniques et le mutant gardent des concentrations nettement supérieures à celle du WT.

Dans un milieu dépourvu de Zn, la teneur du Pi dans la partie aérienne des plantes sauvages (Col) augmente de 23% ($P < 0,05$) par rapport aux conditions standard conformément aux résultats obtenus précédemment par Khan et al., (2014) et qui révèlent qu'une déficience en Zn est accompagnée d'une accumulation plus importante en Pi et vice versa. Cependant, cette augmentation de Pi n'est pas observée chez les sur-expressseurs et le mutant. En fait ces lignées maintiennent des niveaux comparables à ceux enregistrés en condition standard mais qui restent en tout cas supérieurs par rapport aux plantes sauvages en condition de carence en Zn (**Figure 21- A**). Ces résultats indiquent que la teneur interne en Pi varie en fonction de la présence du Pi et aussi du Zn dans le milieu de culture comme démontré précédemment (Khan et al., 2014 ; Jain et al., 2013). Il paraît que cette variation dépend aussi du taux intracellulaire en AP. En fait l'augmentation nette de la teneur en Pi observée chez les sur-expressseurs et le mutant en condition déficiente en Pi ou en Zn ou encore en milieu MS pourrait être attribuée à la diminution du taux d'AP.

En ce qui concerne la teneur en Zn on constate que les lignées transgéniques L7 et L9 avec le mutant *ipk1-1* présentent des comportements pratiquement similaires pour l'accumulation du Zn, qui était nettement supérieure aux plantes sauvages en conditions standards. Cette supériorité est respectivement de l'ordre de (40%, 70%, 82%). Ce résultat est en accord avec celui rapporté récemment par Abid et al., (2016) où la surexpression d'une phytase

d'*Aspergillus japonicus* au niveau de l'endosperme de blé a été corrélée avec une réduction de la teneur en AP au niveau des grains et une augmentation significative des teneurs en Zn et en Fe.

En condition de carence en P, l'augmentation de la teneur en Zn par rapport aux plantes sauvages reste notable chez les lignées testées L7, L9, *ipk1-1* et elle est de l'ordre de (37%, 23%, 31%). Cette augmentation devient moins marquée chez les lignées transgéniques (25%, 13%) voire inaperçue chez le mutant *ipk1-1* en absence du Zn (**Figure 21-B**).

Comme pour le Pi, nous pourrions conclure que l'accumulation du Zn dans la partie aérienne des plantes dépend de la richesse du milieu de culture en P et en Zn et que la réduction d'AP semble altérer la teneur intracellulaire en Zn tout en améliorant considérablement son accumulation en condition standard et à moindre degré en conditions de carence en P et en Zn chez les lignées transgéniques. Chez le mutant *ipk1-1* l'augmentation de l'accumulation du Zn est similaire à celle des lignées transgéniques en conditions standard ou déficientes en P. En revanche, les teneurs en Zn chez *ipk1-1* sont maintenues au même niveau que celui des plantes sauvages, en condition -Zn. Ceci suggère que des inositols phosphates générés chez les lignées L7 et L9 (mais pas chez le mutant) pourraient contribuer, bien que modestement, à une meilleure accumulation du Zn en condition de carence en ce métal.

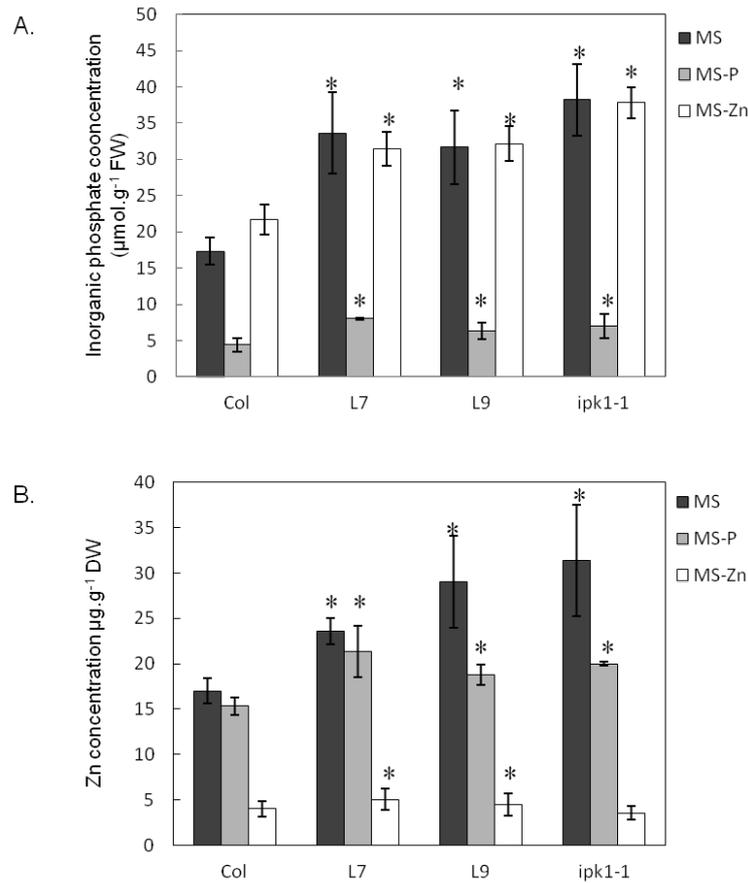


Figure 21: La teneur en Pi (A) et en Zn (B) au niveau des parties aériennes des lignées transgéniques (L7 et L9), du mutant *ipk1-1* et des plantes sauvages cultivées en conditions standard (MS) ou déficiences en P (MS-P) et en Zn (MS-Zn) pendant 20 jours. Les valeurs obtenues sont des moyennes de 3 essais indépendants. Les astérisques (*) indiquent une différence statistiquement significative ($P < 0,05$) avec les plantes contrôles (Col).

III. Évaluation de l'expression des transporteurs du Zn et du Pi en conditions de déficiences minérales

La comparaison des teneurs foliaires en P et en Zn chez les lignées transgéniques, le mutant et les plantes WT que ce soit en condition standard ou de carence en P et en Zn, nous amène à suggérer que la concentration intracellulaire d'AP régule le transport de ces éléments minéraux (P et Zn). Pour tester cette hypothèse nous avons vérifié si l'augmentation des teneurs en Pi et en Zn chez L7 et L9 dans des conditions de carences minérales sont associées à une activation des transporteurs de Zn ou de P. Les plantes sauvages (Col), transgéniques (L7 et L9) et mutantes (*ipk1-1*) ont été exposées à une carence en P et en Zn pendant 20 jours, collectées puis les ARN totaux ont été extraits à partir des racines de ces plantules, et ont été utilisés pour réaliser les expériences de RT-PCR sur un certain nombre de gènes impliqués dans le transport du Pi (*PHT1;4* et *PHO1;H3*) et de Zn (*ZIP4* et *ZIP9*).

Comme attendu, nos résultats montrent que le transporteur du Pi *PHT1;4* est induit en condition -P chez les plantes sauvages (Col). En comparaison avec Col, cette induction paraît un peu plus prononcée chez les transgéniques et le mutant en condition -P. De même, chez ces lignées (L7, L9 et *ipk1-1*) ce transporteur semble être induit par rapport aux plantes sauvages en conditions standards et de carence en Zn. Ceci renforce l'idée que la réduction d'AP pourrait affecter le transport du Pi dans les conditions testées (standard ou de carence).

Concernant le transporteur *PHO1;H3*, qui contrôle le contenu foliaire du Pi en réponse à une carence en Zn et qui joue un rôle important dans l'interconnexion entre la signalisation de la carence en Zn et la régulation de l'homéostasie du Pi chez *Arabidopsis* (Khan et al., 2014), nos résultats affirment l'induction (bien que faiblement) de ce transporteur chez les plantes sauvages (Col) en condition -Zn. Cependant, cette induction n'a pas eu lieu chez les lignées L7 et L9 et le mutant *ipk1-1*. Cette observation indique que l'AP pourrait intervenir dans la régulation du transport et l'homéostasie du Pi même en condition de carence en Zn.

Khan et al., (2014) ont rapporté, que le transporteur PHO1;H3 régule négativement l'activité du PHO1 ce qui limite le transfert du Pi et son accumulation excessive dans les feuilles, ceci pourrait expliquer l'accumulation du Pi en condition -Zn chez Col qui reste inférieure aux lignées L7, L9, *ipk1-1*.

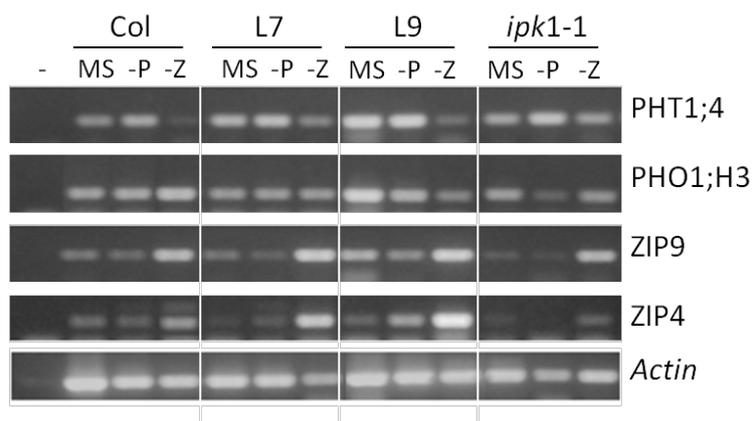


Figure 22: Analyse par RT-PCR de l'expression des transporteurs du Pi (*PHT1;4* et *PHO1;H3*) et du Zn (*ZIP4* et *ZIP9*) au niveau des racines des plantes sauvages (Col), transgéniques (L7 et L9) et mutantes (*ipk1-1*) en conditions standard (MS) et de carence en Pi (-Pi) et en Zn (-Zn).

En observant le niveau d'expression du transporteur du Zn (ZIP9), connu par son rôle dans l'acquisition et la mobilisation du Zn vers les parties aériennes puisqu'il est induit en condition -Zn (au niveau des racines et des feuilles), on remarque dans notre cas que ce transporteur est induit en condition -Zn en présentant des profils d'expression stables entre les différents génotypes testés sauvages, transgéniques et mutant.

Pour le transporteur *ZIP4*, il montre également une induction en condition -Zn aussi bien chez les plantes sauvages comme démontré par Gortz et *al.*, (1998) et Jain et *al.*, (2013) que chez le mutant et les lignées transgéniques. Cependant dans ces conditions (-Zn), les transcrits de *ZIP4* s'accumulent à des niveaux plus élevés chez L7 et L9 mais plus faibles chez *ipk1-1*, en comparaison avec le WT. Cette induction différentielle de *ZIP4* (en condition -Zn) pourrait être à l'origine de la perturbation du niveau intracellulaire du Zn. Ce résultat supporte notre hypothèse que le transport et l'homéostasie du Zn sont influencés par la réduction d'AP. Ce résultat corrobore aussi les dosages des teneurs en Zn dans les conditions de carence en ce métal et suggère de nouveau que les inositols phosphates générés chez les lignées L7 et L9 (mais pas chez le mutant) pourraient contribuer même faiblement à une meilleure accumulation du Zn via l'activation des transporteurs tels que *ZIP4*.

Ces résultats requièrent tout de même d'être affinés et complétés par des études d'expression quantitatives qui comprend un nombre de transporteurs (Pi et Zn) dépassant celui suivi dans cette étude.

Conclusion

Les résultats obtenus dans ce chapitre ont permis de mettre en évidence l'effet d'AP sur la réponse des plantes à la carence en zinc, vu que la diminution de la teneur d'AP conduit à une nette amélioration du développement (Figure 20). En plus, nos résultats montrent que les lignées transgéniques L7 et L9 et le mutant *ipk1-1* ayant des teneurs réduites en AP accumulent des quantités supérieures et plus disponibles en Zn dans leur partie aérienne en condition standard. Ceci indique que la diminution d'AP peut conduire à une biofortification en Zn dans les plantes comme décrit dans la littérature (Drakakaki et *al.*, 2005 ; Aluru et *al.*, 2011 ; Raboy, 2009) sans nuire au développement de la plante au cours de la germination, la croissance et le rendement en graines. En outre la meilleure accumulation de Zn chez les lignées L7 et L9 par rapport au mutant *ipk1-1*, nous amène à proposer que des inositols phosphates générées suite à l'hydrolyse de l'AP par la phytase pourraient être impliqués dans ce processus. Alternativement, la baisse des teneurs en AP ne devrait pas aller au delà d'un

certain seuil (chez *ipk1-1* la réduction du taux d'AP est 2 fois plus importante par rapport aux lignées L7 et L9) pour que celle-ci apporte à la plante les effets bénéfiques de la biofortification en Zn.

Chapitre III :

Effet de la surexpression de la phytase PHY-US417 sur la tolérance des plantes d'*Arabidopsis* aux stress abiotiques

Effet de la surexpression de la phytase PHY-US417 sur la tolérance des plantes d'*Arabidopsis* aux stress abiotiques

Il a été bien documenté que divers inositolpolyphosphates (IPP) et polyphosphoinositides (PPI) fonctionnent comme messagers secondaires dans divers processus de signalisation y compris ceux régissant les réponses aux stress (Meijer et al., 1999; Dröbak et al., 2000; DeWald et al., 2001; Takahashi et al., 2001; Tagi et al., 2006; Munnik et Vermeer, 2010). Dans notre cas la surexpression de la PHY-US417 diminue le taux d'AP chez les plantes transgéniques, mais serait aussi associée à une variation dans le pool des IPP. Ceci nous a amené à investiguer la réponse de ces lignées sur-exprimant *PHY-US417* à divers stress et plus particulièrement ici la salinité et le stress osmotique.

I. Etude de la réponse des lignées surexprimant *PHY-US417* aux stress abiotiques

Afin d'évaluer la contribution de la variation de la teneur d'AP (et/ou d'autres inositolphosphates) observée chez les plantes transgéniques suite à la surexpression de *PHY-US417* dans les réponses des plantes aux stress abiotiques, les graines des plantes sauvages (Col) et transgéniques (L7 et L9) ont été mises à germer sur milieu MS standard en absence (MS) ou en présence de NaCl (125 mM), de mannitol (150 mM) ou d'ABA (1 μ M). Le mutant *ipk1-1* d'*Arabidopsis* connu pour son contenu faible en AP (Stevenson-Paullik et al., 2005) a également été inclus dans toutes ces expériences. En conditions standard (MS) nous n'avons pas décelé de différence notable au niveau de la germination des graines ou le développement des racines entre les différents génotypes testés.

En conditions de stress, le mutant *ipk1-1* paraît plus sensible que les plantes sauvages aux différents stress appliqués et en particulier sous contrainte saline (MS+NaCl) où il montre une germination et un développement racinaire fortement affectés (**Figure 23-A**). En revanche, les lignées transgéniques L7 et L9 ne présentaient pas cette sensibilité au sel et paraissaient même légèrement plus tolérantes au stress salin que les plantes WT. En outre, ces lignées semblent être plus tolérantes au stress osmotique et moins sensibles à l'ABA que les plantes WT, avec un développement racinaire nettement meilleur (**Figure 23- A & B**). L'insensibilité des lignées L7 et L9 à l'ABA a été confirmée en les soumettant à des doses croissantes de cette hormone (1-5 μ M) (**Figure 23- B**).

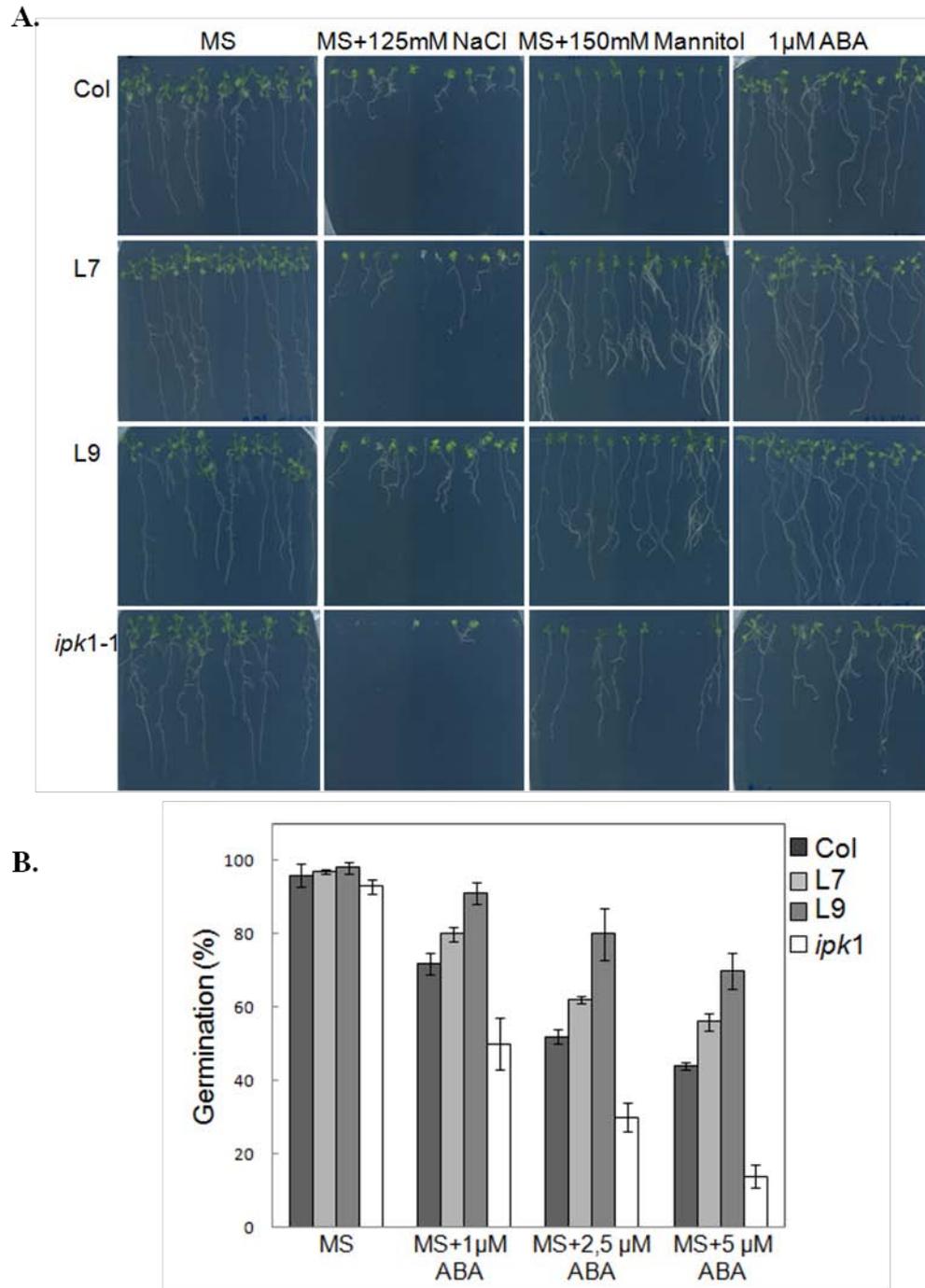


Figure 23 : Réponse des lignées transgéniques (L7 et L9) aux stress abiotiques.

A. Phénotype des plantules sauvages (Col), transgéniques (L7 et L9) et mutantes *ipk1-1* cultivées en conditions standard (milieu MS) ou de stress (MS +125mM NaCl ; MS+ 150mM Mannitol et MS+ 1µM ABA).

B. Pourcentage de germination des plantules sauvages, transgéniques et mutantes en présence de différentes concentrations d'ABA (1, 2.5, 5µM).

Les graines des différentes lignées sont semées sur milieu MS contenant ou non l'ABA. Après une semaine le taux de germination est calculé en fonction du nombre de graines germées par rapport aux nombres total de graines par lignées.

Les résultats présentés correspondent aux moyennes de 2 expériences indépendantes, chacune comprend 3 répliques.

Un résultat similaire a été observé lorsque les mêmes types de stress sont appliqués sur de jeunes plantules préalablement cultivées sur MS pour 7 jours. En effet, on a constaté qu'au bout de 2 semaines, les lignées transgéniques (L7 et L9) présentent un système racinaire bien développé avec une longueur racinaire qui dépasse celle des plantes sauvages de 28% et 16% en présence de mannitol (300 mM) et d'ABA (1 μ M) respectivement. En présence de NaCl (150 mM) le développement des racines paraît moins spectaculaire et la longueur de la racine principale n'est que légèrement supérieure à celle des plantes sauvages (**Figure 24- A, B & C**).

En plus ces sur-expresses gardent des taux de chlorophylles nettement plus élevés que les plantes WT en condition de stress (300mM mannitol) (**Figure 24-D**). Quant au mutant *ipk1-1*, l'application du stress (NaCl, Mannitol et ABA) réduit la longueur de la racine primaire (**Figure 24- C**) et la teneur en chlorophylle (**Figure 24-D**) par comparaison avec les plantes sauvages.

Ces résultats indiquent que les sur-expresses de PHY ont une meilleure capacité à tolérer le stress osmotique et le traitement par l'ABA que les plantes WT. Alors que le mutant *ipk1-1* montre une sensibilité envers les stress appliqués (osmotique et salin) conformément aux résultats rapportés par Kim et Tai (2011) où non seulement le mutant *ipk1-1* mais aussi d'autres mutants de biosynthèse d'AP montrent une sensibilité élevée à divers stress abiotiques.

En conséquence, on peut déduire de ces données que l'amélioration de la tolérance aux stress salin et osmotique ne peut être simplement dû à une baisse de la teneur intracellulaire en AP. Il est ainsi plausible que chez les lignées L7 et L9, les IPP générés suite à l'hydrolyse de l'AP par la phytase PHY-US417 soient impliqués dans l'amélioration de la tolérance aux stress abiotiques.

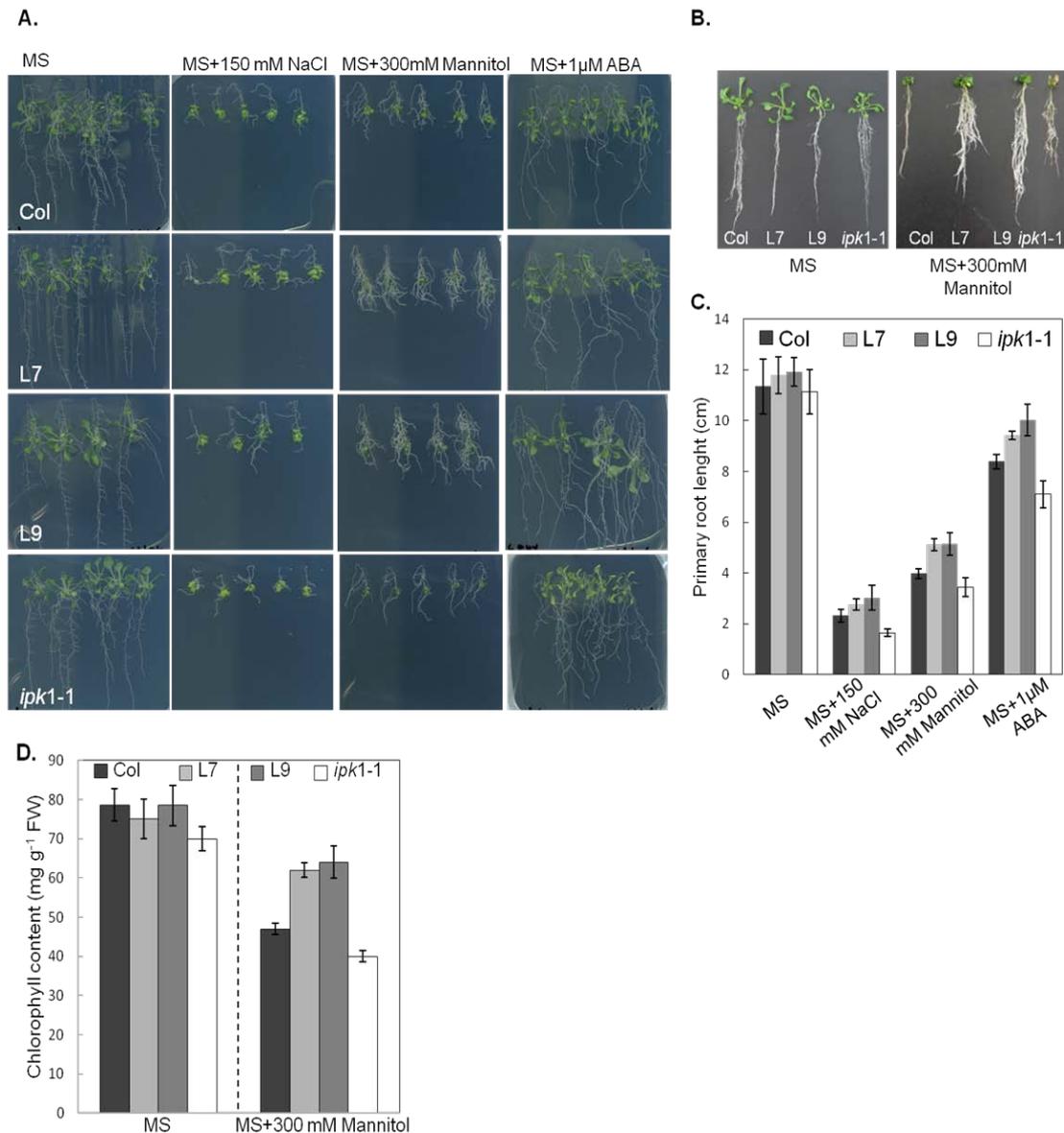


Figure 24: Effet du stress abiotique sur la croissance des plantules WT, L7, L9 et *ipk1-1*. (A) phénotype des plantules âgées d'une semaine, transférées du milieu MS vers un milieu contenant du NaCl (150 mM), le mannitol (300 mM) ou l'ABA (1 μM) pendant 2 semaines supplémentaires. (B) Photo représentative des plantules Col, L7, L9 et *ipk1-1*, prise 15 jours après le transfert sur milieu MS contenant ou non 300 mM de mannitol. (C) Mesure de la longueur des racines principales de tous les génotypes testés qui ont été cultivés en conditions standard pendant 1 semaine, puis transférés en conditions stressées pendant 2 semaines, comme indiqué dans (A). (D) les teneurs en chlorophylle enregistrées chez les plantules (WT, L7, L9 et *ipk1-1*) soumises ou non au stress osmotique. Les résultats présentés correspondent aux moyennes de 3 expériences indépendantes, chacune comprenant 3 répliques.

II. Evaluation de la teneur en proline et en AsA chez les lignées transgéniques sur-exprimant PHY soumis à un stress osmotique :

Selon l'hypothèse évoquée plus haut, la diminution d'AP chez les lignées sur-exprimant *PHY-US417* pourrait être accompagnée par une variation dans le pool des IPP. En effet, ceux-ci

sont décrits comme étant des précurseurs de plusieurs osmolytes et antioxydants associés à la réponse des plantes aux stress (Munnik et Vermeer, 2010 ; Lorence et al., 2004). Pour cela, et afin de mieux comprendre le mécanisme permettant l'amélioration de la tolérance des lignées transgéniques aux stress osmotique, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à doser les niveaux d'accumulation de deux composés, la proline et l'acide ascorbique (AsA).

La proline est un osmolyte qui joue un rôle capital dans l'ajustement osmotique lorsque la plante est soumise à divers stress salins ou hydriques (Yoshida et al., 1997 ; Hayat et al., 2012), tandis que l'AsA est un important antioxydant non enzymatique capable d'éliminer les espèces réactives de l'oxygène (ROS) résultant d'un stress environnemental (sécheresse, salinité, froid..).

Dans ce chapitre on s'est limité à mener ces dosages sur des plantes soumises à un stress osmotique (300 mM Mannitol), où les lignées transgéniques montrent le meilleur niveau de tolérance. Ainsi de jeunes plantules WT, transgéniques et mutantes *ipk1-1* âgées d'une semaine sont transférées sur milieux MS standard ou contenant 300 mM mannitol. Deux semaines après, on procède à la détermination des teneurs intracellulaires en proline et en AsA. Les résultats montrent que le contenu en proline est semblable entre les différents génotypes testés que ce soit en condition standard ou de stress. Ceci indique que la tolérance observée chez les lignées transgéniques L7 et L9 fait intervenir un mécanisme qui ne dépend pas de l'accumulation de la proline (**Figure 25- A**).

En ce qui concerne le dosage d'AsA, les deux lignées transgéniques accumulent des teneurs nettement supérieures à celles enregistrées chez les plantes sauvages en condition standard (1,7- 2,3 x) et aussi en condition de stress (1,6-1,8 x) (**Figure 25- B**). Cependant aucune différence significative n'a été détectée entre le mutant *ipk1-1* et les plantes WT. Ce résultat suggère que l'AsA pourrait être impliqué dans l'amélioration de la tolérance des surexpressesurs PHY au stress osmotique. Cela nous amène à penser que la phytase PHY-US417 pourrait améliorer la tolérance au stress osmotique en interférant avec la synthèse de l'AsA. Un tel lien a été évoqué par Zhang et al., (2008) qui ont montré que la surexpression de la phytase AtPAP15 entraîne une meilleure tolérance d'*Arabidopsis* au stress salin et osmotique et que cette amélioration est due à une baisse d'AP concomitante à une augmentation des teneurs foliaires en AsA.

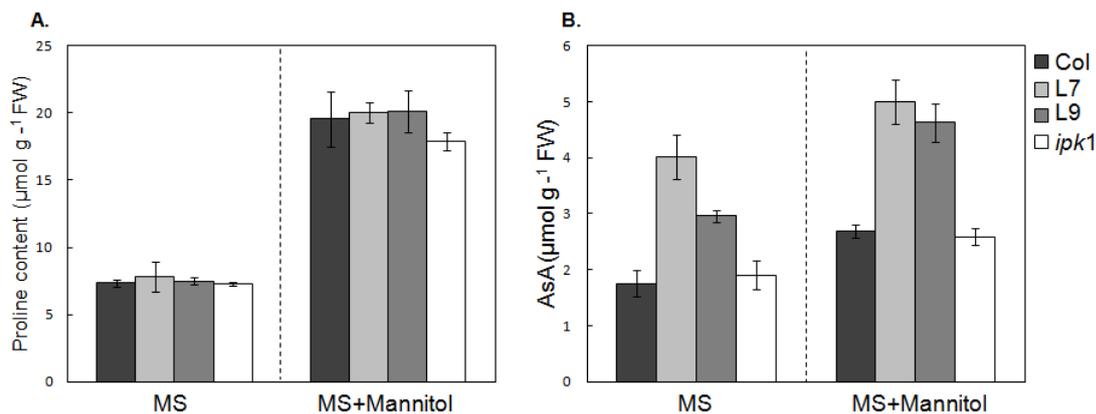


Figure 25: Les teneurs en proline et en AsA chez les plantes sauvages (Col), transgéniques (L7 et L9) et mutantes (*ipk1-1*) soumises ou non au stress osmotique. Les graines des différentes plantes sont semées sur milieu MS standard pendant 1 semaine et ont été ensuite transférées sur milieu MS contenant 300 mM mannitol pendant 15 jours. Les valeurs obtenues sont des moyennes de 3 essais indépendants.

Dans le règne animal il existe une seule voie de synthèse d'AsA, par contre chez les végétaux on peut en compter quatre (Wheeler *et al.*, 1998; Agius *et al.*, 2003; Wolucka et Van Montagu, 2003 ; Lorence *et al.*, 2004). La principale voie est connue sous le nom de la voie de Smirnoff-Wheeler dans laquelle l'AsA est issu du mannose-1-phosphate (Wheeler *et al.*, 1998). Parmi les trois voies alternatives opérant chez les plantes, il en existe une qui implique l'acide D-glucuronique. Cet intermédiaire est généré par une *myo*-inositol oxygénase (MIOX) à partir du *myo*-inositol (Lorence *et al.*, 2004 ; Lisko *et al.*, 2013). En fait il a été rapporté que l'expression constitutive de *MIOX4* chez les plantes d'*Arabidopsis* conduit à l'amélioration de l'accumulation foliaire d'AsA de 2 à 3 fois plus par rapport aux plantes sauvages. Le *myo*-inositol pourrait servir alors de précurseur de l'AsA (Lorence *et al.*, 2004). Il n'est donc pas exclu que, comme c'est le cas des lignées surexprimant *AtPAP15*, l'accumulation d'AsA chez les lignées L7 et L9 pourrait être due à l'augmentation du contenu en *myo*-inositol.

Or le produit final de l'hydrolyse d'AP (InsP₆) par la phytase PHY-US417 n'est pas le *myo*-inositol mais l'InsP₃ (Ins(1,3,5)P₃ ou Ins(2,4,6)P₃). Ces derniers peuvent toutefois subir des déphosphorylations pour générer le *myo*-inositol vue l'existence d'une diversité d'inositol phosphatases dans les cellules végétales, enzymes ayant comme substrats les IPP (Berdy *et al.*, 2001).

D'autre part, plusieurs études suggèrent l'existence d'une corrélation entre le contenu en *myo*-inositol et la réponse à l'ABA lors de la germination des graines. En fait la sensibilité à l'ABA est associée à la réduction du contenu de *myo*-inositol (Panzeri *et al.*, 2011). Dans notre cas,

étant donné que les lignées L7 et L9 sont moins sensibles à l'ABA que les plantes sauvages (**Figure 23 -A&B**), on pourrait s'attendre à une accumulation plus importante de *myo*-inositol. Une telle hypothèse ne peut être confirmée qu'après dosage de cet élément chez les lignées surexprimant *PHY-US417*.

III. Évaluation de l'accumulation des ROS en conditions de stress osmotique

Plusieurs études ont mis en évidence que les stress abiotiques et biotiques induisent la production des ROS générant alors un stress oxydant (Mittler *et al.*, 2006). Ces molécules très réactives entraînent la dégradation des composés cellulaires comme la peroxydation des lipides. La tolérance des plantes aux stress fait appel à divers systèmes antioxydants pour éliminer ces ROS. Nous avons constaté que les lignées transgéniques L7 et L9 ont la capacité d'accumuler des taux plus importants d'AsA. Sachant son rôle en tant qu'antioxydant, on s'est en toute logique interrogé si ces lignées transgéniques accumulent moins de ROS. Pour cela, deux tests histochimiques ont été réalisés sur des tissus foliaires afin de détecter deux types de ROS, le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le premier est détecté par le NBT (donnant une couleur bleue) et le second par le DAB (donnant une couleur brune). Des feuilles de plantules WT, transgéniques et mutantes soumises ou non au stress osmotique (mannitol) ont été employées dans ces tests. En absence de stress, de faibles colorations bleues (NBT) et brunes (DAB) ont été détectées sur les feuilles de tous les génotypes testés. Après l'application du stress osmotique, une coloration intense (avec les 2 tests) a été observée chez les plantes sauvages et le mutant *ipk1-1* indiquant l'augmentation de la quantité de ces ROS. En revanche, la coloration chez les transgéniques paraît légèrement supérieure à celle détectée chez les plantules non stressées. Ce résultat illustre bien que suite à un stress osmotique, les lignées surexprimant la phytase *PHY-US417* accumulent moins de ROS dans leurs feuilles.

En accord avec les tests de coloration histochimique, le dosage de la teneur en H_2O_2 indique que les lignées transgéniques (L7 et L9) avaient des niveaux de H_2O_2 significativement réduits par rapport à ceux des plantes WT et du mutant *ipk1-1*, surtout dans des conditions de stress osmotique (**Figure 26- C**).

De même, la teneur en malondialdéhyde (MDA), l'un des produits de la peroxydation des lipides membranaires, a été mesurée pour l'estimation des dommages causés par les ROS. En condition standard, la concentration en MDA chez les différentes plantes testées ne présentait pas de différences significatives. En condition de stress, les concentrations en MDA chez

toutes les plantes stressées ont augmenté, mais cette augmentation est moins prononcée chez les sur-expressseurs PHY en comparaison avec WT et le mutant *ipk1-1*.

On peut ainsi déduire que contrairement aux plantes sauvages et mutantes, les lignées transgéniques PHY ont la capacité de détoxifier les ROS et présentent de faibles niveaux de peroxydation lipidique.

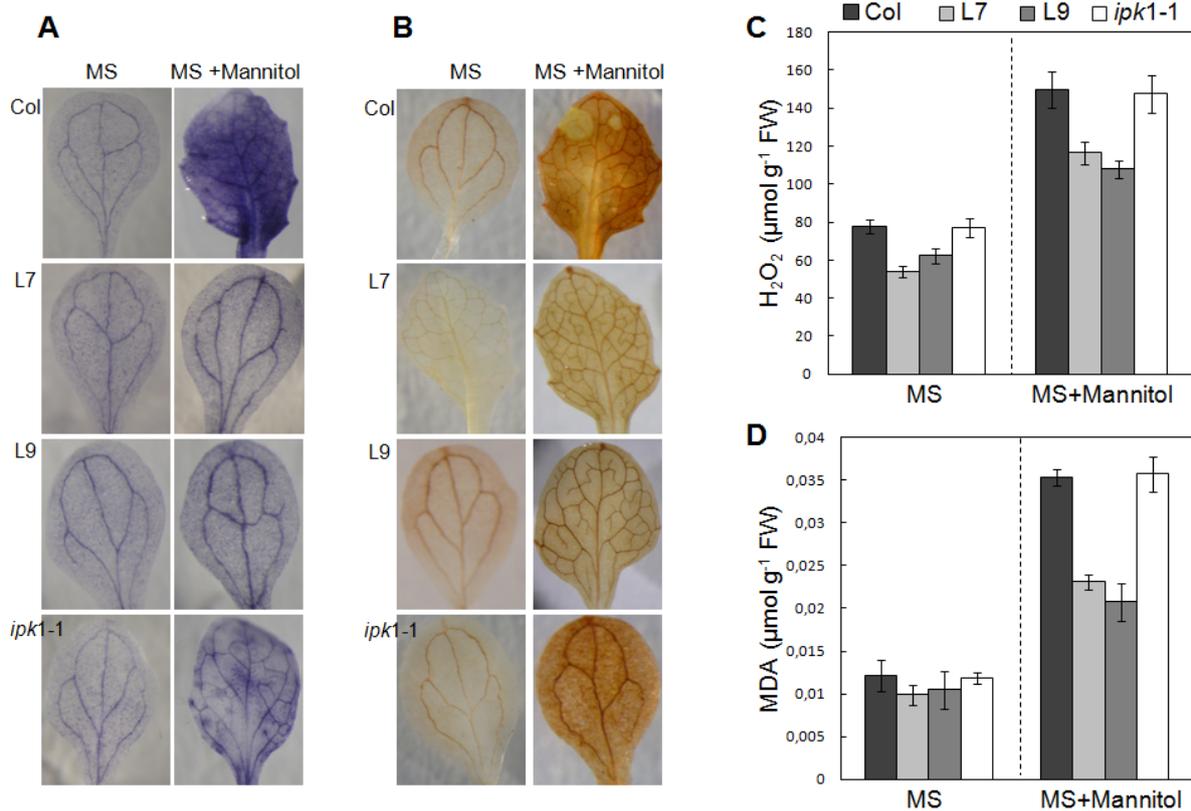


Figure 26: Observation de la production des ROS et de la teneur de H₂O₂ et MDA chez les plantules sauvages (Col), transgéniques (L7 et L9) et mutantes (*ipk1-1*) soumises ou non à un stress osmotique (300 mM mannitol). Les feuilles des différentes plantules sont marquées au NBT ou DAB pour révéler l'accumulation de O₂^{•-} (A) et H₂O₂ (B).

Détermination de la teneur en H₂O₂ (C) et MDA (D) chez tous les génotypes testés en réponse à un traitement au mannitol. Les plantules sont cultivées sur milieux MS standard pendant 7 jours et sont ensuite transférées soit vers un milieu MS standard, soit un milieu MS contenant 300 mM mannitol. Les résultats présentés correspondent aux moyennes de 3 expériences indépendantes.

IV. Etude de l'activité des enzymes antioxydantes chez les génotypes testés

Pour voir si la réduction des ROS observée chez les lignées transgéniques surexprimant PHY-US417, fait intervenir en plus de l'AsA des enzymes antioxydantes, nous avons déterminé les activités enzymatiques de la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la peroxydase (POD).

En absence de stress (MS), l'activité SOD, CAT et POD étaient similaires entre tous les génotypes testés. Toutefois, ces activités augmentent dans les conditions de stress (300 mM mannitol). L'augmentation de ces activités enzymatiques a été plus prononcée dans les lignées transgéniques que dans les plantes WT et le mutant *ipk1-1*. L'augmentation des activités SOD, CAT et POD chez les lignées transgéniques (L7 et L9) est respectivement de 38%, 53% et 65% comparativement à celles des plantes sauvages (Col) (**Figure 27**).

Ces résultats indiquent clairement que la tolérance au stress osmotique observée chez les sur-expresseurs PHY est liée à l'activation des systèmes antioxydants (enzymatiques et non enzymatiques), contribuant ainsi à limiter le niveau des ROS et à atténuer la peroxydation lipidique.

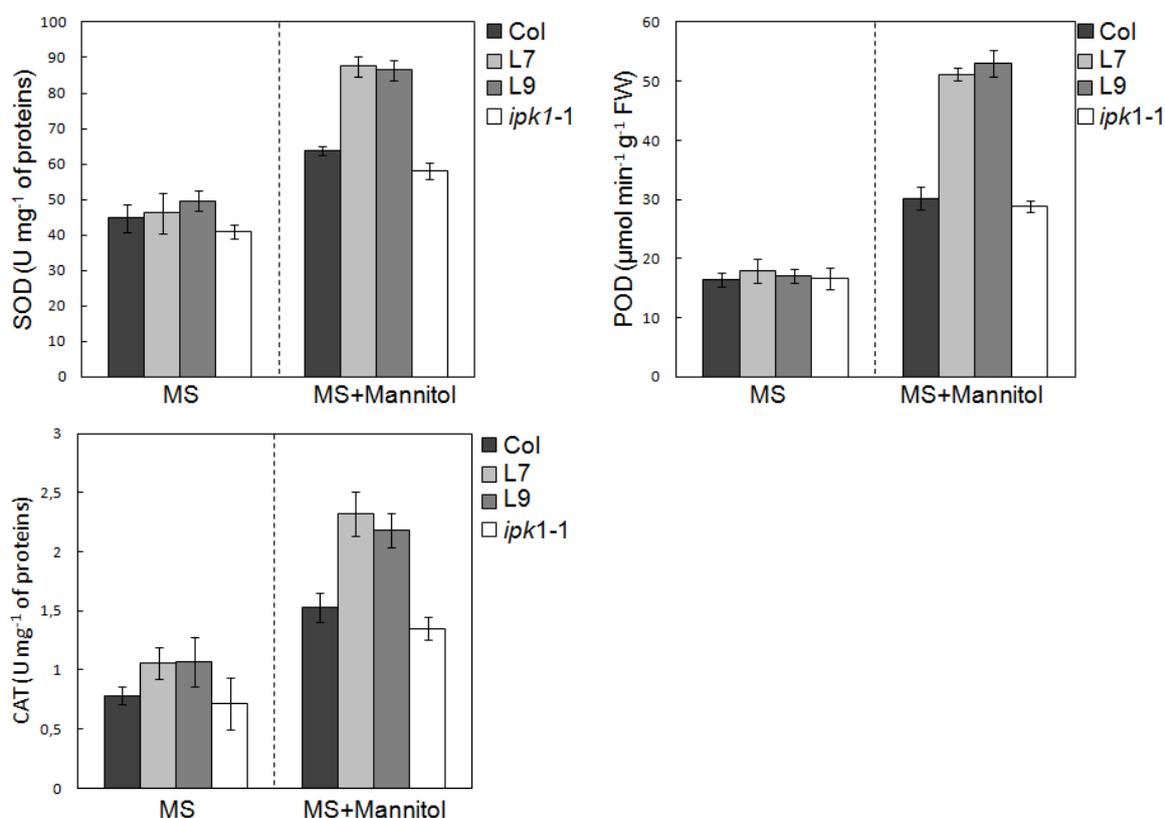


Figure 27 : Analyse de l'activité des enzymes antioxydantes SOD, CAT et POD chez les plantes sauvages (Col), transgéniques (L7 et L9) et mutantes (*ipk1-1*) soumises ou non à un stress osmotique (300 mM mannitol). Les plantules sont cultivées sur milieu MS standard pendant 7 jours et sont ensuite transférées soit vers un milieu MS standard, soit un milieu MS contenant 300 mM mannitol. Les résultats présentés correspondent aux moyennes de 3 expériences indépendantes.

Conclusion

L'ensemble des résultats de ce chapitre montre clairement que la surexpression de la phytase PHY-US417 chez *Arabidopsis* confère une meilleure tolérance aux stress et en particulier le stress osmotique, associée à une plus faible sensibilité à l'ABA. Ces lignées transgéniques montrent une meilleure performance par rapport aux plantes sauvages qui se traduit par un développement racinaire plus important et par le maintien de leur activité photosynthétique. En plus, elles ont une plus grande capacité à surmonter les effets néfastes du stress oxydatif en accumulant plus d'AsA et aussi suite à l'activation des enzymes antioxydantes.

Ce qui semble évident c'est que la réduction d'AP n'est pas la cause directe de la tolérance, puisque une réduction du taux d'AP chez le mutant *ipk1-1* (et autres mutants *lpa*) entraîne même un phénotype sensible aux différents stress abiotiques comme démontré par Kim et Tai (2011). Nous soutenons plutôt l'hypothèse selon laquelle les IPP et le *myo*-inositol générés suite à l'hydrolyse de l'AP par la phytase PHY-US417 seraient à l'origine de cette tolérance au stress osmotique.

Nos résultats sont conformes à ceux obtenus chez des lignées d'*Arabidopsis* surexprimant une phosphatase acide pourpre *AtPAP15* (Zhang et al., 2008). Ces lignées sont en effet plus tolérantes aux stress salin, et osmotique et semblent être aussi moins sensibles à l'ABA. Ce phénotype a été associé à une réduction dans la teneur en phytate, une augmentation du niveau de *myo*-inositol et d'AsA, ce qui supporte d'avantage notre hypothèse.

Chapitre IV :

**La sécrétion de la phytase PHY-US417 par les racines d'*Arabidopsis*
améliore la nutrition phosphatée et la croissance des plantes en co-culture**

La sécrétion de la phytase PHY-US417 par les racines d'*Arabidopsis* améliore la nutrition phosphatée et la croissance des plantes en co-culture

L'AP montre une adsorption à la phase solide du sol (sur les oxydes de fer, d'aluminium..) qui est même plus forte que celle de l'anion orthophosphate (Pi) (McKercher et Anderson, 1989 ; Celi et Barberis, 2005 et 2007 ; Gerke, 2010). L'acquisition du Pi par les racines des plantes nécessite alors la dissolution (désorption) des ions orthophosphates H_2PO_4^- et HPO_4^{2-} à partir de la phase solide du sol pour alimenter le pool du Pi de la solution du sol, présent généralement en faibles concentrations (0.1–10 μM ; Hinsinger, 2001).

La libération des ions phosphates à partir du phytate exige l'intervention de phosphatases spécifiques, les phytases. Ces enzymes ont été détectées et caractérisées chez les bactéries, les champignons, les levures (Lei et al., 2007) et également dans les exsudats racinaires de plusieurs plantes (Hayes et al., 2000; Li et al., 1997; Richardson et al., 2000). Cependant, il a été rapporté que leur activité enzymatique dans les exsudats des racines est insuffisante pour une utilisation efficace du phytate qui se trouve dans le milieu extérieur (Brinch-Pedersen et al., 2002; Richardson et al., 2000). D'où le recours en agriculture aux engrais phosphatés pour remédier au manque de P dans le sol. Cependant, la majeure partie des engrais phosphatés va être fixée en fraction organique (Po) non utilisable par les racines des plantes directement et où le phytate représente la forme prédominante. Cette forme augmente chaque année dans le sol et par conséquent l'hydrolyse du phytate par des phytases pour libérer le Pi paraît une alternative à l'utilisation des fertilisants phosphatés qui sont non seulement coûteux mais peu écologiques.

Notre objectif dans cette partie est de rendre des plantes d'*Arabidopsis* aptes à acquérir le P à partir de phytate présent dans le milieu extérieur en produisant des plantes sécrétrices de la phytase PHY-US417.

I. Production de plantes transgéniques d'*Arabidopsis* sur-exprimant la forme secrétée

Ext-PHY-US417 (e-PHY)

Le cadre de lecture du gène *PHY-US417* a été clonée en phase avec la séquence codante d'un peptide signal de l'extensine d'*Arabidopsis Ext3* dans le vecteur binaire pCAMBIA1302 sous le contrôle du promoteur constitutif 35S du CaMV et du terminateur Nos polyA. En outre, pCAMBIA1302 contient le gène de résistance à l'hygromycine (*HPTII*) qui sert de marqueur

de sélection des plantes transgéniques. L'analyse de la séquence de la construction obtenue confirme la fusion traductionnelle entre le peptide Ext3 et PHY-US417 (**Figure 28**).

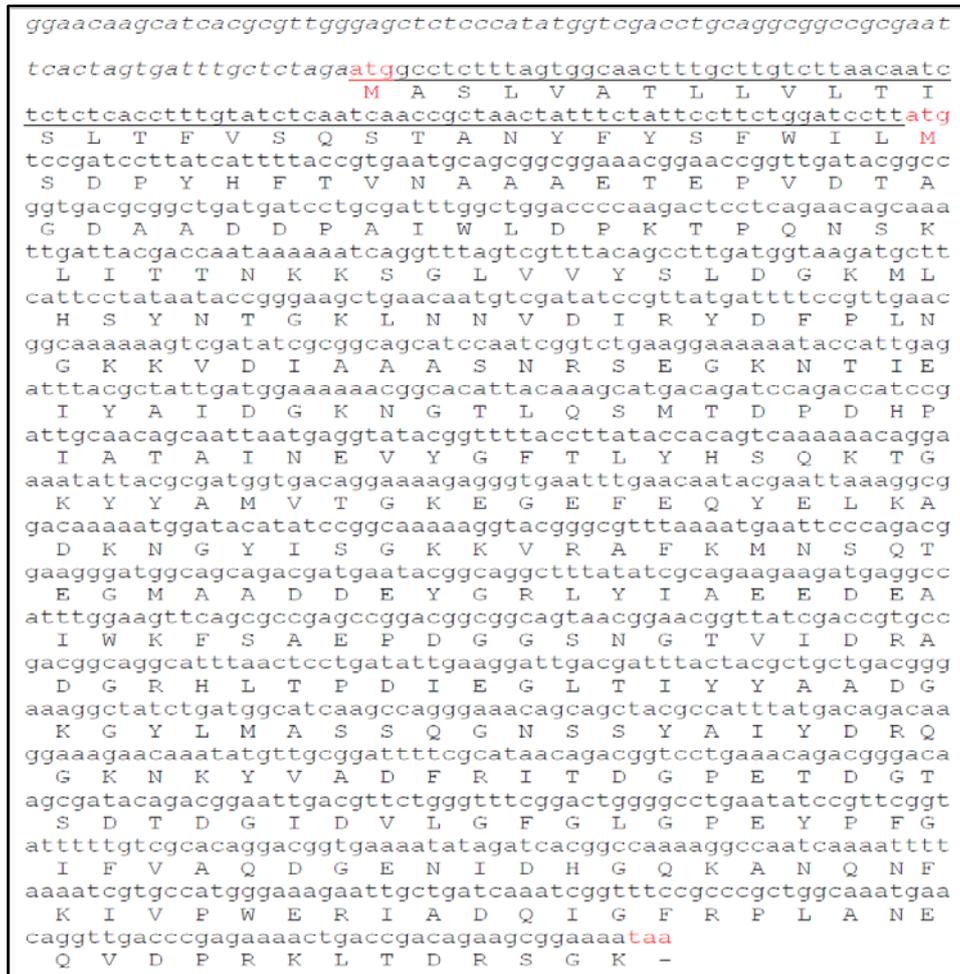


Figure 28: Séquences nucléotidique et protéique de la fusion Ext3-PHY-US417 (e-PHY). La séquence nucléotidique correspondant au peptide signal (Ext3) est soulignée. La séquence du vecteur précédant l'ATG de l'Ext3 est présentée en italique.

La construction pC1302-Ext3-PHYUS417 a ensuite été introduite dans la souche GV3101 d'*Agrobacterium tumefaciens*. La souche recombinante ainsi obtenue a servi pour effectuer des expériences de transformation. La sélection des transformants d'*Arabidopsis* a été effectuée sur un milieu de culture contenant l'hygromycine à une concentration de 15 µg/ ml jusqu'à la génération T3 où des lignées homozygotes pour le transgène ont été obtenues (d'après la ségrégation génétique du marqueur *HPT* gène de résistance à l'hygromycine). Parmi celles-ci, 3 lignées ont été sélectionnées pour mener des études moléculaires. Deux amplifications par PCR ont été réalisées sur l'ADN génomique de ces clones moyennant le

couple d'amorces HPT-Rv et HPT-Fw pour le gène *HPT* et les amorces Ext3-Fw/Phy-Rv spécifique de la fusion Ext3-*PHY-US417*. Dans les deux cas, des produits spécifiques et de tailles attendues ont été amplifiés chez toutes ces lignées indiquant qu'il s'agit de plantes transgéniques ayant intégré le T-DNA portant le cDNA de la fusion *Ext3-PHY-US417* (Figure 29-B & C).

En outre, on a étudié le niveau d'expression du gène *PHY-US417* fusionné au peptide signal *Ext3* par RT-PCR semi-quantitative. Les produits d'amplification par RT-PCR spécifiques pour *HPT* montrent des niveaux d'expression comparables dans les trois lignées indiquant la stabilité du T-DNA intégré dans les génomes de ces lignées. Le niveau d'expression du gène *PHY-US417* fusionné au peptide signal semble présenter des niveaux d'expression variables (Figure 29- D).

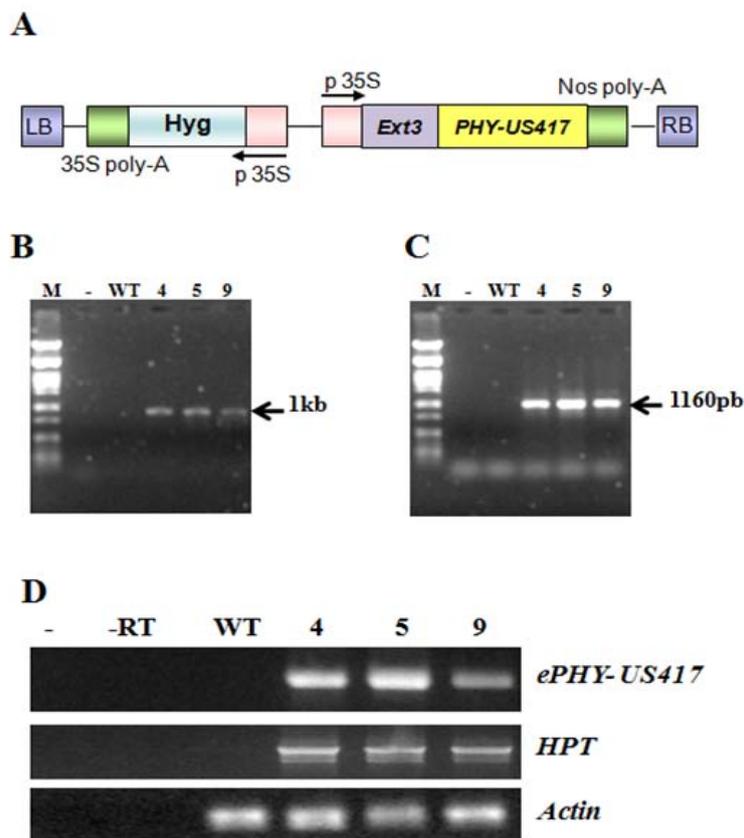


Figure 29: Production de plantes transgéniques sur-exprimant la forme extracellulaire du gène *PHY-US417*. **A** : Carte physique de la construction pC1302-*Ext-PHY-US417*. Détection par PCR des gènes *HPT* (**B**) et *PHY US417* (**C**) chez les plantes transgéniques. **M**: marqueur de taille λ PstI; -: H₂O; **WT**: ADN du sauvage. **4, 5 et 9** : ADN des différentes lignées transgéniques. (**D**) Analyse de l'expression de *Ext3-PHY-US417* par RT-PCR. -: contrôle négatif (H₂O); -**RT**: sans reverse transcriptase; **WT**: produit d'amplification par RT-PCR à partir de plantes sauvages. **4, 5 et 9** : produits d'amplification par RT-PCR à partir des lignées intégrant le la forme secrétée e-*PHYUS417* (e4, e5 et e9).

II. Détection et dosage de l'activité phytasique chez les plantes transgéniques ePHY :

Afin d'évaluer l'activité phytasique au niveau des racines des lignées transgéniques (e4, e5, e9), deux essais distincts ont été effectués. Dans le premier essai, les plantes ont été germées sur milieu MS sans P contenant l'AP comme source unique de P (MS-P + AP), puis les boîtes ont été immergées dans une solution contenant du FeCl_3 comme décrit par Latta et Eskin (1980). Une coloration rose peut être détectée au niveau des racines des lignées transgéniques, mais absente chez les plantes témoins (Col), ce qui est synonyme de la présence du Pi dans le milieu de culture suite à l'hydrolyse d'AP comme montré dans la figure 30.

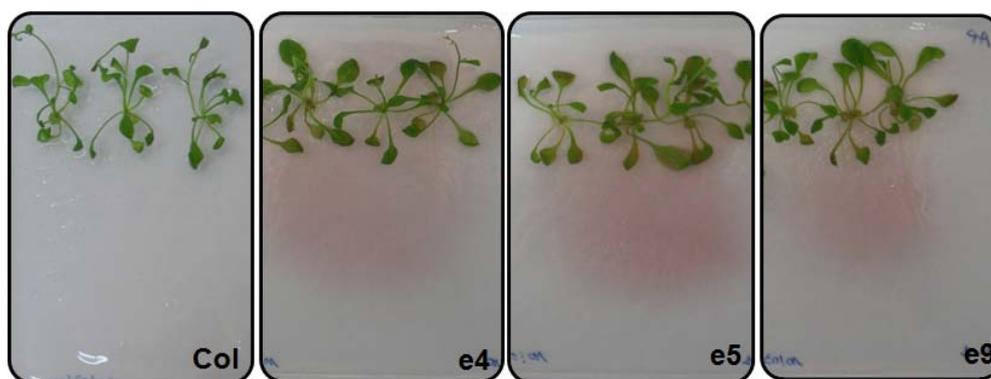


Figure 30: Détection de l'activité phytasique secrétée par les racines des lignées transgéniques d'*Arabidopsis* ePHY par le test de coloration avec le FeCl_3 . **Col** : plantes sauvages (écotype Columbia). **e4, e5 et e9** : lignées transgéniques intégrant la construction pc1302-Ext3-PHY-US417. Ces plantes ont été cultivées sur milieu MS solide dépourvu en P et contenant l'AP comme seule source de P pendant 3 semaines. La coloration rose autour des racines indique l'absence d'AP dans le milieu.

Le deuxième essai consiste à mesurer l'activité phytasique secrétée par les racines des lignées transgéniques dans le milieu extérieur. Pour cela de jeunes plantules (Col, e4, e5 et e9) âgées de 10 jours sont transférées dans un milieu liquide contenant l'AP comme seule source de P. Deux jours après le transfert le milieu de culture est récupéré, puis utilisé pour effectuer directement le dosage des protéines (Bradford) et l'activité phytasique par la méthode du Bleu de Molybdate.

Les résultats obtenus ont montré que contrairement aux plantes WT, des niveaux élevés d'activités phytasiques (allant de 27 à 39 $\text{mU}\mu\text{g}^{-1}$ de protéines secrétées) ont été enregistrés dans les exsudats racinaires des lignées transgéniques (e4, e5 et e9) (**Tableau 4**). Ces données confirment que la phytase PHY-US417 sécrétée par les racines des lignées transgéniques est active et capable de libérer le Pi à partir de l'AP ajouté dans le milieu de culture.

Tableau 4 : L'activité phytasique secrétée et le contenu en Pi libéré au niveau des exsudats racinaires des plantes sauvages et des lignées transgéniques. L'activité phytase a été déterminée entre le jour 10 et le jour 12 de croissance en milieu liquide. Les résultats sont présentés correspondent à la moyenne de trois répétitions indépendantes. Pour chaque paramètre, les valeurs marquées par des lettres différentes (a et b) sont significativement différentes ($P < 0,05$) (comparaisons multiples des moyennes (Test de Tukey)).

	Secreted phytase activity mU μg^{-1} secreted protein	Pi (μM)
Col	0,1 \pm 0,01 ^a	34,25 \pm 1,06 ^a
e4	34 \pm 6 ^b	166 \pm 2,82 ^b
e5	39,6 \pm 4,2 ^b	166,5 \pm 2 ^b
e9	27,4 \pm 3,1 ^b	120 \pm 1,41 ^b

III. Effet de la surexpression de ePHY-US417 sur la réponse des plantes d'*Arabidopsis* à la carence phosphatée

Nous avons ensuite été intéressés de voir l'effet de la surexpression de la forme secrétée ePHY-US417 sur la croissance des plantes transgéniques en conditions limitantes en P.

Pour cela, les plantes sauvages et transgéniques ont été cultivées sur un milieu MS standard (1mM Pi), un milieu MS sans phosphate ou additionné de 0,33 mM d'AP (l'équivalent de 1mM Pi). Après 2 semaines de culture, les plantes contrôles WT (Col) cultivées sur MS-P+AP manifestent une croissance significativement réduite par rapport à celles cultivées sur MS standard. En revanche, la croissance des lignées transgéniques (e4, e5 et e9) n'était que légèrement affectée lorsque l'AP a été fournie à la place du Pi (**Figure 31- A**). Dans les mêmes conditions MS-P+AP, ces trois lignées transgéniques montrent des racines plus longues (> 2 fois) et une biomasse plus importante (> 2 fois), par rapport aux plantes contrôles (Col) (**Figure 31- B, C**). Également, ces lignées transgéniques testées accumulent dans leurs tiges des niveaux internes de Pi nettement meilleurs à ceux des plantes WT (Col). D'une manière intéressante, cette accumulation du Pi atteint des niveaux comparables à ceux qui sont enregistrés en conditions standards (milieu MS) (**Figure 31- D**), ce qui indique qu'elles sont capables d'obtenir facilement le Pi à partir de l'AP. Il est à noter qu'il n'y a pas de différence significative entre la croissance des lignées transgéniques et celle des plantes sauvages que ce soit en conditions d'absence (MS-P) ou de présence (MS) de P. Ces résultats indiquent que la sécrétion de la phytase PHY-US417 permet de maintenir la croissance et la

nutrition phosphatée des lignées transgéniques sur un milieu contenant l'AP comme seule source de P.

Des résultats similaires ont déjà été obtenus, avec des plantes transgéniques d'*Arabidopsis* et de tabac qui en sécrétant des phytases de *Bacillus* ou d'*Aspergillus* présentent une meilleure croissance en conditions limitantes en P (Lung *et al.*, 2005; Richardson *et al.*, 2001).

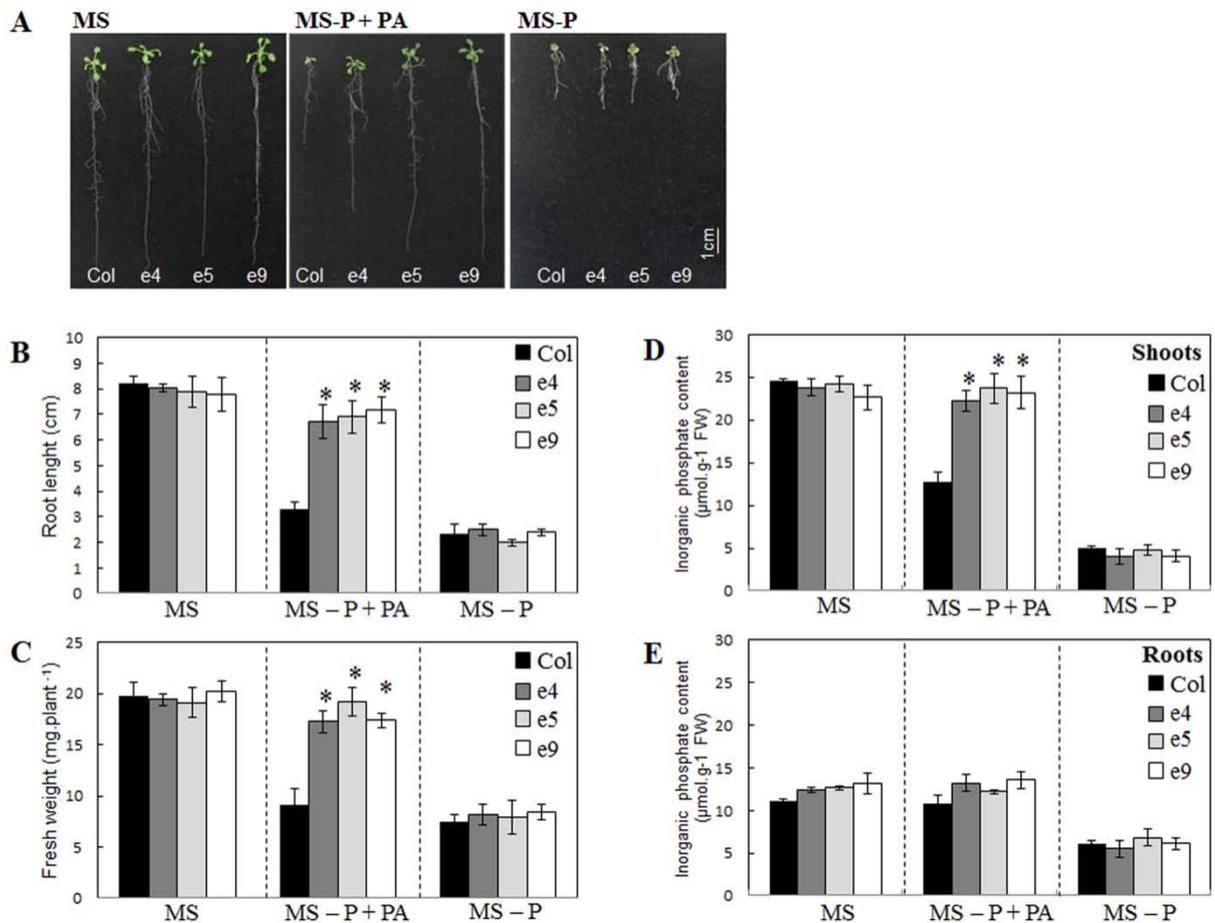


Figure 31: Les lignées transgéniques ePHY (e4, e5, e9) maintiennent leur croissance sur un milieu contenant l'AP comme seule source de P.

(A) Photos représentatives prises deux semaines après la culture des plantes sauvages et transgéniques sur milieu MS, MS sans P (MS-P), ou additionné de 0,33 mM AP (MS-P+AP). (B), (C), (D) et (E) Longueurs des racines, poids frais des plantules et contenu foliaire et racinaire en Pi. Toutes ces mesures ont été effectuées sur des plantules WT et transgéniques cultivées dans des conditions de culture indiquées en (A) pendant 2 semaines. Les valeurs obtenues sont des moyennes de 3 essais indépendants (avec n=6). (*) indique une différence statistiquement significative ($P < 0,05$) avec les plantes contrôles (Col).

IV. Effet de la sécrétion de la phytase PHY-US417 sur la croissance des plantes co-cultivées avec plantes transgéniques d'*Arabidopsis* en condition de carence phosphatée

La sécrétion racinaire de la phytase PHY-US417 améliore la capacité des plantes transgéniques d'acquérir le Pi à partir du phytate présent dans le milieu extérieur conformément aux résultats antérieurs. Ces travaux se sont focalisés sur l'étude de l'effet des phytases secrétées sur l'amélioration de la nutrition phosphatée et de la croissance des plantes qui les sur-expriment. Ici on s'est intéressé à voir si la phytase secrétée ePHY-US417 peut promouvoir la croissance non seulement des lignées transgéniques mais aussi d'autres plantes cultivées dans leur voisinage dans des conditions limitantes en P.

Pour cela, nous avons initié une série de tests de co-culture entre les lignées transgéniques e4, e5 et e9 et les plantes sauvages en milieu liquide contenant l'AP comme seule source de P.

IV.1. Tests de co-culture entre les lignées transgéniques et des plantes sauvages d'*Arabidopsis* :

Les plantes WT et les transgéniques ont été mises à germer sur milieu MS solide sans phosphate (MS-P), après une semaine ces jeunes plantules ont été transférées ensemble sur un support en plastique placé dans des Boites Magenta contenant 50 mL du milieu de culture liquide. Dans un milieu MS-P+AP, nous avons constaté que les plantes sauvages cultivées à côté des lignées transgéniques ePHY croissent beaucoup mieux (avec une augmentation du poids frais des feuilles et des racines de ~ 75%) que celles co-cultivées avec les lignées intégrant le vecteur vide (ev ; utilisées comme témoin) (**Figure 32- A & B**), et accumulent au bout de 2 semaines des niveaux foliaires en Pi très proches des niveaux enregistrés chez les lignées transgéniques (e4 et e5) (**Figure 33**).

Nous avons aussi noté que l'absorption du Pi chez les plantes sauvages cultivées à côté des lignées transgéniques ePHY augmente de $19 \pm 2\%$, $31 \pm 1\%$ et $51 \pm 2\%$ par rapport à celles co-cultivées avec les plantes témoins ev, respectivement après 3, 7 et 15 jours de transfert sur MS-P + AP (**Figure 33**).

Aucune différence n'a été relevée ni au niveau de la croissance ni au niveau de la teneur en Pi en comparant les plantes sauvages (Col) cultivées à côté des lignées transgéniques et celles co-cultivées avec les lignées intégrant le vecteur (ev) et ce en milieux pauvre (MS-P) ou enrichi en Pi (MS standard). Ces résultats suggèrent fortement que l'amélioration de la croissance révélée chez les *Arabidopsis* co-cultivées est étroitement liée à l'activité de la

phytase sécrétée par les racines des lignes ePHY, et qui en hydrolysant l'AP, libère le Pi et augmente donc sa concentration dans le milieu.

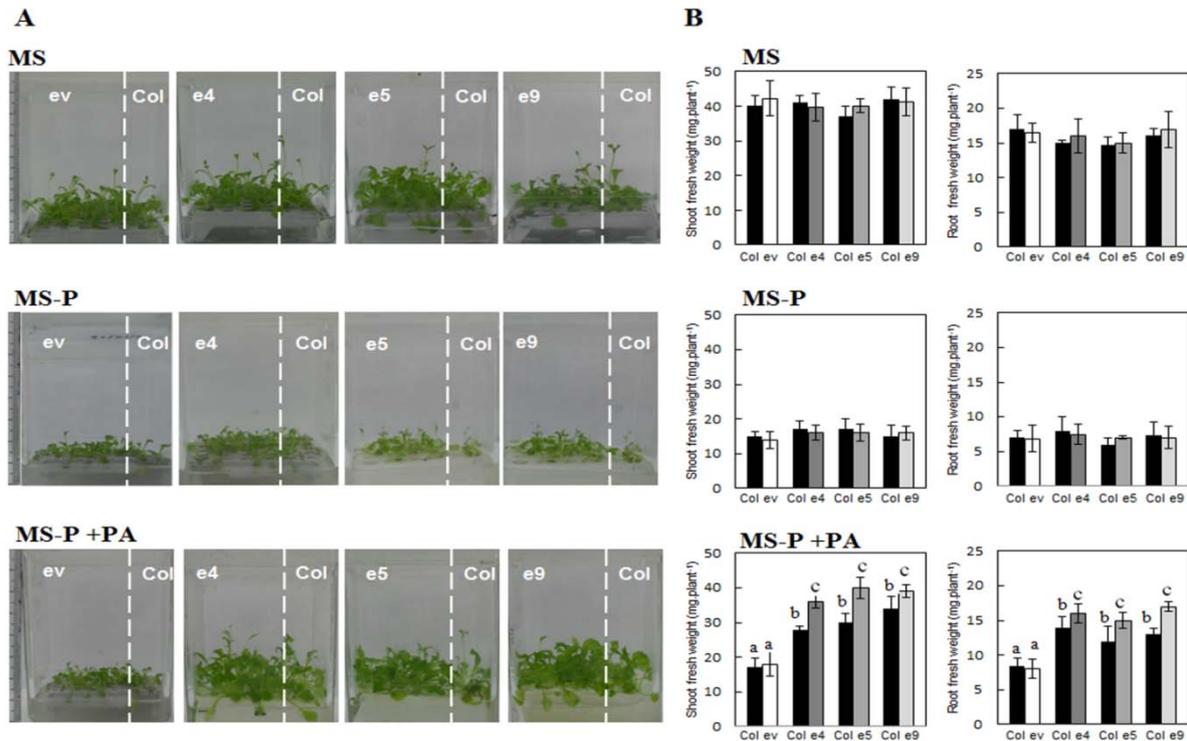


Figure 32: L'amélioration de la croissance observée chez les plantes WT co-cultivées avec les transgéniques en milieu MS liquide contenant l'AP comme source de P. Des plantes WT, transgéniques intégrant le vecteur vide (ev) ou la forme secrétée de la phytase ePHY ont été mises à germer sur un milieu MS-P pendant une semaine puis transférées en milieu MS liquide (1 mM de Pi), sans P (MS-P) ou contenant 0,33 mM d'acide phytique (MS-P+AP) pour 2 semaines supplémentaires de culture. Les plantules WT ont été co-cultivées avec les plantules ev ou les transgéniques (Col:ev ou Col:ePHY) avec un rapport de 1:4. (A), (B) Développement et poids frais des feuilles et des racines des plantules (Col, ev, e4, e5, e9) transférées dans les différentes conditions de cultures. Les valeurs sont des moyennes de 3 répétitions. Les valeurs marquées par des lettres différentes (a, b et c) sont significativement différentes ($P < 0,05$) (comparaisons multiples des moyennes (Test de Tukey)).

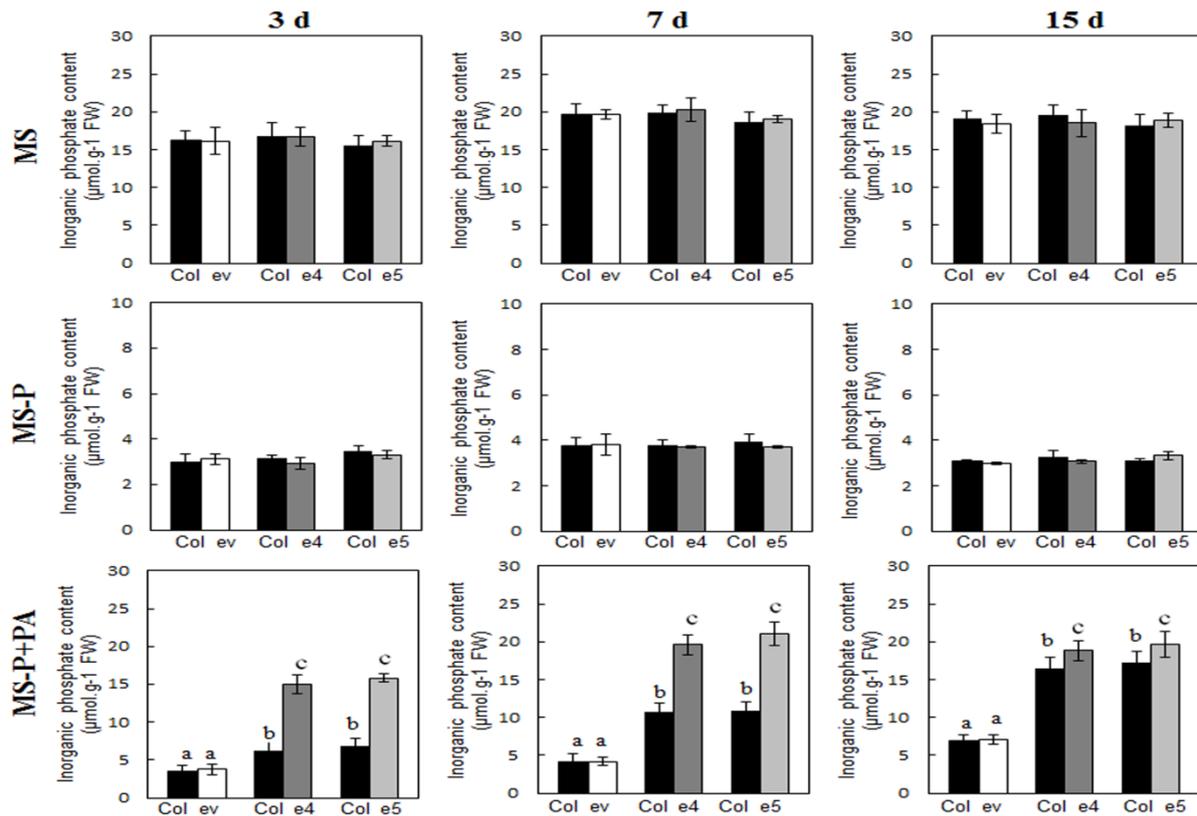


Figure 33: Amélioration de la concentration du Pi au niveau des feuilles des plantes WT(Col) lorsqu'elles sont cultivées avec des lignées transgéniques ePHY (e4 et e5) dans un milieu contenant le phytate comme seule source de P. Des plantules WT âgées d'une semaine ont été transférées dans des milieux liquides (MS, MS-P ou MS-P+0,33mM AP) à coté des plantules ev ou ePHY (e4 ou e5) comme indiqué dans la **Figure 32**. Les plantules ont été cultivées 3, 7 et 15 jours après transfert pour mesurer et suivre l'accumulation du Pi dans les feuilles. Les valeurs obtenues sont des moyennes de 3 essais indépendants. Les valeurs marquées par des lettres différentes (a, b et c) sont significativement différentes ($P < 0,05$) (comparaisons multiples des moyennes (Test de Tukey)).

IV.2. Test de co-culture entre les lignées transgéniques d'*Arabidopsis* et des plantes sauvages de tabac

Afin d'étudier si la promotion de la croissance due à la sécrétion de la phytase pourrait être observée chez des plantes co-cultivées autres qu'*Arabidopsis*, des tests de co-culture similaires ont été réalisés où des plants de tabac sauvages ont été transférées à côté des lignées transgéniques e4, e5 ou e9 dans un milieu liquide sans P additionné ou non d'AP. En conditions déficientes en P (MS -P) la croissance des plantules de tabac co-cultivées avec les plantes sauvages (Col) ou des lignées transgéniques (e4, e5 et e9) était significativement affectée.

Avec l'ajout d'AP dans le milieu de culture, le tabac co-cultivé avec les plantes sauvages d'*Arabidopsis* a montré à nouveau une forte inhibition de la croissance avec des symptômes de chlorose. Ceci peut être lié à l'indisponibilité non seulement du Pi, mais aussi d'autres oligo-éléments (tels que Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} et Fe^{2+}) à cause de l'effet chélateur de l'AP.

En revanche, les plantules de tabac qui sont co-cultivées avec les lignées transgéniques e-PHY montrent des taux de croissance élevés (**Figure 34- A**) avec un poids frais foliaire (entre 1,6 et 2,2 fois) et racinaire (de 1,5 à 2 fois) plus important que les tabac co-cultivés avec les plantes WT (Col) (**Figure 34- B**).

Ces résultats indiquent clairement que la phytase sécrétée par les racines des lignées transgéniques permet d'améliorer la croissance des plantes voisines de tabac cultivés en présence d'AP en tant que seule source de Pi.

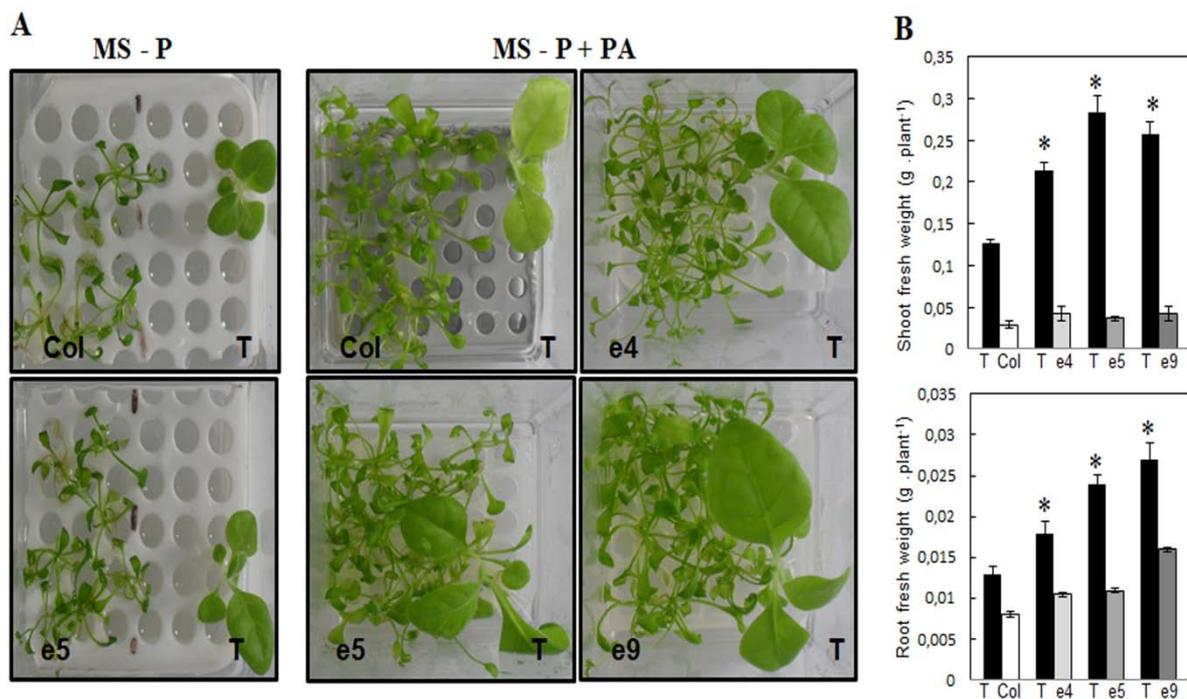


Figure 34: Amélioration de la croissance des plantes sauvages de tabac co-cultivées avec les sur-expresseurs ePHY (e4, e5, e9) en milieu MS liquide sans P supplémenté et avec du phytate comme seule source de P. Des plantules sauvages de Tabac (T) âgées de deux semaines ont été transférées dans des milieux liquides (MS-P ou MS-P+0,33 mM AP) à coté des plantules sauvages d'*Arabidopsis* (Col) ou transgéniques ePHY (e4, e5 ou e9) (T:Col ou T:ePHY) pour 2 semaines supplémentaires.

(A), (B) Phénotypes et poids frais des feuilles et des racines des plantules de Tabac, Col et e4, e5, e9 co-cultivées en hydroponie en absence de P ou en présence de phytate. Les valeurs sont des moyennes de 3 répétitions. (*) indique une différence statistiquement significative ($P < 0,05$) avec les plantes Tabac co-cultivées avec les *Arabidopsis* sauvages (Col).

V. Analyse du potentiel des lignées transgéniques ePHY à promouvoir l'accumulation foliaire du Pi et la croissance des plantes voisines

L'amélioration de la croissance observée chez les plantes co-cultivées avec les sur-expressseurs de ePHY (e4, e5, e9) en présence d'AP comme seule source de P pourrait être expliquée par l'augmentation de l'absorption du Pi qui devient plus disponible suite à l'hydrolyse d'AP par la phytase ePHY-US417 sécrétée dans le milieu. Pour confirmer cela, nous avons testé deux mutants de transport du Pi *pht1;1* et *pht1;1-1;4* caractérisés par une capacité d'absorption du Pi réduite (Shin et al., 2004). En conditions standards de culture, le contenu en Pi dans les parties aériennes des mutants simple (*pht1;1*) et double (*pht1;1-1;4*) est réduit respectivement de 31% et 68%, en comparaison avec les sauvages (Col) ou transgéniques (e4 et e5) (**Figure 35- B**).

En conditions de carence phosphatée (MS-P+AP) on a remarqué que les mutants manifestent une réduction plus prononcée du contenu foliaire en Pi et une croissance sévèrement limitée lorsqu'ils sont co-cultivés avec les plantes sauvages ou transgéniques (**Figure 35- A**).

Ces données confirment que les plantes d'*Arabidopsis* sont capables de croître en présence de d'AP en tant qu'unique source de P seulement quand elles bénéficient du Pi libéré par l'AP sous l'action de la phytase sécrétée ePHY-US417. Par conséquent, nous pouvons exclure une éventuelle contribution des autres composants intermédiaires produits au cours de l'hydrolyse d'AP (les inositols polyphosphates) dans la promotion de la croissance. Cette étude montre davantage le rôle crucial des transporteurs du Pi à haute affinité (PHT1;1 et PHT1;1-1;4) dans l'absorption du Pi libéré lors des tests de co-culture dans des conditions limitantes en Pi.

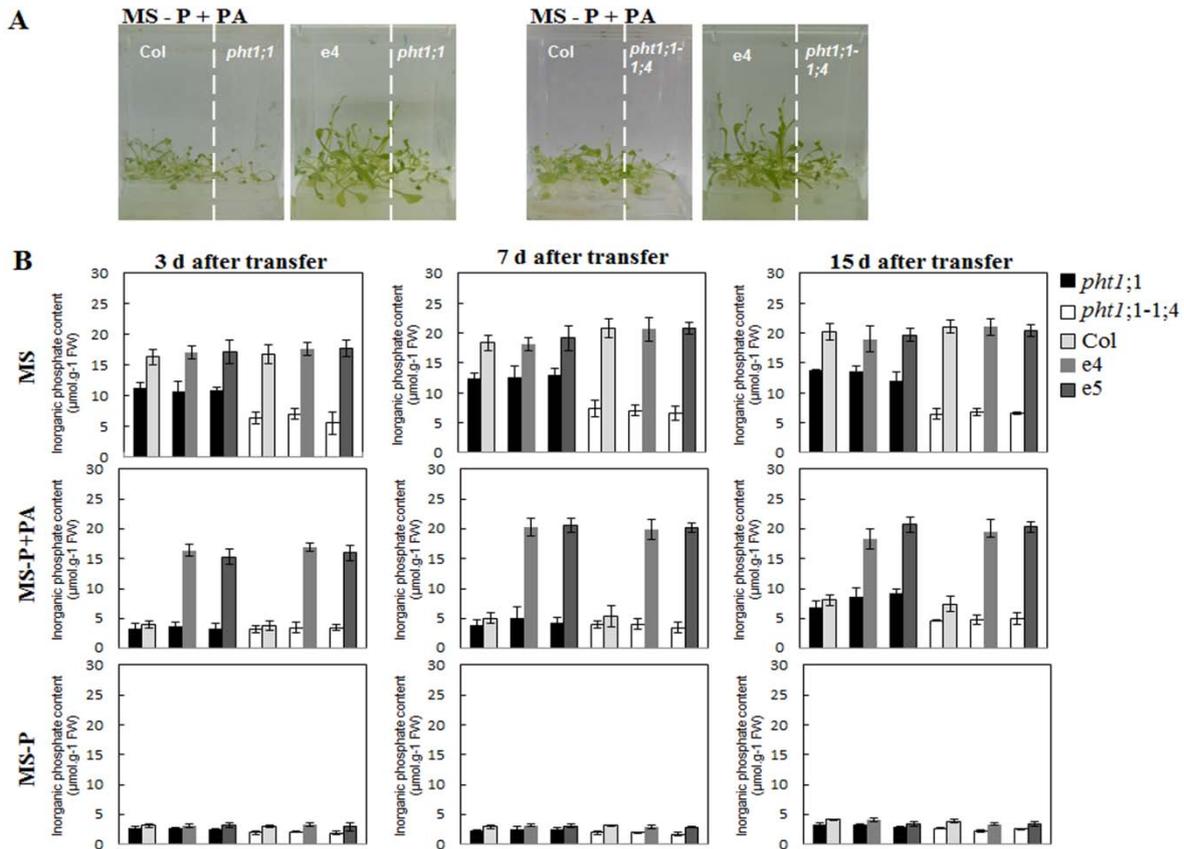


Figure 35: Croissance et teneurs foliaire en Pi dans les mutants *pht1;1* et *pht1;1-1;4* co-cultivées avec de les plantes sauvages d'*Arabidopsis* (Col) ou les sur-expresseurs ePHY. Des plantules (Col, *pht1;1*, *pht1;1-1;4*, e4 et e5) cultivées préalablement sur MS solide sans P et âgées d'une semaine ont été transférées en milieux liquides comme indiqué précédemment dans les tests de co-cultures pour 2 semaines supplémentaires.

(A) Photos représentatives prises deux semaines après co-cultures en hydroponie entre (*pht1;1* ou *pht1;1-1;4* :Col et *pht1;1* ou *pht1;1-1;4* :e4) avec un rapport de 1:4.

(B) Concentrations de Pi dans les parties aériennes des plantules co-cultivées après 3, 7 et 15 jours du transfert en milieu MS liquide, MS-P et MS-P + 0,33 mM AP. Les valeurs présentées sont des moyennes de 3 répétitions (n=6).

VI. Étude de l'expression des transporteurs du Pi chez les plantes co-cultivées en présence d'AP comme seule source de Pi

Puisque les plantes WT (Col) d'*Arabidopsis* montrent une amélioration de la croissance lorsqu'elles sont cultivées à coté des plantes sécrétrices de phytase ePHY en présence d'AP comme seule source de Pi, nous nous sommes alors intéressés à évaluer l'expression des transporteurs impliqués dans l'absorption du Pi (*PHT1;1* et *PHT1;4*) ainsi que ceux impliqués dans la translocation de cet ion des racines vers les parties aériennes (*PHO1* et *PHO1;H1*) à la fois dans les plantes sauvages et les sur-expresseurs de ePHY cultivées ensemble dans ces

conditions (MS-P+AP), les conditions MS et MS-P sont utilisées comme témoins. Comme attendu, les transporteurs de Pi ont été induits en réponse à un manque du P (MS-P) dans toutes les lignées testées (plantes sauvages, lignées transgéniques et lignées ev) (**Figure 36**) en comparaison avec un milieu complet MS.

En présence d'AP dans un milieu carencé en P (condition MS-P+AP), les plantes sauvages co-cultivées avec les lignées ev montrent une diminution modérée de l'expression des transporteurs du Pi testés, ce qui suggère que la présence d'AP n'affecte pas la voie de signalisation de la carence en Pi.

En revanche, ces transporteurs sont réprimés dans les lignées transgéniques cultivées dans ces conditions (MS-P+AP), ceci indique l'approvisionnement du milieu en Pi après l'hydrolyse de l'AP. Le plus intéressant, c'est que les transporteurs chez les plantes sauvages co-cultivées avec les lignées transgéniques ePHY montrent également une répression et atteignent des niveaux similaires à ceux observés dans des conditions standard (MS). Une telle régulation négative des transporteurs confirme de nouveau l'enrichissement du milieu de culture en Pi puisqu'il devient disponible après l'hydrolyse de l'AP par la phytase sécrétée à partir des racines des lignées transgéniques.

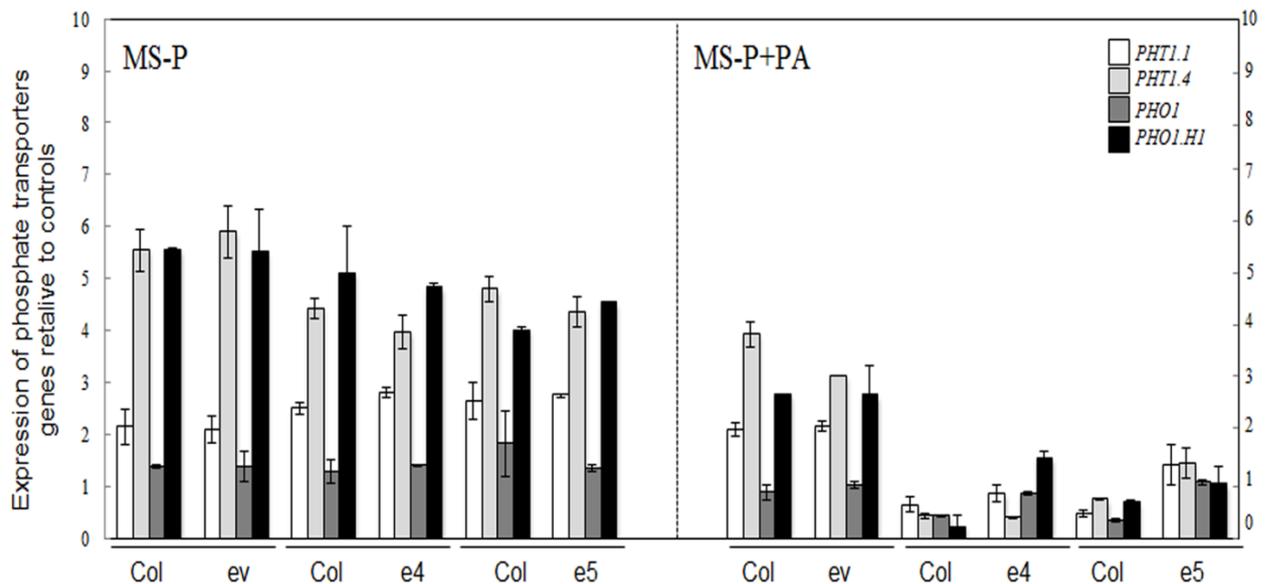


Figure 36: Analyse de l'expression des transporteurs du P, *PHT1;1*, *PHT1;4*, *PHO1* et *PHO1;H1* après deux semaines de co-culture entre les plantes sauvages d'*Arabidopsis* (Col) et les lignées transgéniques intégrant Vv (ev) ou ePHY (e4 et e5) en hydroponie, dans MS-P ou MS-P+0,33 mM AP. Les valeurs d'expression des gènes ont été normalisées grâce à leurs valeurs d'expression respectives en condition contrôle (MS). Les valeurs présentées sont des moyennes de 3 répétitions. Chaque répétition correspond à la mesure obtenue à partir de l'analyse de racines récoltées à partir d'un pool de cinq plantes.

D'autre part, nous avons employé une lignée *pht1-4* contenant le gène rapporteur GUS sous le contrôle du promoteur du gène *PHT1;4* inductible par le manque du Pi (Misson *et al.*, 2004) afin de suivre l'expression de ce gène (*PHT1;4*) au niveau des racines de ce mutant lorsqu'il est co-cultivé avec les lignées ePHY.

Pour cela, les plantules *Pht1;4::GUS* âgées de 7 jours ont été transférées ensemble avec les lignées transgéniques ou avec des plantes sauvages en milieu liquide comme décrit précédemment pour deux semaines supplémentaires. Une activité GUS a été détectée sur les racines des plantules *Pht1;4::GUS* 3, 7 et 15 jours après leur transfert avec les plantes WT aussi bien dans un milieu sans phosphate (-P) qu'additionné de phytate (-P+AP).

Lorsque ces plantules sont co-transférées avec les lignées transgéniques ePHY, une coloration GUS similaire a été détectée uniquement en conditions MS-P. Alors qu'en conditions MS-P+AP, les racines de la lignée *Pht1;4::GUS* montrent une faible activité GUS 3 jours après le transfert mais pas après 7 et 15 jours de transfert (Figure 37). Ces résultats indiquent que le signal de carence en Pi a été réprimé suite à l'augmentation notable de la concentration du Pi dans le milieu de culture. Cette constatation fournit une preuve supplémentaire qui confirme que le Pi libéré à partir de l'AP pourrait être détecté et utilisé efficacement par les plantes voisines.

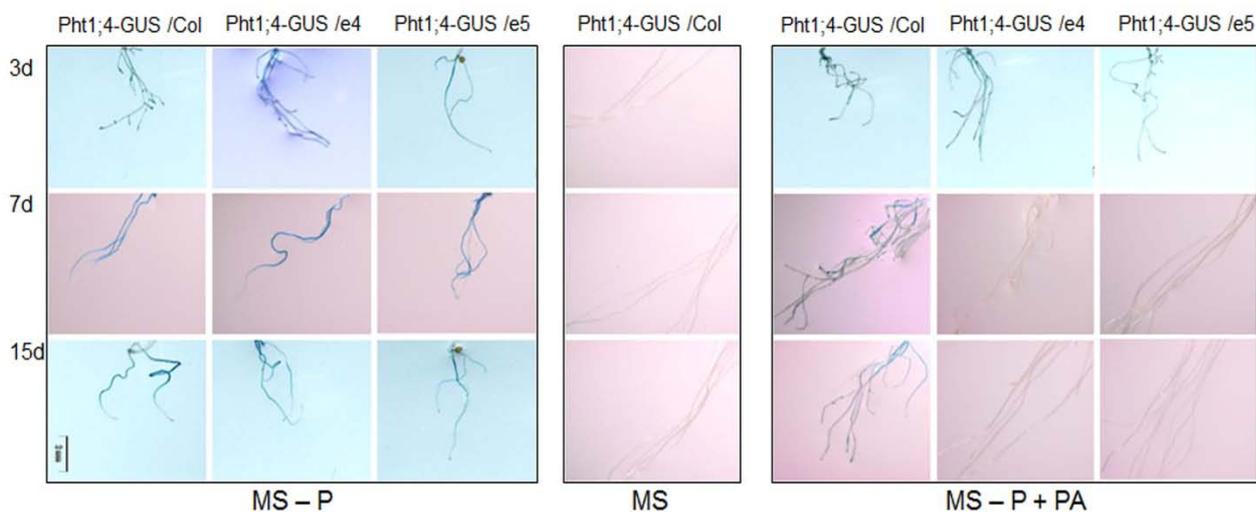


Figure 37: Détection de l'activité GUS dans la lignée *Pht1;4::GUS* co-cultivées avec les lignées transgéniques (e4 et e5) ou les plantes WT (Col).

Des plantules *Pht1;4::GUS* âgées d'une semaine ont été transférées à coté de plantules WT (Col) ou les sur-expresseurs ePHY (e4 et e5) dans des milieux liquides MS complet, MS sans P (MS-P) ou additionné de 0,33 mM d'AP comme source de P (MS-P+AP). La coloration GUS a été réalisée sur les racines de la lignée *Pht1;4::GUS* après 3, 7 et 15 jours de transfert pour suivre l'expression du gène *PHT1;4*.

Conclusion

Le travail présenté dans ce chapitre avait pour but de rendre les plantes aptes à acquérir le Pi à partir du phytate existant dans le milieu extérieur. Pour ce faire nous avons commencé par la génération de plantes transgéniques exprimant la forme secrétée de la phytase de *Bacillus subtilis* nommée ici ePHY-US417. Ensuite des analyses quantitatives et qualitatives ont montré que la phytase secrétée par les racines des plantes transgéniques est active et elle est capable de libérer le Pi à partir de l'AP. En outre des analyses physiologiques effectuées *in vitro* montrent que la surexpression de la forme secrétée de cette phytase ePHY confère une meilleure croissance aux lignées transgéniques lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu contenant l'AP comme seule source de P. Ce résultat corrobore la capacité de cette phytase ePHY à libérer le Pi, suite à l'hydrolyse de l'AP, qui va servir par la suite à la nutrition des plantes transgéniques.

D'autres résultats encore plus importants ont été obtenus lorsqu'on a effectué des tests de co-culture en conditions limitantes en P de plantes sauvages (*Arabidopsis* ou Tabac) avec les sur-expresses de ePHY. En effet, ces tests ont révélé que la phytase secrétée ePHY-US417 améliore la croissance non seulement des lignées transgéniques mais aussi des plantes co-cultivées avec celles-ci, en milieu liquide contenant le phytate comme seule source de P. Des tests complémentaires de co-culture, avec des mutants affectés dans le transport du phosphate (*pht1-1* et *pht1-1/1-4*) ont confirmé que l'amélioration de la croissance est due principalement au Pi délivré par ePHY-US417 et non pas aux inositol phosphates qui sont libérés aussi lors de l'hydrolyse du phytate dans le milieu de culture. De même, nous avons prouvé l'implication du système de transport du P à haute affinité (transporteurs *PHT1;1* et *PHT1;4*) dans l'absorption du Pi libéré sous l'action de la phytase secrétée dans le milieu de culture puisque ces mutants n'arrivent pas à bénéficier du Pi libéré. L'analyse de l'expression de ces transporteurs par PCR quantitative, a renforcé ce résultat. Le plus intéressant c'est que lorsque les plantes sauvages d'*Arabidopsis* co-cultivées avec les lignées ePHY en milieu contenant l'AP comme seule source de P, les niveaux d'expression de ces transporteurs chutent à des niveaux similaires à ceux enregistrés en conditions standards chez les plantes voisines ce qui indique que le Pi libéré dans le milieu pourrait être détecté et absorbé par ces plantes via les transporteurs PHT.

Ces résultats montrent pour la première fois l'efficacité des phytases secrétées par les racines des plantes transgéniques dans la promotion de la croissance des plantes voisines en présence d'AP en tant que source alternative de P. D'autres efforts sont nécessaires pour valider ce

nouveau concept et des tests supplémentaires sont nécessaires pour évaluer l'efficacité de ces enzymes en conditions de sol amendé en phytate comme il a été rapporté précédemment (Zimmermann *et al.*, 2003 ; George *et al.*, 2005 ; Ma *et al.*, 2011). Il est vrai que plusieurs études suggèrent que l'effet de ces phytases est tributaire de l'environnement de culture notamment le pH, la composition du sol qui pourrait influencer la disponibilité du substrat et de l'enzyme (Giaveno *et al.*, 2010). Des études antérieures ont tout de même démontré que ces phytases gardent leur efficacité en conditions de sol (Zimmermann *et al.*, 2003; George *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2011).

Bien qu'encore préliminaire, notre étude constitue un début prometteur pour le développement de nouvelles pratiques d'"intercropping" (cultures associées ou mixtes) et ouvre de nouveaux horizons dans le développement d'une agriculture durable permettant le maintien des cultures sans recours à l'usage intensif d'engrais phosphatés.



Conclusions Générales et Perspectives

Conclusions Générales et Perspectives

L'AP représente la forme majeure de stockage du P dans le sol et constitue la principale réserve de P dans les plantes et les graines des céréales indispensables pour l'alimentation animale. Bien qu'il soit présent en quantité importante, ce stock d'AP n'est pas disponible pour les plantes ou les animaux monogastriques sauf s'il est hydrolysé par des enzymes spécifiques « les phytases ».

L'objectif principal de cette thèse est d'investiguer d'une part le potentiel de la phytase bactérienne PHY-US417 dans l'amélioration de productivité végétale en augmentant la capacité des plantes à mobiliser le P à partir de l'AP, et d'étudier d'autre part, l'influence de l'hydrolyse de l'AP dans la réponse des plantes à divers types de stress abiotiques.

Ainsi dans une première partie, on a développé une stratégie permettant de surproduire la phytase PHY-US417 chez les plantes d'*A. thaliana*. Nos résultats ont démontré que l'activité phytasique chez les plantes surexprimant PHY-US417 a augmenté de 8 à 28 fois et cette augmentation a été corrélée à une réduction du taux d'AP d'à peu près 40% par rapport aux plantes sauvages. Cette réduction n'a pas affecté la formation de graines, leur germination ni le développement des plantes. De même, le mutant *ipk1-1* montre un rendement normal en graines et une germination non altérée malgré un contenu en AP plus atténué (Stevenson-Paulik et al., 2005). Par contre, dans d'autres cas la diminution d'AP pourrait être associée à des effets négatifs affectant les performances des plantes et les graines (Yip et al., 2003 ; Meis et al., 2003; Pilu et al., 2005; Doria et al., 2009).

A long terme une telle stratégie pourrait être étendue à d'autres plantes notamment les céréales (telles que l'orge) pour générer des graines plus riches en Pi. Celles-ci pourraient alors être exploitées dans l'alimentation des animaux monogastriques, dépourvus de phytase dans leur tractus intestinal, leur permettant d'absorber le P phytique provenant des graines.

Des analyses chromatographiques par HPIC (High-Performance Ionic Chromatography) sur des extraits végétaux ont révélé que dans des conditions de carence en P, les lignées transgéniques L7 et L9 accumulent dans les tiges des niveaux de Pi et de sulfate nettement supérieurs (50%) à ceux de plantes sauvages. Cela nous a amené à effectuer une PCR quantitative pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels la surexpression de PHY-US417 affecte la distribution inter-organes du Pi et de SO₄. Ces études d'expression ont montré l'induction de transporteurs de phosphate et de sulfate ainsi que de deux ARN non codant (*IPSI* et *AT4*) impliqués dans la voie de signalisation du P. De

l'ensemble de ces données, nous suggérons que l'AP pourrait être impliqué dans le contrôle des voies de signalisation et d'homéostasie du Pi et du SO₄ chez les plantes.

Cette première partie des résultats, a fait l'objet d'un article publié en 2014 à *Plant Cell Physiology* intitulé: "**Over-expression of the Bacterial Phytase US417 in *Arabidopsis* Reduces the Concentration of Phytic Acid and Reveals Its Involvement in the Regulation of Sulfate and Phosphate Homeostasis and Signaling**".

Par ailleurs, des études antérieures ont révélé l'existence d'une interaction entre les voies régulant l'homéostasie du Phosphore et du Zinc. Dans ce contexte, on s'est intéressé à étudier l'influence de la diminution de la teneur en AP sur la réponse des plantes à la carence en zinc. Ainsi, on a effectué une série de tests de croissance *in vitro* sur les lignées transgéniques dans différents conditions de carence (simples et combinés) afin de voir si l'AP pourrait être impliqué dans l'interconnexion entre les voies de signalisation régulant l'homéostasie du P et du Zn. Ces tests ont révélé que le système racinaire des lignées transgéniques présente un développement nettement supérieur à celui des plantes sauvages en condition de carence en zinc et que cet effet est observé même en condition de double carence (P et Zn). L'analyse de l'accumulation du Pi et du Zn montre que les lignées transgéniques ont des teneurs foliaires en Pi et en Zn nettement supérieures aux plantes sauvages. Quant au mutant *ipk1-1* il se comporte de manière similaire aux lignées transgéniques en condition de carence en P et en condition standard. Cependant, en condition de carence en Zn, *ipk1-1* ne montre pas d'amélioration au niveau du développement racinaire comme celle observée chez les lignées transgéniques et il semble présenter une concentration en Zn légèrement inférieure à celle des plantes sauvages. Ceci laisse penser qu'il existe un mécanisme de transport qui contrôle l'homéostasie de ces éléments minéraux (P et Zn) et qui est influencé par la réduction de la concentration intracellulaire d'AP. Il est toutefois probable que ce ne soit pas la simple baisse du niveau d'AP qui influence ce mécanisme mais que les dérivés moins phosphorylés générés suite à l'hydrolyse de l'AP par la phytase PHY-US417 y soient aussi impliqués. Cette hypothèse semble être renforcée par le fait que le mutant *ipk1-1* (affecté au niveau de l'enzyme *IPK1* impliquée dans la dernière étape de la voie de biosynthèse de l'AP) a montré une réduction d'AP plus prononcée atteignant 83% (Stevenson-Paulik *et al.*, 2005) et une inhibition de la croissance racinaire en condition de carence en Zn plus forte que celle observée chez les lignées L7 et L9.

L'évaluation de l'expression de deux transporteurs de P et de Zn par RT-PCR semi-quantitative a montré une variation du niveau d'expression de *PHT1;4*, *PHO1;H3* et du *ZIP4*

entre les plantes sauvages et les plantes ayant de faible teneur en AP. Une telle régulation du transport et de l'homéostasie du Pi par l'AP a été observée dans le 1^{er} chapitre et évoquée également par Kuo *et al.*, (2014). Le transporteur du Zn (*ZIP4*) en condition de carence en Zn, montre des niveaux d'expression variables entre les géotypes testés qui semblent être en corrélation avec la variation des niveaux intracellulaire de Zn. Ces observations supportent aussi l'intervention des inositol phosphates générés chez les lignées L7 et L9 (mais pas chez le mutant) dans la régulation du transport du Zn.

Il serait tout de même important de compléter le travail effectué dans cette partie par l'étude d'expression d'autres transporteurs afin de consolider nos résultats et de mieux comprendre la signification biologique des interactions entre les voies de signalisation régulant l'homéostasie du P et du Zn via le taux cellulaire d'AP et de ses dérivés.

Il est bien établi que les inositol phosphates (InsP) peuvent agir comme des messagers secondaires intervenant dans la réponse des plantes à divers stress (DeWald *et al.*, 2001; Tagi *et al.*, 2006; Munnik et Vermeer, 2010). Etant donné que l'activité hydrolytique de la phytase PHY-US417 pourrait donner naissance à des InsP (notamment les Ins(1,3,5)P₃ ou Ins(2,4,6)P₃), on s'est intéressé à investiguer la réponse des lignées surexprimant PHY-US417 à divers stress et plus particulièrement ici à la salinité et au stress osmotique. Des tests de croissance ont montré que les lignées L7 et L9 sont plus tolérantes au stress osmotique et sont moins sensibles à l'ABA. Cette amélioration est associée à un maintien de l'activité photosynthétique, à l'augmentation des teneurs foliaires d'AsA ainsi qu'à l'augmentation des activités des enzymes antioxydantes (CAT, POD, SOD). Par contre, le mutant *ipk1-1* montre un phénotype sensible comme rapporté par Kim et Tai (2011). Ces résultats supportent alors que les IPP et le *myo*-inositol générés suite à l'hydrolyse de l'AP par la phytase PHY-US417 sont à l'origine de cette tolérance au stress osmotique. Des travaux récents (Lisko *et al.*, 2013 ; Zhang *et al.*, 2008 ; Munnik et Vermeer, 2010) ont montré que le *myo*-inositol peut servir de précurseur de l'AsA et de plusieurs osmolytes. Ainsi l'hypothèse de la génération du *myo*-inositol chez les plantes transgéniques se trouve renforcé par l'augmentation de l'AsA. Il convient tout de même de consolider nos résultats par des analyses permettant d'identifier et de quantifier le *myo*-insitol et les InsP générées suite à l'hydrolyse de l'AP par la phytase PHY-US417.

Dans la dernière partie de cette thèse, une forme secrétée de la phytase ePHY-US417 a été clonée et transférée chez *Arabidopsis*. Les analyses moléculaires des plantes transgéniques

ont confirmé l'intégration et l'expression de cette phytase ePHY. Une analyse qualitative en effectuant un test de coloration avec le FeCl_3 (Latta et Eskin,1980) nous a permis de détecter une activité phytasique au niveau des racines des lignées transgéniques. Des dosages enzymatiques effectués confirment que l'activité phytasique secrétée par les racines des lignées transgéniques dans le milieu extérieur est largement supérieure à celle des plantes sauvages. Les analyses physiologiques ont montré que ePHY est capable de mobiliser le Pi à partir du phytate présent dans le milieu extérieur, permettant ainsi une meilleure croissance non seulement des lignées transgéniques mais aussi des plantes sauvages co-cultivées avec celles-ci (*Arabidopsis* et Tabac). En outre, nous avons pu confirmer que l'amélioration de la croissance des lignées transgéniques, ainsi que des plantes voisines, provient d'une meilleure absorption du Pi libéré par la phytase secrétée par les racines dans le milieu de culture et non pas des inositol phosphates (qui sont libérés lors de l'hydrolyse de l'AP) puisque les mutants du transport du P (*pht1-1* et *pht1-1/1-4*) co-cultivés à côté des lignées transgéniques sont incapables de profiter du Pi libéré. L'analyse de l'expression de ces transporteurs par PCR quantitative, a renforcé ce résultat puisque leurs niveaux d'expressions chez les plantes voisines chutent à des niveaux similaires à ceux enregistrés en conditions standard ce qui indique que le Pi libéré dans le milieu pourrait être détecté et absorbé par ces plantes via les transporteurs PHT. Ces résultats montrent la capacité de cette enzyme de mobiliser le Pi à partir du phytate présent dans le milieu extérieur et qui sert à la nutrition des plantes transgéniques et des plantes voisines. Par ailleurs, une lignée *pht1-4* contenant le gène rapporteur GUS sous le contrôle du promoteur du gène *PHT1;4* inductible par le manque de Pi a été employée afin de suivre l'expression du gène *PHT1;4* au niveau des racines de ce mutant lorsqu'il est co-cultivé avec les lignées ePHY. Lorsque les plantules *Pht1;4::GUS* sont co-transférées avec les plantes sauvages, une activité GUS a été détectée dans les racines de ces plantules aussi bien dans un milieu sans phosphate (-P) qu'additionnée avec phytate (-P+AP), 3, 7 et 15 jours après leur transfert. Lorsqu'elles sont co-cultivées avec les lignées ePHY, une coloration GUS similaire a été détectée uniquement en conditions MS-P. Alors qu'en conditions MS-P+AP, les racines des plantules *Pht1;4::GUS* montrent une faible activité GUS 3 jours après le transfert mais pas après 7 et 15 jours de transfert. Ces résultats prouvent l'augmentation de la concentration du Pi dans le milieu de culture et confirment que le Pi libéré à partir de l'AP pourrait être détecté et utilisé efficacement par les plantes voisines.

Ces résultats, ont fait l'objet d'un article publié en **2016** à *Plant Biotechnology Journal* intitulé: " **The secretion of the bacterial phytase PHY-US417 by Arabidopsis roots reveals its potential for increasing phosphate acquisition and biomass production during co-growth**".

Enfin, ces résultats encourageants méritent d'être consolidés par la mise au point de tests de co-culture en sols dans des serres contrôlées et en utilisant des plantes d'intérêt comme l'orge. La réussite d'une telle approche pourrait ouvrir des perspectives pour de nouvelles pratiques d'"intercropping" (cultures associées ou mixtes) renforçant ainsi le développement d'une agriculture durable plus respectueuse de l'environnement à travers la limitation de l'usage intensif des engrais phosphatés.



Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

-A-

Abdolzadeh A, Wang X, Veneklaas EJ, Lambers H. 2010. Effects of phosphorus supply on growth, phosphate concentration and cluster-root formation in three *Lupinus* species. *Annals of botany* **105**: 365-74.

Abel S, Ticconi CA, Delatorre CA. 2002. Phosphate sensing in higher plant. *Physiologia Plantarum* **115**: 1-8.

Abid N, Khatoon A, Maqbool A, Irfan M, Bashir A, Asif I, Shahid M, Saeed A, Brinch-Pedersen H, Malik K A. 2016. Transgenic expression of phytase in wheat endosperm increases bioavailability of iron and zinc in grains. *Transgenic Res* DOI 10.1007/s11248-016-9983-z

Agius F, Gonzalez-Lamothe R, Caballero JL, Munoz-Blanco J, Botella MA, Valpuesta V. 2003. Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nat Biotechnol* **21**: 177-181.

Ai P, Sun S, Zhao J, Fan X, Xin W, Guo Q, Yu L, Shen Q, Wu P, Miller AJ et al. 2009. Two rice phosphate transporters, OsPht1;2 and OsPht1;6, have different functions and kinetic properties in uptake and translocation. *Plant J* **57**: 798-809.

Alcazar-Roman AR, Wentz SR. 2008. Inositol polyphosphates: A new frontier for regulating gene expression. *Chromosoma* **117**: 1-13.

Alexova R, Millar AH. 2013. Proteomics of phosphate use and deprivation in plants. *Proteomics* **13**: 609-623.

Al-Ghazi Y, Muller B, Pinloche S, Tranbarger T, Nacry P, Rossignol M, Tardieu F, Doumas P. 2003. Temporal responses of *Arabidopsis* root architecture to phosphate starvation: Evidence for the involvement of auxin signalling. *Plant Cell Environ* **26**: 1053-1066.

Ali N, Paul S, Gayen D, Sarkar SN, Datta SK, Datta K. 2013a. RNAi mediated down regulation of myo-inositol-3-phosphate synthase to generate low phytate rice. *Rice* **6**: 12.

Ali N, Paul S, Gayen D, Sarkar SN, Datta K, Datta SK. 2013b. Development of low phytate rice by RNAi mediated seed-specific silencing of inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase gene (IPK1). *PLoS one* **8**: e68161.

Aluru MR, Rodermeil SR, Reddy MB. 2011. Genetic Modification of Low Phytic Acid 1-1 Maize to Enhance Iron Content and Bioavailability. *J. Agric. Food Chem.* **59**: 12954-12962.

Ames BN. 1966. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol.* **8**: 115-118.

Andersson MX, Stridh MH, Larsson KE, Liljenberg C, Sandelius AE. 2003. Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosylacylglycerol. *FEBS Letters* **537**: 128-132.

Ariza-Nieto M, Blair M, Welch R, Glahn R. 2007. Screening of iron bioavailability patterns in eight bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes using the Caco-2 cell *in vitro* model. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 7950-7956.

Arnon DI. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* **24**: 1-15.

Asmar F. 1997. Variation in activity of root extracellular phytase between genotypes of barley. *Plant Soil* **195**: 61-64.

Assuncao AG, Persson DP, Husted S, Schjorring JK, Alexander RD, Aarts MG. 2013. Model of how plants sense zinc deficiency. *Metallomics* **5**: 1110-1116.

Aung K, Lin SI, Wu CC, Huang YT, Su CL, Chiou TJ. 2006. *pho2*, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene. *Plant Physiol* **141**: 1000-1011.

-B-

Baldwin JC, Karthikeyan AS, and Raghothama KG. 2001. *LEPS2*, a Phosphorus Starvation-Induced Novel Acid Phosphatase from Tomato. *Plant Physiol.* **125** : 728-737.

Bari R, Datt Pant B, Stitt M, Scheible WR. 2006. PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol.* **141**: 988-999.

Bariola PA, Howard C J, Taylor CB, Verburg MT, Jaglan VD, Green PJ. 1994. The *Arabidopsis* ribonuclease gene *RNS1* is tightly controlled in response to phosphate limitation. **6**: 673-685.

Bates LS, Waldren RP, Teare ID. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* **39**: 205-207.

Bates T, Lynch JP. 1996. Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. *Plant Cell Environ.* **19**: 529-538.

Bayle V, Arrighi JF, Creff A, Nespoulous C, Vialaret J, Rossignol M, Gonzalez E, Paz-Ares J, Nussaume L. 2011. *Arabidopsis thaliana* high-affinity phosphate transporters exhibit multiple levels of posttranslational regulation. *Plant Cell* **23**: 1523-1535.

Bearley CA, Hanke DE. 1996a. Inositol phosphates in barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone tissue are stereochemically similar to the products of breakdown of InsP6 *in vitro* by wheat-bran phytase. *Biochem. J.* **318**: 279-286.

Bearley CA, Hanke DE. 1996b. Phosphates in the duckweed *Spirodela polyrrhiza* L. *Biochem. J.* **314**: 215-225.

- Bennett EM, Carpenter SR, Caraco NF. 2001.** Human Impact on Erodable Phosphorus and Eutrophication: A Global Perspective. *BioScience* **51**: 227-234.
- Berdy SE, Kudla J, Gruissem W, Gillaspay GE. 2001.** Molecular characterization of At5PTase1, an inositol phosphatase capable of terminating inositol trisphosphate signaling. *Plant Physiol.* **126**: 801-810.
- Berridge M.J. (2009)** Inositol trisphosphate and calcium signaling mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta* **1793**: 933-940.
- Bieleski R. L. 1973.** Phosphate Pools, Phosphate Transport, and Phosphate Availability. *Annual Review of Plant Physiology* **24**: 225-252.
- Bieleski RL, Ferguson IB. 1983.** Physiology and metabolism of phosphate and its compounds. In A Lauchli, RL Bieleski, eds, *Encyclopedia of Plant Physiology Springer Verlag, Berlin* **15**: 422-449
- Bohn L, Meyer AS, Rasmussen SK. 2008.** Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *J Zhejiang Univ Sci B* **9**: 165-191.
- Bohn L, Josefsen L, Meyer AS, Rasmussen SK. 2007.** Quantitative analysis of phytate globoids isolated from wheat bran and characterization of their sequential dephosphorylation by wheat phytase. *J Agric Food Chem* **55**: 7547-7552.
- Borch K, Bouma TJ, Lynch JP, Brown KM. 1999.** Ethylene: a regulator of root architectural responses to soil phosphorus availability. *Plant, Cell and Environment* **22**: 425-431.
- Bouain N, Shahzad Z, Rouached A, Khan GA, Berthomieu P, Abdely C, et al. 2014b.** Phosphate and zinc transport and signaling in plants : toward a better understanding of their homeostasis interaction. *J. Exp.Bot.* **65**: 5725-5741.
- Bournier M, Tissot N, Mari S, Boucherez J, Lacombe E, Briat JF, et al. 2013.** *Arabidopsis ferritin 1* (AtFer1) gene regulation by the phosphate starvation response 1 (AtPHR1) transcription factor reveals a direct molecular link between iron and phosphate homeostasis. *J. Biol. Chem.* **288**: 22670-22680.
- Bouwman L, Goldewijk KK, Van Der Hoek KW, Beusen AHW, Van Vuuren DP, Willems J, et al. 2011.** Exploring global changes in nitrogen and phosphorus cycles in agriculture induced by livestock production over the 1900–2050 period. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* doi:10.1073/pnas.1012878108.
- Bradford MM. 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.
- Branscheid A, Sieh D, Pant BD, May P, Devers EA, et al. 2010.** Expression pattern suggests a role of miR399 in the regulation of the cellular response to local Pi increase during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mol. Plant Microbe Interact.* **23**: 915-26.
- Bregitzer P, Raboy V. 2006.** Effects of four independent low-phytate mutations on barley agronomic performance. *Crop Sci.* **46**: 1318-1322.

Brinch-Pedersen H, Hatzack F, Sorensen LD, Holm B. 2003. Concerted action of endogenous and heterologous phytase on phytic acid degradation in seed of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Transgenic Res.* **12**: 649-659.

Brinch-Pedersen H, Dahl Sørensen L, Bach Holm P. 2002. Engineering crop plants: getting a handle on phosphate. *TRENDS in Plant Science.* **7**: 118-125.

Buhtz A, Springer F, Chappell L, Baulcombe DC, Kehr J. 2008. Identification and characterization of small RNAs from the phloem of *Brassica napus*. *Plant J.* **53**:739-49.

Bun-Ya M, Nishimura M, Harashima S, Oshima Y. 1991. The PHO84 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 3229-3238.

Bustos R, Castrillo G, Linhares F, Puga MI, Rubio V, Pérez-Pérez J, Solano R, Leyva A, Paz-Ares J. 2010. A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in Arabidopsis. *PLoS Genet* **6**: e1001102

-C-

Campion B, Sparvoli F, Doria E, Tagliabue G, Galasso I, Fileppi M, Bollini R, Nielsen E. 2009. Isolation and characterisation of an *lpa* (low phytic acid) mutant in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor Appl Genet.* **118**: 1211-1221.

Carswell MC, Grant BR, Theodorou ME, Harris J, Niere JO, Plaxton WC. 1996. The fungicide phosphonate disrupts the phosphate starvation response in *Brassica nigra* seedlings. *Plant Physiol* **110**: 105-110.

Carswell MC, Grant BR, Plaxton WC. 1997. Disruption of the phosphatostarvation response of oilseed rape suspension cells by the fungicide phosphonate. *Planta* **203**: 67-74.

Cashikar AG, Rathinam K, Rao NM. 1997. Biochemical characterization and subcellular localization of the red kidney bean purple acid phosphatase. *Plant Physiology* **114**: 907-915.

Casieri L, Ait Lahmidi N, Doidy J, Veneault-Fourrey C, Migeon A, Bonneau L, Courty PE, Garcia K, Charbonnier M, Delteil A, Brun A, Zimmermann S, Plassard C, Wipf D. 2013. Biotrophic transportome in mutualistic plant-fungal interactions. *Mycorrhiza* DOI 10.1007/s00572-013-0496-9

Catala´ R, Santos E, Alonso JM, Ecker JR, Martí´nez-Zapater JM, Salinas J. 2003. Mutations in the Ca²⁺/H⁺ transporter CAX1 increase CBF/DREB1 expression and the cold-acclimation response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **15**: 2940-2951.

Celi L, Barberis E. 2005. Abiotic stabilization of organic phosphorus in the environment. In *Organic Phosphorus in the Environment*; Turner, B.L., Frossard, E., Baldwin, D.S., Eds.; CABI: Oxfordshire, UK, pp. 113-132.

Celi L, Barberis E. 2007. Abiotic reaction of inositol phosphates in soil. In *Inositol Phosphates: Linking Agriculture and the Environment*; Turner, B.L., Richardson, A.E., Mullaney, E.J., Eds.; CABI: Wallingford, UK, pp. 207-220.

- Chen J, Liu Y, Ni J, Wang Y, Bai Y, Shi J, Gan J, Wu Z, Wu P. 2011.** OsPHF1 regulates the plasmamembrane localization of low- and high-affinity inorganic phosphate transporters and determines inorganic phosphate uptake and translocation in rice. *Plant Physiol* **157**: 269-278.
- Chen ZH, Jenkins GI, Nimmo HG. 2008.** Identification of an F-Box protein that negatively regulates Pi starvation responses. *Plant and Cell Physiology* **49**: 1902-1906.
- Chen ZH, Nimmo GA, Jenkins GI, Nimmo HG. 2007.** BHLH32 modulates several biochemical and morphological processes that respond to Pi starvation in Arabidopsis. *Biochem. J.* **405**: 191-198.
- Cheng NH, Pittman JK, Shigaki T, Lachmansingh J, LeClere S, Lahner B, Salt DE, Hirschi KD. 2005.** Functional association of *Arabidopsis* CAX1 and CAX3 is required for normal growth and ion homeostasis. *Plant Physiology* **138**: 2048-2060.
- Cheng N-H, Pittman JK, Barkla BJ, Shigaki T, Hirschi KD. 2003.** The *Arabidopsis cax1* mutant exhibits impaired ion homeostasis, development, and hormonal responses and reveals interplay among vacuolar transporters. *The Plant Cell* **15**: 347-364.
- Chiera JM, Finer JJ, Grabau EA. 2004.** Ectopic expression of a soybean phytase in developing seeds of Glycine max to improve phosphorus availability. *Plant Mol. Biol.* **56**: 895-904.
- Chiou TJ, Lin SI. 2011.** Signaling network in sensing phosphate availability in plants. *Annu Rev Plant Biol* **62**: 185-206.
- Chiou TJ, Aung K, Lin SI, Wu CC, Chiang SF, Su CI. 2006.** Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**:412-21.
- Choi Y M, Suh H J, Kim J M. 2001.** Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus sp.* KHU-10. *J. Prot. Chem.* **20**: 287-292.
- Chu HM, Guo RT, Lin TW, Chou CC, Shr HL, Lai HL, Tang TY, Cheng KJ. 2004.** Structures of *Selenomonas ruminantium* phytase in complex with persulfated phytate: DSP phytase fold and mechanism for sequential substrate hydrolysis. *Structure* **12**: 2015-2024.
- Claxon A, Morris C, Blake D, Siren M, Halliwell B, Gustafsson T, Lofkvist B, Bergelin I. 1990.** The anti-inflammatory effects of D-myo-inositol-1,2,6-trisphosphate (PP56) on animal models of inflammation. *Agents Actions* **29**: 68-70.
- Clough SJ, Bent AF. 1998.** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. **16**: 735-743.
- Cruz- Ramírez A, Oropeza-Aburto A, Razo-Hernández F, Ramírez-Chávez E, Herrera-Estrella L. 2006.** Phospholipase DZ2 plays an important role in extraplasmidic galactolipid biosynthesis and phosphate recycling in Arabidopsis roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **103**: 6765- 6770.
- Cumbus IP, Hornsey DJ, Robinson LW. 1977.** The influence of phosphorus, zinc and manganese on absorption and translocation of iron in watercress. *Plant Soil* **48**: 651-660.

Czarnecki O, Yang J, Weston DJ, Tuskan GA, Chen JG. 2013. A dual role of strigolactones in phosphate acquisition and utilization in plants. *Int J Mol Sci* 14: 7681-7701.

-D-

Dai X, Wang Y, Yang A, Zhang WH. 2012. OsMYB2P-1, an R2R3MYB transcription factor, is involved in the regulation of phosphate-starvation responses and root architecture in rice. *Plant Physiol* 159: 169-183.

Danova-Alt R, Dijkema C, De Waard P, Kock M. 2008. Transport and compartmentation of phosphite in higher plant cells-kinetic and ³¹P nuclear magnetic resonance studies. *Plant, cell & environment* 31: 1510-21.

Dao TH. 2004. Oranic ligand effects on the enzymatic dephosphorylation of myo-inositol hexakis dihydrogenphosphate in dairy wastewater. *J. Environ. Qual.* 33: 349-358.

Dao TH. 2007. Ligand effects on inositol phosphate solubility and bioavailability in animal manures. In *Inositol Phosphates: Linking Agriculture and the Environment*; Turner, B.L., Richardson, A.E., Mullaney, E.J., Eds.; CABI: Wallingford, UK; Cambridge, MA, USA, pp. 169-185.

Daram P, Brunner S, Persson BL, Amrhein N, Bucher M. 1998. Functional analysis and cell-specific expression of a phosphate transporter from tomato. *Planta* 206: 225-233

Daram P, Brunner S, Rausch C, Steiner C, Amrhein N, Bucher M. 1999. Pht2;1 encodes a low-affinity phosphate transporter from *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 11: 2153-2166.

Dassa E, Marck C, Boquet PL. 1990. The complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* gene appA reveals significant homology between pH 2.5 acid phosphatase and glucose-1-phosphatase. *J Bacteriol.* 172: 5497-5500.

Das-Chatterjee A, Goswami L, Maitra S, Dastidar KG, Ray S, Majumder AL. 2006. Introgression of a novel salt-tolerant l-myo-inositol 1-phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.)Tateoka (PcINO1) confers salt tolerance to evolutionary diverse organisms. *FEBS Letters* 580: 3980-3988.

Daudi A, O'Brien JA. 2012. Detection of Hydrogen Peroxide by DAB Staining in *Arabidopsis* Leaves. <http://www.bio-protocol.org/e263>

Dekock PC, Hall A, Inkson RHE. 1978. Active iron in plant leaves. *Ann. Bot.* 43: 737-740.

del Pozo JC, Allona I, Rubio V, Leyva A, de la Pena A, Aragoncillo C, Paz-Ares J. 1999. A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilising/oxidative stress conditions. *Plant J.* 19: 579-589.

Devaiah BN, Karthikeyan AS, Raghothama KG. 2007a. WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 143: 1789-1801.

Devaiah BN, Nagarajan VK, Raghothama KG. 2007b. Phosphate homeostasis and root development in *Arabidopsis* are synchronized by the zinc finger transcription factor ZAT6. *Plant Physiol.* **145**: 147-159.

DeWald DB, Torabinejad J, Jones CA, Shope JC, Cangelosi AR, Thompson JE, Prestwich GD, Hama H. 2001. Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlates with calcium mobilization in saltstressed *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**: 759-769.

Dionisio G, Madsen CK, Holm PB, Welinder KG, Jorgensen M, Stoger E, Arcalis E, Brinch-Pedersen H. 2011. Cloning and characterization of purple acid phosphatase phytases from wheat, barley, maize, and rice. *Plant Physiol* **156**: 1087-1100.

Donahue J, Alford S, Torabinejad J, Kerwin R, Nourbakhsh A, Ray W, Hernick M, Huang X, Lyons B, Hein P, et al. 2010. The *Arabidopsis thaliana* myo-inositol 1-phosphate synthase1 gene is required for myo-inositol synthesis and suppression of cell death. *Plant Cell* **22**: 888-903.

Doria E, Galleschi L, Calucci L, Pinzino C, Pilu R, Cassani E, Nielsen E. 2009. Phytic acid prevents oxidative stress in seeds: evidence from a maize (*Zea mays* L.) low phytic acid mutant. *Journal of Experimental Botany* **60**: 967-978.

Dorsch J, Cook A, Young K, Anderson J, Bauman A, Volkmann C, Murthy P, Raboy V. 2003. Seed phosphorus and inositol phosphate phenotype of barley low phytic acid genotypes. *Phytochemistry* **62**: 691-706.

Drakakaki G, Marcel S, Glahn RP, Lund EK, Pariagh S, Fischer R, Christou P, Stoger E. 2005. Endosperm-specific co-expression of recombinant soybean ferritin and *Aspergillus* phytase in maize results in significant increases in the levels of bioavailable iron. *Plant Mol. Biol.* **59**: 869-880.

Drøbak BK, Watkins PA. 2000. Inositol(1,4,5)trisphosphate production in plant cells: An early response to salinity and hyperosmotic stress. *FEBS Lett.* **481**: 240-244.

Duan K, Yi K, Dang L, Huang H, Wu W, Wu P. 2008. Characterization of a sub-family of *Arabidopsis* genes with the SPX domain reveals their diverse functions in plant tolerance to phosphorus starvation. *Plant J.* **54**: 965-975.

Duff MG, Sarath G, Plaxton WC. 1994. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiol Plant* **90**: 791-800.

-E-

Engelen AJ, van der Heeft FC, Randsdorp PH, Smit EL. 1994. Simple and rapid determination of phytase activity. *J. AOAC Int.* **77**: 760-764.

Essigmann B, Guler S, Narang RA, Linke D, Benning C. 1998. Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of SQD1, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**: 1950-1955.

-F-

Farhat A, Chouayekh H, Ben Farhat M, Bouchaala K, Bejar S. 2008. Gene cloning and characterization of a thermostable phytase from *Bacillus subtilis* US417 and assessment of its potential as a feed additive in comparison with a commercial enzyme. *Mol Biotechnol.***40** : 127-135.

Findenegg GR, Nelemans JA. 1993. The effect of phytase on the availability of P from myoinositol hexaphosphate (phytate) for maize roots. *Plant Soil* **154**: 189-196.

Föhse D, Claassen N, Jungk A. 1991. Phosphorus efficiency of plants. II. Significance of root radius, root hairs and cation-anion balance for phosphorus influx in seven plant species. *Plant Soil* **132**: 261-272.

Forde BG. 2000. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Act.* **1465**: 219-235.

Franco-Zorrilla JM, Valli A, Todesco M, Mateos I, Puga MI, Rubio-Somoza I, Leyva A, Weigel D, García JA, Paz-Ares J. 2007. Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat Genet* **39**: 1033-1037.

Franco-Zorrilla JM, Martín AC, Leyva A, Paz-Ares J. 2005. Interaction between phosphate starvation, sugar, and cytokinin signaling in *Arabidopsis* and the roles of cytokinin receptors CRE1/AHK4 and AHK3. *Plant Physiol* **138**: 847-857.

Frank T, Meuleye BS, Miller A, Shu QY, Engel KH. 2007. Metabolite profiling of two low phytic acid (*lpa*) rice mutants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 11011-11019.

Fu S, Sun J, Qian L, Li Z. 2008. *Bacillus* phytases: present scenario and future perspectives. *Appl Biochem Biotechnol* **151**: 1-8.

Fujii H, Chiou TJ, Lin SI, Aung K, Zhu JK. 2005. A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **15**: 2038-2043.

-G-

GARNACHE C, SWINTON S M., HERRIGES J A., LUPI F, and JAN STEVENSON R. 2016. SOLVING THE PHOSPHORUS POLLUTION PUZZLE: SYNTHESIS AND DIRECTIONS FOR FUTURE RESEARCH. *Amer. J. Agr. Econ.* 00: 1-26; doi: 10.1093/ajae/aaw027.

George TS, Richardson AE, Hadobas PA, Simpson RJ. 2004. Characterization of transgenic *Trifolium subterraneum* L. which expresses phyA and releases extracellular phytase: growth and P nutrition in laboratory media and soil. *Plant, Cell Environ.* **27**: 1351-1361.

George TS, Simpson RJ, Hadobas PA, Richardson AE. 2005. Expression of a fungal phytase gene in *Nicotiana tabacum* improves phosphorus nutrition of plants grown in amended soils. *Plant Biotechnol. J.* **3**: 129-140.

- Gerke J. 2010.** Humic (Organic matter)-Al(Fe)-phosphate complexes: An underestimated phosphate form in soils and source of plant-available phosphate. *Soil Sci.* **175**: 417-425.
- Giaveno C, Celi L, Richardson AE, Simpson RJ, Barberis E. 2010.** Interaction of phytases with minerals and availability of substrate affect the hydrolysis of inositol phosphates. *Soil Biology and Biochemistry* **42**: 491-498.
- Gibson D M, Ullah A B J. 1990.** in *Inositol Metabolism in Plants*, pp. 77-92, Wiley-Liss, Chichester
- Gibson DM, Ullah AHJ. 1988.** Purification and characterisation of phytase from cotyledons of germinating soybean seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* **260**: 503-513.
- Gilbert GA, Knight JD, Vance CP, Allan DL. 2000.** Proteoid root development of phosphorus deficient lupin is mimicked by auxin and phosphonate. *Annals of Botany* **85**: 921-928.
- Giots F, Donaton MCV, Thevelein JM. 2003.** Inorganic phosphate is sensed by specific phosphate carriers and acts in concert with glucose as a nutrient signal for activation of the protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **47**: 1163-1181.
- González E, Solano R, Rubio V, Leyva A, Paz-Ares J. 2005.** PHOSPHATE TRANSPORTER TRAFFIC FACILITATOR1 is a plant-specific SEC12- related protein that enables the endoplasmic reticulum exit of a high-affinity phosphate transporter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**: 3500-3512.
- Graf E, Empson K, Eaton J W. 1987.** Phytic acid. A natural antioxidant. *J. Biol. Chem.* **262**: 11647-11651.
- Greiner R, Lim BL, Cheng C, Carlsson NG. 2007.** Pathway of phytate dephosphorylation by beta-propeller phytases of different origins. *Can. J. Microbiol.* **53**: 488-495.
- Greiner R, Konietzny U. 2006.** Phytase for food application. *Food Technol Biotechnol.* **44**: 125-140.
- Greiner R, Muzquiz M, Burbano C, Cuadrado C, Pedrosa MM, Goyoga C. 2001.** Purification and characterization of a phytate-degrading enzyme from germinated faba beans (*Vicia faba* var. Alameda). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 2234-2240.
- Greiner R, Janya KD, Alminger ML. 2000.** Identification and properties of *myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases (phytases) from barley (*Hordeum vulgare*). *J. Cereal Sci.* **31**: 127-139.
- Greiner RE, Haller U, Konietzky et Jany KD. 1997.** Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. *Arch. Biochem. Bio-phys.* **341**: 229-248.
- Grieneisen VA, Xu J, Mare'e AFM, Hogeweg P, Scheres B. 2007.** Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* **449**: 1008-1013.

Grotz N, Fox T, Connolly E, Park W, Guerinot ML, Eide D. 1998. Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7220-7224.

Gruninger RJ, Selinger LB, Mosimann SC. 2009. Structural analysis of a multifunctional, tandemly repeated inositol polyphosphatase. *J Mol Biol.* **392**: 75-86.

Guerinot M L. 2000. The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et biophysica acta* **1465**: 190-198.

Guo-hua Xu, Veronique Chague, Cathy Melamed-Bessudo, Yoram Kapulnik, Ajay Jain, Kashchandra G. Raghothama, Avraham A. Levy, Avner Silber. 2007. Functional characterization of LePT4: a phosphate transporter in tomato with mycorrhiza-enhanced expression. *Journal of Experimental Botany* **58**: 2491-2501.

Guttieri MJ, Peterson KM, Souza EJ. 2006. Agronomic performance of low phytic acid wheat. *Crop Science* **46**: 2623-2629.

Guttieri M , Bowen D , Dorsch J , Raboy V, Souza E. 2004. Identification and characterization of a low phytic acid wheat. *Crop Sci.* **44**: 418-424.

-H-

Harland BF, et Morris, E.R. (1995). Phytate: A good or bad food component. *Nutr Res*, **15**: 733-754.

Harrison MJ, van Buuren M. 1995. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* **378**: 626-629.

Hamburger D, Rezzonico E, MacDonald-Comber Petetot J, Somerville C, Poirier Y. 2002. Identification and characterization of the *Arabidopsis* PHO1 gene involved in phosphate loading to the xylem. *The Plant Cell* **14**: 889-902.

Hartel H , Essigmann B, Lokstein H, Hoffmann-Benning S, Peters-Kottig M, Benning C. 1998. The phospholipid-deficient pho1mutant of *Arabidopsis thaliana* is affected in the organization, but not in the light acclimation, of the thylakoid membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **1415**: 205-218.

Hatazck F, Hubel F, Zhang W, Hansen PE, Rasmussen SK. 2001. Inositol phosphates from barley low-phytate grain mutants analysed by metal-dye detection HPLC and NMR *Biochemical Journal* **354**: 473-480

Hara A, et al. 1985. A new type of phytase from pollen of *Typha latifolia* L. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 3539-3544.

Haug W, Lantsch H. 1983. Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. *J. Sci. Food Agric.* **34**: 1423-1426.

Hayat S, Hayat Q, Alyemeni MN, Wani AS, Pichtel J, Aqil A. 2012. Role of proline under changing environment. *Plant Signaling & Behavior* **7**: 1-11.

Hayakawa T, Toma Y, Igaue I. 1989. Purification and characterization of acid phosphatases with or without phytase activity from rice bran. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 1475-1483.

Hayes JE, Richardson AE, Simpson RJ. 1999. Phytase and acid phosphatase activities in extracts from roots of temperate pasture grass and legume seedlings. *Aust. J. Plant Physiol.* **26**: 801-809.

Hayes JE, Simpson RJ, Richardson AE. 2000. The growth and phosphorus utilisation of plants in sterile media when supplied with inositol hexaphosphate, glucose 1-phosphate or inorganic phosphate. *Plant Soil* **220**: 165-174.

Haygarth PM, Jarvis SC, Chapman P, Smith RV. 1998. Phosphorus budgets for two contrasting grassland farming systems in the UK. *Soil Use Manag.* **14**: 160-167.

Hammond JP, White PJ. 2008. Sucrose transport in the phloem: integrating root responses to phosphorus starvation. *Journal of experimental botany* **59**: 93-109.

Hammond JP, Bennett MJ, Bowen HC, Broadley MR, Eastwood DC, May ST, Rahn C, Swarup R, Woolaway KE, White PJ. 2003. Changes in gene expression in arabidopsis shoots during phosphate starvation and the potential for developing smart plants. *Plant Physiology* **132**: 578-596.

Hegeman CE, Grabau EA. 2001. A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings. *Plant Physiol.* **126**: 1598-1608.

Hermans C, Hammon JP, White PJ, Verbruggen N. 2006. How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends Plant Sci.* **11**: 610-617.

Hinsinger P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes. a review. *Plant and Soil* **237**: 173-195.

Hirsch J, Misson J, Crisp PA, David P, Bayle V, Estavillo GM, Javot H, Chiarenza S, Mal-lory AC, Maizel A, Declerck M, Pogson BJ, Vaucheret H, Crespi M, Desnos T, Thibaud MC, Nussaume L, Marin E. 2011. A novel fry1 allele reveals the existence of a mutant phenotype unrelated to 5'→3' exoribonuclease (XRN) activities in *Arabidopsis thaliana* roots. *PLoS ONE* **6**, e16724.

Hirsch J, Marin E, Floriani M, Chiarenza S, Richaud P, Nussaume L, et al. 2006. Phosphate deficiency promotes modification of iron distribution in Arabidopsis plants. *Biochimie* **88**: 1767-1771.

Hitz W, Carlson T, Kerr P, Sebastian S. 2002. Biochemical and molecular characterization of a mutation that confers a decreased raffinose and phytic acid phenotype on soybean seeds. *Plant Physiol.* **128**: 650-660.

Ho CH, Lin SH, Hu HC, Tsay YF. 2009. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* **138**: 1184-1194.

Holford I. 1997. Soil phosphorus, its measurements and its uptake by plants. *Aust J Soil Res*, **35**: 227-239.

Hsieh L-C, Lin S-I, Shih AC-C, Chen J-W, Lin W-Y, et al. 2009. Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in Arabidopsis by deep sequencing. *Plant Physiol.* **151**: 2120-2132.

Huang CY, Roessner U, Eickmeier I, Genc Y, Callahan D L, Shirley N, Langridge P and Bacic A. 2008. Metabolite Profiling Reveals Distinct Changes in Carbon and Nitrogen Metabolism in Phosphate-Deficient Barley Plants (*Hordeum vulgare L.*) *Plant Cell Physiol.* **49**: 691-703.

Huang C, Barker SJ, Langridge P, Smith FW, Graham RD. 2000. Zinc deficiency up-regulates expression of high-affinity phosphate transporter genes in both phosphate-sufficient and -deficient barley roots. *Plant Physiology* **124**: 415-422.

Hubel F, Beck E. 1996. Maize root phytase. Purification, characterization, and localization of enzyme activity and its putative substrate. *Plant Physiol* **112**: 1429-1436.

Hurley BA, Tran HT, Marty NJ, Park J, Snedden WA, Mullen RT, Plaxton WC. 2010. The dual-targeted purple acid phosphatase AtPAP26 is essential for efficient acclimation of *Arabidopsis thaliana* to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiology* **153**: 1112-1122.

Hussain D, Haydon MJ, Wang Y, Wong E, Sherson SM, Young J, Camakaris J, Harper JF, Cobbett CS. 2004. P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 1327-1339.

-I-

Idriss EE, Makarewicz O, Farouk A, Rosner K, Greiner R, Bochow H, Richter T, Borriss R. 2002. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth promoting effect. *Microbiology-(UK)* **148**: 2097-2109.

Irvine RF. 2003. 20 years of Ins(1,4,5)P₃, and 40 years before. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**: 586-590.

Irvine RF. 2005. Inositide evolution – towards turtle domination? *Journal of Physiology* **566**: 295-300.

Iwai T, Takahashi M, Oda K, Terada Y, Yoshida KT. 2012. Dynamic Changes in the Distribution of Minerals in Relation to Phytic Acid Accumulation during Rice Seed Development. *Plant Physiology* **160**: 2007-2014.

Iyamuremye F, Dick RP. 1996. Organic amendments and phosphorus sorption by soils. *Adv Agron* **56**:139-185.

-J-

Jain A, Sinilal B, Dhandapani G, Meagher RB, Sahi SV. 2013. Effects of deficiency and excess of zinc on morphophysiological traits and spatiotemporal regulation of zinc-responsive genes reveal incidence of cross talk between micro- and macronutrients. *Environ Sci Technol* **47**: 5327-5335.

Javot H, Pumplin N, Harrison MJ. 2007. Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant Cell Environ* **30**: 310-322.

Jiang CF, Gao X, Liao L, Harberd NP, Fu XD. 2007. Phosphate starvation root architecture and anthocyanin accumulation responses are modulated by the gibberellin–DELLA signaling pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **145**: 1460-1470.

Johnson JF, Vance CP, Allan DL. 1996. Phosphorus deficiency in *Lupinus albus* (altered lateral root development and enhanced expression of phosphoenolpyruvate carboxylase). *Plant Physiology* **112**: 31-41.

Jones DL, Oburger E. 2011. Solubilization of phosphorus by soil microorganisms. In: E.K.Bünemann, A. Oberson, E. Frossard (eds), Phosphorus in action. Biological Processes in Soil Phosphorus, 169-198. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Jones DL. 1998. Organic acids in the rhizosphere : a critical review. *Plant Soil* **205**: 25-44.

-K-

Karner U, Peterbauer T, Raboy V, Jones D, Hedley C, Richter A. 2004. Myo-inositol and sucrose concentrations affect the accumulation of raffinose family oligosaccharides in seeds. *J. Exp. Bot.* **55**: 1981-1987.

Karthikeyan AS, Varadarajan DK, Mukatira UT, D'Urzo MP, Damaz B, Raghothama KG. 2002 . Regulated expression of *Arabidopsis* phosphate transporters. *Plant Physiol.* **130**: 221-233.

Keller R, Brearley CA, Trethewey RN, Muller-Rober B. 1998. Reduced inositol content and altered morphology in transgenic potato plants inhibited for 1D-myo-inositol 3-phosphate synthase. *Plant Journal* **16**: 403-410.

Kerovuo J, Lauraeus M, Nurminen P, Kalkkinen N, Apajalahti J. 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2079-2085.

Kerovuo J, Rouvinen J, Hatzack F. 2000. Analysis of *myo*-inositol hexakisphosphate hydrolysis by *Bacillus phytase*: indication of a novel reaction mechanism. *Biochem J* **352**: 623-628.

Khan GA, Bouraine S, Li Y, Carbonnel M, Berthomieu P, Poirier Y, Rouached H. 2014. Coordination between zinc and phosphate homeostasis involves the transcription factor PHR1, the phosphate exporter PHO1 and its homologue PHO1;H3 in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* doi:10.1093/jxb/ert444

- Kim SI, Tai TH. 2011.** Identification of genes necessary for wild-type levels of seed phytic acid in *Arabidopsis thaliana* using a reverse genetics approach. *Mol Genet Genomics* **286**: 119-133.
- Kim TH, Bohmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI . 2010.** Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 561-591.
- Kim SI, Andaya CB, Goyal SS, Tai TH. 2008a.** The rice OsLpa1 gene encodes a novel protein involved in phytic acid metabolism. *Theor. Appl. Genet.* **117**: 769-779.
- Kim SI, Andaya CB, Newman JW, Goyal SS, Tai TH. 2008b.** Isolation and characterization of a low phytic acid rice mutant reveals a mutation in the rice orthologue of maize MIK. *Theor. Appl. Genet.* **117**: 1291-1301.
- Kim YO, Kim HK, Bae KS, Yu JH, Oh TK. 1998.** Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus sp.* DS11. *Enzyme Microb Technol* **22**: 2-7.
- Klein M, Perfus-Barbeoch L, Frelet A, Gaedeke N, Reinhardt D, Mueller-Roeber B, Martinoia E, Forestier C. 2003.** The plant multidrug resistance ABC transporter AtMRP5 is involved in guard cell hormonal signalling and water use. *Plant Journal* **33**: 119-129.
- Kohlen W, Charnikhova T, Liu Q, Bours R, Domagalska MA, Beguerie S, Verstappen F, Leyser O, Bouwmeester H, Ruyter-Spira C. 2011.** Strigolactones are transported through the xylem and play a key role in shoot architectural response to phosphate deficiency in nonarbuscular mycorrhizal host *Arabidopsis*. *Plant physiology* **155**: 974-87.
- Koltai H. 2013.** Strigolactones activate different hormonal pathways for regulation of root development in response to phosphate growth conditions. *Ann Bot* **112**: 409-415.
- Konietzny U, Greiner R. 2004.** Bacterial phytase: potential application, in vivo function and regulation of its synthesis. *Brazilian J Microbiol* **35**:11-18.
- Koyama T, Ono T, Shimizu M, Jinbo T, Mizuno R, Tomita K, Mit-sukawa N, Kawazu T, Kimura T, Ohmiya K, Sakka K. 2005.** Promoter of *Arabidopsis thaliana* phosphate transporter gene drives root-specific expression of transgene in rice. *J. Biosci. Bioeng.* **99**: 38-42.
- Kuang R, Chan KH, Yeung E, Lim BL. 2009.** Molecular and Biochemical Characterization of AtPAP15, a Purple Acid Phosphatase with Phytase Activity, in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **151**: 199-209.
- Kuo HF, Chiou TJ. 2011.** The Role of MicroRNAs in Phosphorus Deficiency Signaling *Plant Physiology* **156**: 1016-1024.
- Kuwano M, Mimura T, Takaiwa F, Yoshida KT. 2009.** Generation of stable 'low phytic acid' transgenic rice through antisense repression of the 1D-myo-inositol 3-phosphate synthase gene (RINO1) using the 18-kDa oleosin promoter. *Plant Biotech. J.* **7**: 96-105.

Kuwano M, Ohyama A, Tanaka Y, Mimura T, Takaiwa F, Yoshida KT. 2006. Molecular breeding for transgenic rice with low phytic acid phenotype through manipulating myo inositol 3 phosphate synthase gene. *Mol. Breeding* **18**: 263-272.

-L-

Laing W, Bulley S, Wright M, Cooney J, Jensen D, Barraclough D, MacRae E. 2004. A highly specific L-galactose-1-phosphate phosphatase on the path to ascorbate biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 16976-16981.

Lambers H, Shane MW, Cramer MD, Pearse SJ, Veneklaas EJ. 2006. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. *Annals of Botany* **98**: 693-713.

Lanquar V, Lelievre F, Bolte S, et al. 2005. Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO Journal* **24**: 4041-4051.

Larson S, Rutger J, Young K, Raboy V. 2000. Isolation and genetic mapping of a non-lethal rice (*Oryza sativa* L.) low phytic acid 1 mutation. *Crop Sci.* **40**: 1397-1405.

Latta M, Eskin M. 1980. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *J Agric Food Chem* **28**: 1313-1315.

Leggewie G, Willmitzer L, Riesmeier JW. 1997. Two cDNAs from potato are able to complement a phosphate uptake-deficient yeast mutant: identification of phosphate transporters from higher plants. *The Plant Cell* **9**: 381-392.

Lei X, Weaver J, Mullaney E, Ullah A, Azain M. 2013. Phytase, a new life for an old enzyme. *Ann. Rev. Ani. Bios.* **1**: 283-309.

Lei MG, Zhu CM, Liu YD, et al. 2011. Ethylene signalling is involved in regulation of phosphate starvation-induced gene expression and production of acid phosphatases and anthocyanin in *Arabidopsis*. *New Phytologist* **189**: 1084-1095.

Lei XG, Porres JM, Mullaney EJ, Brinch-Pedersen H. 2007. Phytase: source, structure and application. In *Industrial Enzymes* (Polaina, J. and MacCabe, A.P., eds), pp. 505-529. Dordrecht, The Netherlands: Springer.

Lei XG, Porres JM. 2003. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotech Lett* **25**: 1787-1794.

Lemtiri-Chlieh F, MacRobbie E, Webb A, Manison N, Brownlee C, Skepper J, Chen J, Prestwich G, Brearley C. 2003. Inositol hexakisphosphate mobilizes an endomembrane store of calcium in guard cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 10091-10095.

Lemtiri-Chlieh F, MacRobbie E, Brearley C. 2000. Inositol hexakisphosphate is a physiological signal regulating the K⁺-inward rectifying conductance in guard cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 8687-8692.

- Letcher AJ, Schell MJ, Irvine RF. 2008.** Do mammals make all their own inositol hexakisphosphate? *Biochemical Journal* **416**: 263-270.
- Lee Y, Choi YB, Suh S, Lee J, Assmann SM, Joe CO, Kelleher JF, Crain RC. 1996.** Abscisic Acid-Induced Phosphoinositide Turnover in Guard Cell Protoplasts of *Vicia faba*. *Plant Physiology* **110**: 987-996.
- Li Z, Xu C, Li K, Yan S, Qu X, Zhang J. 2012.** Phosphate starvation of maize inhibits lateral root formation and alters gene expression in the lateral root primordium zone. *BMC Plant Biol* **12**: 89.
- Li WF, Perry PJ, Prafulla NN, Schmidt W. 2010.** Ubiquitin-specific protease 14 (UBP14) is involved in root responses to phosphate deficiency in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* **3**: 212-223.
- Li X, Liu Z, Chi Z, Li J, Wang X. 2009a.** Molecular cloning, characterization, and expression of the phytase gene from marine yeast *Kodamaea ohmeri* BG3. *Mycological research*, **113**: 24-32.
- Li G, Yang S, Li M, Qiao Y, Wang J. 2009b.** Functional analysis of an *Aspergillus ficuum* phytase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its root-specific, secretory expression in transgenic soybean plants. *Biotechnol Lett* **31**: 1297-1303.
- Li D, Zhu H, Liu K, Liu X, Leggewie G, Udvardi M, Wang D. 2002.** Purple acid phosphatases of *Arabidopsis thaliana* comparative analysis and differential regulation by phosphate deprivation. *J Biol Chem* **277**: 27772-27781.
- Li H, Xia M, Wu P. 2000.** Effect of phosphorus deficiency stress on ricelateral root growth and nutrient absorption. *Acta Bot Sin* **43**: 1154-1160
- Li M, Osaki M, Madhusudana Rao I, Tadano T. 1997.** Secretion of phytase from the roots of several plant species under phosphorus-deficient conditions. *Plant Soil* **195**: 161-169.
- Lin SI, Chiang SF, Lin WY, Chen JW, Tseng CY, Wu PC, Chiou TJ. 2008.** Regulatory network of microRNA399 and PHO2 by systemic signaling. *Plant physiology* **147**: 732-746.
- Lin WY, Huang TK, Chiou TJ (2013)** NITROGEN LIMITATION ADAPTATION, a target of microRNA827: Mediates degradation of plasma membrane- localized phosphate transporters to maintain phosphate homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**: 4061-4074.
- Lin WY, Huang TK, Leong SJ, Chiou TJ. 2014.** Long-distance call from phosphate: systemic regulation of phosphate starvation responses. *Journal of Experimental Botany* **65**: 1817-1827.
- Linkohr BI, Williamson LC, Fitter AH, Leyser HMO. 2002.** Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **29**: 751-60.
- Lisko KA, Torres R, Harris RS, Belisle M, Vaughan M M, Jullian B, Chevone B I, Mendes P, Nessler CL, Lorence A. 2013.** Elevating vitamin C content via overexpression of myo -inositol oxygenase and L -gulono-1,4-lactone oxidase in *Arabidopsis* leads to

enhanced biomass and tolerance to abiotic stresses. *In Vitro Cell. Dev.Biol. Plant* DOI 10.1007/s11627-013-9568-y.

Liu TY, Huang TK, Tseng CY, Lai YS, Lin SI, Lin WY, Chen JW, Chiou TJ. 2012. PHO2-dependent degradation of PHO1 modulates phosphate homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **24**: 2168-2183.

Liu TY, Aung K, Tseng CY, Chang TY, Chen YS, Chiou TJ. 2011. Vacuolar $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ transport activity is required for systemic phosphate homeostasis involving shoot-to-root signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **156**: 1176-1189.

Liu Z, Wang H, Wang X, Zhang G, Chen P, Liu D. 2006. Genotypic and spike positional difference in grain phytase activity, phytate, inorganic phosphorus, iron, and zinc contents in wheat (*Triticum aestivum* L.) *J Cereal Sci.* **44**: 212-219.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods* **25**: 402-408.

Lloyd JC, Zakhleniuk OV. 2004. Responses of primary and secondary metabolism to sugar accumulation revealed by microarray expression analysis of the *Arabidopsis* mutant, *pho3*. *Journal of experimental botany* **55**: 1221-30.

Loewus FA, Loewus MW. 1983. *myo*-inositol: its biosynthesis and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol* **34**: 137-161.

Loewus FA, Murthy PPN. 2000. *Myo*-Inositol metabolism in plants. *Plant Sci.* **150**: 1-19.

Loneragan J, Grunes D, Welch R, Aduayi E, Tengah A, Lazar V, Cary E. 1982. Phosphorus accumulation and toxicity in leaves in relation to zinc supply. *Soil Sci Soc Am J* **46**: 345-352.

López-Bucio J, Hernández-Abreu E, Sánchez-Calderón L, et al. 2005. An auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress-induced root architectural alterations in *Arabidopsis*. Identification of BIG as a mediator of auxin in pericycle cell activation. *Plant Physiology* **137**: 681-691.

López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 280-287.

López-Bucio J, Hernandez-Abreu E, Sanchez-Calderon L, Nieto-Jacobo MF, Simpson J, Herrera-Estrella L. 2002. Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* Root System. *Plant Physiology* **129**: 244-256.

López-Bucio J, De La Vega OM, Guevara-García A, Herrera-Estrella L. 2000. Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. *Nat Biotechnol* **18**: 450-453.

Lorence A, Chevone BI, Mendes P, Nessler CL. 2004. *myo*-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiology* **134**: 1200-1205.

Lucca P, Hurrell R, Potrykus I. 2001. Genetic engineering approaches to improve the bioavailability and the level of iron in rice grains. *Theor. Appl. Genet.* **102**: 392-397.

Luck H. 1965. Catalase. In: *Methods of Enzymatic Assays.* (Ed.): H.U. Bergmeyer. New York, Academic Press. pp. 885-894.

Lundmark M, Korner CJ, Nielsen TH. 2010. Global analysis of microRNA in *Arabidopsis* in response to phosphate starvation as studied by locked nucleic acid-based microarrays. *Physiologia plantarum* **140**: 57-68.

Lung SC, Leung A, Kuang R, Wang Y, Leung P, Lim BL. 2008. Phytase activity in tobacco (*Nicotiana tabacum*) root exudates is exhibited by a purple acid phosphatase. *Phytochemistry* **69**: 365-373.

Lung SC, Chan W-L, Yip W, Wang L, Yeung E, Lim B. 2005. Secretion of beta-propeller phytase from tobacco and *Arabidopsis* roots enhances phosphorus utilisation. *Plant Sci.* **169**: 341-349.

Luo H, Huang H, Yang P, Wang Y, yuan T, Wu N, Yao B, Fan Y. 2007. A Novel Phytase appA from *Citrobacter amalonaticus* CGMCC 1696 : Gene Cloning and Overexpression in *Pichia pastoris*. *Curr Microbiol* **55**: 185-192.

Lynch JP, Brown KM. 2008. Root strategies for phosphorus acquisition. In PJ White, JP Hammond, eds, *The Ecophysiology of Plant-Phosphorus Interactions.* Springer, Dordrecht, The Netherlands pp 83-116.

-M-

Ma ZY, PU SC, Jiang JJ, Huang BO, Fan MZ, Li ZZ. 2010. A novel thermostable phytase from the fungus *Aspergillus aculeatus* RCEF 4894 : gene cloning and expression in *Pichia pastoris*. *J Microbiol Biotechnol.* **27**: 696- 686.

Ma X-F, Wright E, Yaxin GE, Bell J, Yajun XI, Bouton JH, Wang Z-Y. 2009. Improving phosphorus acquisition of white clover (*Trifolium repens* L.) by transgenic expression of plant-derived phytase and acid phosphatase genes. *Plant Sc.***176**: 479-488.

Ma Z, Bielenberg DG, Brown KM, Lynch JP. 2001a. Regulation of root hair density by phosphorus availability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* **24**: 459-467.

Maddaiah VT, Kurnick AA, Reid BL. 1964. Phytic acid studies. *Proc Soc Exp Biol Med* **115**: 391-393.

Maga JA. 1982. Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **30**: 1-9.

Majee M, Maitra S, Dastidar KG, Pattnaik S, Chatterjee A, Hait NC, Das KP, Majumder AL. 2004. A novel salt-tolerant L-*myo*-inositol-1-phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka, a halophytic wild rice: Molecular cloning, bacterial overexpression, characterization, and functional introgression into tobacco-conferring salt tolerance phenotype. *J. Biol. Chem.* **279**: 28539-28552.

- Maldonado-Mendoza I, Dewbre GR, Harrison MJ. 2001.** A phosphate transporter gene from the extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Mol Plant-Microb Interact* **14**: 1140-1148.
- Marchive C, Yehudai-Resheff S, Germain A, et al. 2009.** Abnormal physiological and molecular mutant phenotypes link chloroplast polynucleotide phosphorylase to the phosphorus deprivation response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **151**: 905-924.
- Marschner H. 1995.** Mineral nutrition in higher plants. *Academic Press, London*.
- Marschner H, Romheld V, Horst WJ, Martin P. 1989.** Root-induced changes in the rhizosphere: importance for the mineral nutrition of plants. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, **149**: 441-456.
- Martinez P, Persson B. 1998.** Identification, cloning and characterization of a derepressible Na⁺-coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **258**:628-638.
- Mathan KK, Amberger A. 1977.** Influence of iron on the uptake of phosphorus by maize. *Plant Soil* **48**: 413-422.
- Mäser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirschi K, Sze H, Talke IN, Amtmann A, Maathuis FJ, Sanders D, Harper JF, Tchieu J, Gribskov M, Persans MW, Salt DE, Kim SA, Guerinot ML. 2001.** Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **126**: 1646-1667.
- Mayzlish-Gati E, De Cuyper C, Goormachtig S, Beeckman T, Vuylsteke M, Brewer PB, Beveridge CA, Yermiyahu U, Kaplan Y, Enzer Y, Winer S, Resnick N, Cohen M, Kapulnik Y, Koltai H . 2012.** Strigolactones are involved in root response to low phosphate conditions in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **160**: 1329-1341.
- McKercher R, Anderson G. 1989.** Organic phosphate sorption by neutral and basic soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **20**, 723-732.
- Meijer HJG, Divecha N, van den Ende H, Musgrave A, Munnik T. 1999.** Hyperosmotic stress induces rapid synthesis of phosphatidyl-D-inositol 3,5 bisphosphate in plant cells. *Planta* **208**: 294-298.
- Meis SJ, Fehr WR, Schnebly SR. 2003.** Seed source effect on field emergence of soybean lines with reduced phytate and raffinose saccharides. *Crop Science* **43**: 1336-1339.
- Meng PH, Raynaud C, Tcherkez G, Blanchet S, Massoud K, Domenichini S, Henry Y, Soubigou-Taconnat L, Lelarge-Trouverie C, Saindrenan P et al. 2009.** Crosstalks between Myo-inositol metabolism, programmed cell death and basal immunity in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* **4**: e7364.
- Michell RH. 2008.** Inositol derivatives: Evolution and functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**: 151-161.

Miles DM, Sistani KR. 2002. Broiler phosphorus intake versus broiler phosphorus output in the United State: nutrition or soil science? *World's Poultry Science Journal* **58**: 493-500.

Misson J, Raghothama KG, Jain A, Jouhet J, Block MA, Bligny R, Ortet P, Creff A, Somerville S, Rolland N, Doumas P, Nacry P, Herrera-Estrella L, Nussaume L, Thibaud M-C. 2005. A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**: 11934-11939.

Misson J, Thibaud MC, Bechtold N, Raghothama K, Nussaume L. 2004. Transcriptional regulation and functional properties of *Arabidopsis* Pht1;4, a high affinity transporter contributing greatly to phosphate uptake in phosphate deprived plants. *Plant Mol. Biol.* **55**: 727-741.

Mittler R. 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci.* **11**: 15-9.

Mitsukawa N, Okumura S, Shirano Y, Sato S, Kato T, Harashima S, Shibata D. 1997. Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* high-affinity phosphate transporter gene in tobacco cultured cells enhances cell growth under phosphate-limited conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **94**: 7098-7102.

Miura K, Rus A, Sharkhuu A, et al. 2005. The *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **102**: 7760-7765.

Miura K, Lee J, Gong QQ, et al. 2011. SIZ1 regulation of phosphate starvation-induced root architecture remodeling involves the control of auxin accumulation. *Plant Physiology* **155**: 1000-1012.

Morcuende R, Bari R, Gibon Y, Zheng W, Pant BD, Blasing O, Usadel B, Czechowski T, Udvardi MK, Stitt M, Scheible WR. 2007. Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of *Arabidopsis* in response to phosphorus. *Plant Cell Environ.* **30**: 85-112.

Muchhal US, Pardo JM, Raghothama KG. 1996. Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 10519-10523.

Muchhal US, Liu C, Raghothama K. 1997. Ca²⁺-ATPase is expressed differentially in phosphate-starved roots of tomato. *Physiol Plant* **101**: 540-544.

Mudge SR, Smith FW, Richardson AE. 2003. Root-specific and phosphate-regulated expression of phytase under the control of a phosphate transporter promoter enables *Arabidopsis* to grow on phytate as a sole P source. *Plant Sci.* **165**: 871-878.

Mudge SR, Rae AL, Diatloff E, Smith FW. 2002. Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. *Plant J.* **31**: 341-353.

Mullaney EJ, Ullah AH. 2007. Phytases: Attributes, catalytic mechanisms and applications: In *Inositol Phosphates: Linking Agriculture and the Environment*. Turner, B.L., Richardson, A.E., Mullaney, E.J., Eds.; CABI: Wallingford, UK; pp. 97-110.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.

Murphy AM, Otto B, Brearley CA, Carr JP, Hanke DE. 2008. A role for inositol hexakisphosphate in the maintenance of basal resistance to plant pathogens. *Plant Journal* **56**: 638-652.

Munnik T, Vermeer JEM. 2010. Osmotic stress-induced phosphoinositide and inositolphosphate signalling in plants. *Plant Cell and Environment* **33**: 655-669.

Munnik T, Testerink C. 2009. Plant phospholipid signaling: "in a nutshell". *Journal of Lipid Research* **50**: 260-265.

Munnik T. 2014. PI-PLC: Phosphoinositide-Phospholipase C in Plant Signaling. *Plants* 20 DOI 10.1007/978-3-642-42011-5_2, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Muller R, Morant M, Jarmer H, Nilsson L, Nielsen TH. 2007. Genome-wide analysis of the Arabidopsis leaf transcriptome reveals interaction of phosphate and sugar metabolism. *Plant Physiology* **143**: 156-171.

Murshed R, Lopez-Lauri F, Sallanon H. 2008. Microplate quantification of enzymes of the plant ascorbate-glutathione cycle. *Analytical Biochemistry*. 320-322.

-N-

Nacry P, Canivenc G, Muller B, Azmi A, Onckelen HV, Rossignol M et al. (2005). A Role for auxin redistribution in the responses of the root system architecture to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **138**: 2061-2074.

Nagarajan VK, Smith AP. 2012. Ethylene's role in phosphate starvation signaling: More than just a root growth regulator. *Plant Cell Physiol* **53**: 277-286.

Nagarajan VK, Jain A, Poling MD, Lewis AJ, Raghothama KG, Smith AP. 2011. *Arabidopsis* Pht1;5 mobilizes phosphate between source and sink organs and influences the interaction between phosphate homeostasis and ethylene signaling. *Plant Physiology* **156**: 1149-1163.

Nagy R, Grob H, Weder B, Green P, Klein M, Frelet-Barrand A, Schjoerring J, Brearley C, Martinoia E. 2009. The *Arabidopsis* ATP-binding cassette protein AtMRP5/AtABCC5 is a high affinity inositol hexakisphosphate transporter involved in guard cell signaling and phytate storage. *J. Biol. Chem.* **284**: 33614-33622.

Naidoo R, Tongoona P, Derera J, Laing M, Watson G. 2012. Combining ability of low phytic acid (*lpa1-1*) and quality protein maize (qpm) lines for seed germination and vigour under stress and non-stress conditions. *Euphytica* **185**: 529-541.

Nakamura Y, et al. 2005. A novel phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C induced by phosphate starvation in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **280**: 7469-7476.

Nannipieri P, Giagnoni L, Landi L, Renella R. 2011. Role of Phosphatase Enzymes in Soil. In: E. Bünemann , A. Oberson , E. Frossard (eds), *Phosphorus in Action: Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling*, 215-244. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Nilsson L, Muller R, Nielsen TH. 2010. Dissecting the plant transcriptome and the regulatory responses to phosphate deprivation. *Physiologia Plantarum* **139**: 129-143.

Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S. 2008. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology* **147**: 1251-1263.

Niu YF, Chai RS, Jin GL, Wang H, Tang CX, Zhang YS. 2013. Responses of root architecture development to low phosphorus availability: a review. *Annals of botany* **112**: 391-408.

Nixon SW. 1995. Coastal marine eutrophication: A definition, causes, and future concerns. *Ophelia* **41**: 199-219.

Noctor G. 2006. Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant, Cell and Environment* **29**: 409-425.

[NRC] National Research Council. 1992. Restoration of aquatic ecosystems: Science, technology, and public policy. Washington (DC): National Academy Press.

Nunes A, Vianna G, Cuneo F, Amaya-Farfan J, de Capdeville G, Rech E, Aragao F. 2006. RNAi-mediated silencing of the *myo*-inositol-1-phosphate synthase gene (*GmMIP51*) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content. *Planta* **224**: 125-132.

Nussaume L, Kanno S, Javot H, Marin E, Pochon N, Ayadi A, Nakanishi TM, Thibaud MC. 2011. Phosphate Import in Plants: Focus on the PHT1 Transporters. *Frontiers in plant science* **2**: 83.

Nys Y, Frapin D, Pointillart A. 1996. Occurrence of phytase in plants, animals microorganisms. In: Coelho MB, Kornegay ET, editors. *Phytase in Animal Nutrition and Waste Management*. Mount Olive, NJ: BASF Corporation. 213-226.

-O-

O'Dell BL, de Boland AR, Koirtyohann ST. 1972. Distribution of phytate and nutritionally important elements among the morphological components of cereal grains. *J. Agric. Food Chem.* **20**: 718-721.

Oh BC, Chang BS, Park KH, Ha NC, Kim HK, Oh BH, et al. 2001. Calcium-dependent catalytic activity of a novel phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* DS11. *Biochemistry.* **40**: 9669-9676.

Okumura S, Mitsukawa N, Shirano Y, Shibata D. 1998. Phosphate Transporter Gene Family of *Arabidopsis thaliana*. *DNA RESEARCH* **5**: 261-269 .

Okamura M. 1980. AN IMPROVED METHOD FOR DETERMINATION OF L-ASCORBIC ACID AND L-DEHYDROASCORBIC ACID IN BLOOD PLASMA. *Clinica Chimica Acta*, **103**: 259-268.

Osmont KS, Sibout R, Hardtke CS. 2007. Hidden branches: developments in root system architecture. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 93-113.

Otegui M, Capp R, Staehelin L. 2002. Developing seeds of *Arabidopsis* store different minerals in two types of vacuoles and in the endoplasmic reticulum. *Plant Cell* **14**. 1311-1327.

-P-

Pant BD, Musialak-Lange M, Nuc P, May P, Buhtz A, Kehr J, Walther D, Scheible W-R. 2009. Identification of nutrient-responsive *Arabidopsis* and rapeseed microRNAs by comprehensive real-time polymerase chain reaction profiling and small RNA sequencing. *Plant physiology* **150**: 1541-55.

Panzeri D, Cassani E, Doria E, Tagliabue G, Forti L, Campion B, Bollini R, Brearley CA, Pilu R, Nielsen E, Sparvoli F. 2011. A defective ABC transporter of the MRP family, responsible for the bean *lpa1* mutation, affects the regulation of the phytic acid pathway, reduces seed *myo*-inositol and alters ABA sensitivity. *New Phytologist* **191**: 70-83.

Parent LE. 2002. Le flux et la dynamique du phosphore dans les sols agricoles québécois. Colloque sur le phosphore - *Ordre des agronomes du Québec, Drummondville*.

Parra MAM. 2001. Les phytases : structure, caractérisation et applications. *123 bio.net. Biologie et Recherche*. Université de Genève- Faculté des Sciences- Département de Chimie Organique- Genève-Suisse.

Pasamontes L, Haiker M, Wyss M, Tessier M, Van Loon AP. 1997. Gene cloning, purification, and characterization of heatstable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol.* **63**: 1696-1700.

Péret B, Desnos T, Jost R, Kanno S, Berkowitz O, Nussaume L. 2014. Root Architecture Responses: In Search of Phosphate. *Plant Physiology* **166**: 1713-1723.

Péret B, Clément M, Nussaume L, Desnos T. 2011. Root developmental adaptation to phosphate starvation: better safe than sorry. *Trends in Plant Science.* **16**: 442-450

Péret B, Svistoonoff S, Laplaze L. 2009. When plants socialize: symbioses and root development. *Annu. Plant Rev.* **37**: 209-238.

Pérez-Torres CA, López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Ibarra-Laclette E, Dharmasiri S, Estelle M, Herrera-Estrella L. 2008. Phosphate availability alters lateral root development in *Arabidopsis* by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor. *Plant Cell* **20**: 3258-3272

Pen J, Verwoerd TC, Paridon PA, Beudeker RF, van den Elzen PJM, Geerse K, van der Klis JD, Versteegh HAJ, van Ooyen AJJ, Hoekema A. 1993. Phytase-containing

transgenic seeds as a novel feed additive for improved phosphorus utilization. *Nat Biotechnol*, **11**: 811-814.

Persson BL, Jens O, Lagerstedt JO, Pratt JR, Pattison-Granberg J, Lundh K, Shokrollahzadeh S, Lundh F. 2003. Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* **43**: 225-244.

Persson H, Turk M, Nyman M, Sandberg AS. 1998. Binding of Cu²⁺, Zn²⁺, and Cd²⁺ to inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates. *J Agric Food Chem* **46**: 3194-3200.

Piddington CS, Houston CS, Paloheimo M, Cantrell M, Miettinen-Oinonen A, Nevalainen H, Rambosek J. 1993. The cloning and sequencing of the genes encoding phytase (phy) and pH 2.5- optimum acid phosphatase (aph) from *Aspergillus niger* var. awamori. *Gene* **133**: 55-62.

Petit JM, Briat JF, Lobréaux S. 2001. Structure and differential expression of the four members of the *Arabidopsis thaliana* ferritin gene family. *Biochem J*. **359** : 575-582.

Pilu R, Landoni M, Cassani E, Doria E, Nielsen E. 2005. The maize lpa241 mutation causes a remarkable variability of expression and some pleiotropic effects. *Crop Science* **45**: 2096-2105.

Pilu R, Panzeri D, Gavazzi G, Rasmussen SK, Consonni G, Nielsen E. 2003. Phenotypic, genetic and molecular characterization of a maize low phytic acid mutant (*lpa241*). *TheorAppl. Genet.* **107**: 980-987.

Plassard C, Robin A, Le Cadre E, Marsden C, Trap J, Herrmann L, Waithaisong K, Lesueur D, Blanchart E, Chapuis-Lardy L, Hinsinger P. 2015. Améliorer la biodisponibilité du phosphore : comment valoriser les compétences des plantes et les mécanismes biologiques du sol ? *Innovations Agronomiques* **43**: 115-138.

Poirier Y, Bucher M. 2002. Phosphate transport and homeostasis in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* **1**: e0024.

Poirier Y, Thoma S, Somerville C, Schiefelbein J. 1991. Mutant of *Arabidopsis* deficient in xylem loading of phosphate. *Plant Physiology* **97**: 1087-1093.

Ponstein A, Bade J, Verwoerd T, Molendijk L, Storms J, Beudeker R, Pen J. 2002. Stable expression of phytase (phyA) in canola (*Brassica napus*) seeds: towards a commercial product. *Mol Breed.* **10**: 31-44.

Popova Y, Thayumanavan P, Lonati E, Agrochão M, Thevelein JM. 2010. Transport and signaling through the phosphate-binding site of the yeast Pho84 phosphate transceptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 2890-2895.

-R-

Raboy V. 2009. Approaches and challenges to engineering seed phytate and total phosphorus. *Plant Sci.* **177**: 281-296.

Raboy V. 2003. Myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochemistry* **64**: 1033-1043.

Raboy V, Gerbasi PF, Young KA, Stoneberg SD, Pickett SG, Bauman AT, Murthy PPN, Sheridan WF, Ertl DS. 2000. Origin and seed phenotype of maize low phytic acid 1-1 and low phytic acid 2-1. *Plant Physiol.* **124:** 355-368.

Raboy V. 2001. Seeds for a better future: “Low phytate” grains help to overcome malnutrition and reduce pollution. *Trends Plant Sci* **6:** 458-462.

Raghothama K G, Karthikeyan AS. 2005. Phosphate acquisition. *Plant Soil* **274:** 37-49.

Raghothama KG. 1999. Phosphate acquisition. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50:** 665-693.

Rausch C, Bucher M. 2002. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta* **216:** 23-37.

Reddy NR, Sathe SK, editors 2002. Food Phytate. NY, Washington D. C. CRC press. 258 p.

Reymond M, Svistoonoff S, Loudet O, Nussaume L, Desnos T. 2006. Identification of QTL controlling root growth response to phosphate starvation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **29:** 115-125.

Ribot C, Wang Y, Poirier Y. 2008. Expression analyses of three members of the AtPHO1 family reveal differential interactions between signaling pathways involved in phosphate deficiency and the responses to auxin, cytokinin, and abscisic acid. *Planta* **227:** 1025-1036.

Richardson AE, Barea JM, McNeill AM, Prigent-Combaret C. 2009a. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* **321:** 305-339.

Richardson AE, Hadobas PA, Hayes JE. 2001. Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. *Plant Journal* **25:** 641-649.

Richardson AE, Hadobas PA, Hayes JE. 2000. Acid Phosphomonoesterase and phytase activities of wheat (*Triticum aestivum* L) roots and utilization of organic phosphorus substrates by seedlings grown in sterile culture. *Plant Cell Environ.* **23:** 397-405.

Robinson WD, Park J, Tran HT, Del Vecchio HA, Ying S, Zins JL, Patel K, McKnight TD, Plaxton WC. 2012. The secreted purple acid phosphatase isozymes AtPAP12 and AtPAP26 play a pivotal role in extracellular phosphate scavenging by *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **18:** 6531-6542.

Rouached H, Secco D, Arpat AB, Poirier Y. 2011a. The transcription factor PHR1 plays a key role in the regulation of sulfate shoot-to-root flux upon phosphate starvation in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* 11:19. doi: 10.1186/1471-2229-11-19

Rouached H, Wirtz M, Alary R, Hell R, Arpat AB, Davidian JC, et al. 2008. Differential regulation of the expression of two high-affinity sulfate transporters, SULTR1.1 and SULTR1.2, in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **147:** 897-911.

Roschzttardt H, Conejero G, Curie C, Mari S. 2009. Identification of the endodermal vacuole as the iron storage compartment in the *Arabidopsis* embryo. *Plant Physiol.* **151:** 1329-1338.

Rubio V, Linhares F, Solano R, Martín AC, Iglesias J, Leyva A, Paz-Ares J. 2001. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev* **15:** 2122-2133

Rubio V, Bustos R, Mari'a Luisa Irigoyen, Cardona-Lo'pez X , Rojas-Triana M , Paz-Ares J. 2008. Plant hormones and nutrient signaling. *Plant Mol Biol* DOI 10.1007/s11103-008-9380-y

-S-

Sánchez-Calderón L, López-Bucio J, Chacón-López A, Gutiérrez-Ortega A, Hernández Abreu E, Herrera-Estrella L. 2006. Characterization of low phosphorus insensitive mutants reveals a crosstalk between low phosphorus-induced determinate root development and the activation of genes involved in the adaptation of *Arabidopsis* to phosphorus deficiency. *Plant Physiology* **140:** 879-889.

Sajidan A, Farouk A, Greiner R, Jungblut P, Müller EC, Borriss R. 2004. Molecular and physiological characterisation of a 3-phytase from soil bacterium *Klebsiella* sp. ASR1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65:** 110-118.

Sakamoto, K., Vucenik, I. et Shamsuddin A.M. 1992. [³H] phytic acid (inositol hexaphosphate) is absorbed and distributed to various tissues in rats. *J Nutr.* **123:** 713-720.

Sambrook JE, Fritsh EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *74:* 5463-5467.

Schmidt W. 2001. From faith to fate: ethylene signaling in morphogenic responses to P and Fe deficiency. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **164:** 147-154.

Scott JJ, Leowus FA. 1986. Calcium activated phytase from pollen of *Lilium longiflorum*. *Plant Physiol.* **82:** 333-335.

Schünmann PHD, Richardson AE, Smith FW, Delhaize E. 2004. Characterization of promoter expression patterns derived from the Pht1 phosphate transporter genes of barley (*Hordeum vulgare* L.) *J Exp Bot* **55:** 855-865.

Shane M, Lambers H. 2005. Cluster roots: a curiosity in context. *Plant and Soil* **274:** 101-125.

Sheard LB, Tan X, Mao H, Withers J, Ben-Nissan G, Hinds TR, Kobayashi Y, Hsu FF, Sharon M, Browse J, He SY, Rizo J, Howe GA, Zheng N. 2010. Jasmonate perception by inositolphosphate- potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* **468:** 400-405.

Shears SB. 2009. Diphosphoinositol polyphosphates: Metabolic messengers? *Mol Pharmacol* **76:** 236-252.

- Shears S. 2001.** Assessing the omnipotence of inositol hexakisphosphate. *Cell Signal.* **13**:151-158.
- Shen X, Xiao H, Ranallo R, Wu WH, Wu C. 2003.** Modulation of ATP-dependent chromatin-remodeling complexes by inositol polyphosphates. *Science* **299**: 112-114.
- Shi J, Wang H, Schellin K, Li B, Faller M, Stoop J M. et al. 2007.** Embryo-specific silencing of a transporter reduces phytic acid content of maize and soybean seeds. *Nat Biotechnol.* **25**: 930-937.
- Shi J, Wang H, Hazebroek J, Ertl D, Harp T. 2005.** The maize *low-phytic acid 3* encodes a *myo*-inositol kinase that plays a role in phytic acid biosynthesis in developing seeds. *Plant J.* **42**: 708-719.
- Shi J, Wang H, Wu Y, Hazebroek J, Meeley R, Ertl D. 2003.** The maize low-phytic acid mutant *Ipa2* is caused by mutation in an inositol phosphate kinase gene. *Plant Physiol.* **131**: 507-515.
- Shin H, Shin HS, Chen R, Harrison MJ. 2006.** Loss of At4 function impacts phosphate distribution between the roots and the shoots during phosphate starvation. *Plant J* **45**: 712-726.
- Shin H, Shin HS, Dewbre GR, Harrison MJ. 2004.** Phosphate transport in Arabidopsis: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. *Plant J.* **39**: 629-642.
- Shu LZ, Shen JB, Rengel Z, Tang CX, Zhang FS. 2005.** Growth medium and phosphorus supply affect cluster root formation and citrate exudation by *Lupinus albus* grown in a sand/solution split-root system. *Plant and Soil* **276**: 85-94.
- Shukla S, VanToai T, Pratt R. 2004.** Expression and nucleotide sequence of an ins (3) p-1 synthase gene associated with low-phytate kernels in maize (*Zea mays* L.). *J. Agric. Food Chem* **52**. 4565-4570.
- Simons PCM, Versteegh HAJ, Jongbloed AW, Kemme PA, Slump P, Bos KD, Wolters MGE, Beudeker RF, Verschoor GJ. 1990.** Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. *British Journal of Nutrition*, **64**: 525-540.
- Skene KR. 2000.** Pattern formation in cluster roots. Some developmental and evolutionary considerations. *Annals of Botany* **85**: 901-908.
- Smith SE, Smith FA. 2011.** Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual review of plant biology*, **62**: 227-250.
- Smith SE, Read DJ. 2008.** Mycorrhizal Symbiosis, Ed 3. *Elsevier and Academic, New York*, p 800.
- Sparvoli F, Cominelli E. 2015.** Seed Biofortification and Phytic Acid Reduction: A Conflict of Interest for the Plant? *Plants* **4**: 728-755.

Spohn M, Kuzyakov Y. 2013. Distribution of microbial- and root-derived phosphatase activities in the rhizosphere depending on P availability and C allocation - Coupling soil zymography with C¹⁴ imaging. *Soil Biology and Biochemistry* **67**: 106-113.

Stefanovic A, Ribot C, Rouached H, Wang Y, Chong J, Belbahri L, Delessert S, Poirier Y. 2007. Members of the PHO1 gene family show limited functional redundancy in phosphate transfer to the shoot, and are regulated by phosphate deficiency via distinct pathways. *Plant J.* **50**: 982-994.

Steger D, Haswell E, Miller A, Went S, O'Shea E. 2003. Regulation of chromatin remodeling by inositol polyphosphates. *Science* **299**: 114-116.

Stepanova AN, Alonso JM. 2009. Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 548-555.

Stevenson-Paulik J, Bastidas RJ, Chiou ST, Frye RA, York JD. 2005. Generation of phytate-free seeds in *Arabidopsis* through disruption of inositol polyphosphate kinases. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **102**: 12612-12617.

Sugimoto K, Sato N, Tsuzuki M. 2007. Utilization of a chloroplast membrane sulfolipid as a major internal sulfur source for protein synthesis in the early phase of sulfur starvation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* **581**: 4519-4522.

Suzuki M, Tanaka K, Kuwano M, Yoshida K T. 2007. Expression pattern of inositol phosphate-related enzymes in rice (*Oryza sativa L.*): implications for the phytic acid biosynthetic pathway. *Gene* **405**: 55-64.

Svistoonoff S, Creff A, Reymond M, Sigoillot-Claude C, Ricaud L, Blanchet A, Nussaume L, Desnos T. 2007. Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nat Genet* **39**: 792-796

Sweetman D, Johnson S, Caddick S, Hanke D, Brearley C. 2006. Characterization of an *Arabidopsis* inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase (AtIPK1). *Biochem. J.* **394**: 95-103.

-T-

Taji T, Takahashi S, Shinozaki K. 2006. Inositols and Their Metabolites in Abiotic and Biotic Stress Responses. A. *Lahiri Majumder* and B. *B. Biswas (eds.)*, *Biology of Inositols and Phosphoinositides*, 239-264 Springer. Printed in the Netherlands.

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

Takahashi S, Katagiri T, Hirayama T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, 2001. Hyperosmotic stress induces a rapid and transient increase in inositol 1,4,5-trisphosphate independent of abscisic acid in *Arabidopsis* cell culture. *Plant Cell Physiol.* **42**: 214-222.

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

Theodorou ME, Plaxton WC. 1993. Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiol* **101**: 339-344.

Thibaud MC, Arrighi JF, Bayle V, Chiarenza S, Creff A, Bustos R, Paz-Ares J, Poirier Y, Nussaume L. 2010. Dissection of local and systemic transcriptional responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. **64**: 775-789.

Ticconi CA, Lucero RD, Sakhonwasee S, Adamson AW, Creff A, Nussaume L, Desnos T, Abel S. 2009. ER-resident proteins PDR2 and LPR1 mediate the developmental response of root meristems to phosphate availability. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 14174-14179.

Ticconi CA, Delatorre CA, Lahner B, Salt DE, Abel S. 2004. *Arabidopsis* pdr2 reveals a phosphate-sensitive checkpoint in root development. *Plant J*. **37**: 801-814

Ticconi CA, Delatorre CA, Abel S. 2001. Attenuation of phosphate starvation responses by phosphite in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **127**: 963-972.

Tisdale SL, Nelson WL. 1975. Soil Fertility and Fertilizers. Macmillan Publishing Co. Inc. New York. U.S.A. 694 p.

Toor GS, Peak JD, Sims JT. 2005. Phosphorus speciation in broiler litter and turkey manure produced from modified diets. *J. Environ. Qual.* **34**: 687-697.

Torabinejad J, Donahue J, Gunesequera B, Allen-Daniels M, Gillaspay G. 2009. VTC4 is a bifunctional enzyme that affects myoinositol and ascorbate biosynthesis in plants. *Plant Physiol*. **150**: 951-961.

Tran TT, Mamo G, Mattiasson B, Hatti-Kaul R. 2010. A thermostable phytase from *Bacillus* sp. MD2: cloning, expression and high-level production in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. **37**: 279-287.

Trull MC, Guiltinan MJ, Lynch JP, Deikman J. 1997. The responses of wild-type and ABA mutant *Arabidopsis thaliana* plants to phosphorus starvation. *Plant, Cell and Environment* **20**: 85-92.

Tsay YF, Chiu CC, Tsai CB, Ho CH, Hsu PK. 2007. Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Letters* **581**: 2290-2300.

Turnbull CG, Lopez-Cobollo RM. 2013. Heavy traffic in the fast lane: long-distance signalling by macromolecules. *New Phytologist* **198**: 33-51.

-U-

Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ. 1999. Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *The Plant Journal*, **19**: 309-319.

Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ. 1997. AUX/ IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* **9**: 1963-1971.

Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, Kyojuka J, Yamaguchi S. 2008. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**: 195-200.

-2-

Van de Mortel JE, Almar Villanueva L, Schat H, Kwekkeboom J, Coughlan S, Moerland PD, Ver Loren van Themaat E, Koornneef M, Aarts MG. 2006. Large expression differences in genes for iron and zinc homeostasis, stress response, and lignin biosynthesis distinguish roots of *Arabidopsis thaliana* and the related metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology* **142**: 1127-1147.

Vance CP. 2008. Plants without arbuscular mycorrhizae. In PJ White, JP Hammond, eds, The Ecophysiology of Plant-Phosphorus Interactions. *Springer, Dordrecht, The Netherlands* pp 117-142.

Vance CP, Uhde SC, Allan DL. 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol*, **157**: 423-447.

Valdes-López O, Arenas-Huertero C, Ramírez M, Girard L, Sanchez F, et al. 2008. Essential role of MYB transcription factor: PvPHR1 and microRNA: PvmiR399 in phosphorus-deficiency signalling in common bean roots. *Plant Cell Environ.* **31**: 1834-43.

Valluru R, Van den Ende W. 2011. Myo-inositol and beyond – emerging networks under stress. *Plant Sci* **181**: 387-400.

Veljanovski V, Vanderbeld B, Knowles VL, Snedden WA, Plaxton WC. 2006. Biochemical and molecular characterization of AtPAP26, a vacuolar purple acid phosphatase up-regulated in phosphatedeprived *Arabidopsis* suspension cells and seedlings. *Plant Physiology* **142**: 1282-1293.

Vernon DM, Bohnert HJ. 1992a. A novel methyl transferase induced by osmotic stress in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *EMBO Journal* **11**: 2077-2085.

Vernon DM, Bohnert HJ. 1992b. Increased Expression of a myo-Inositol MethylTransferase in *Mesembryanthemum crystallinum* is part of a stress response distinct from crassulacean acid metabolism induction. *Plant Physiology* **99**: 1695-1698.

Verret F, Gravot A, Auroy P, Leonhardt N, David P, Nussaume L, Vavasseur A, Richaud P. 2004. Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS letters* **576**: 306-312.

Vert G, Grotz N, De´dalde´champ F, Gaymard F, Guerinot ML, Briat JF, et al. 2002. IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* **14**: 1223-1233.

Vohra P, Gray GA, Kratzer FH. 1965. Phytic acid-metal complexes. *Proc Soc Exp Biol Med* **120**: 447-449.

Vollenweider RA. 1968. The scientific basis of lake and stream eutrophication with particular reference to phosphorus and nitrogen as eutrophication factors. Technical report OECD, DAS/C81/68, Paris, France

Veum TL, Ledoux DR, Shannon MC, Raboy V. 2009. Effect of graded levels of iron, zinc, and copper supplementation in diets with low-phytate or normal barley on growth performance, bone characteristics, hematocrit volume, and zinc and copper balance of young swine. *J. Ani. Sci.* **87**: 2625-2634.

-W-

Wang Y, Xu H, Kou JJ, Shi L, Zhang CY, Xu F. 2013. Dual effects of transgenic *Brassica napus* overexpressing CS gene on tolerances to aluminum toxicity and phosphorus deficiency. *Plant Soil* **362**: 231-246.

Wang X, Wang Y, Tian J, Lim BL, Yan X, Liao H. 2009. Overexpressing AtPAP15 enhances phosphorus efficiency in soybean. *Plant Physiol.* **151**: 233-240.

Ward JT, Lahner B, Yakubova E, Salt DE, Raghothama KG. 2008. The effect of iron on the primary root elongation of *Arabidopsis* during phosphate deficiency. *Plant Physiol.* **147**: 1181-1191.

Wasaki J, Yonetani R, Kuroda S, Shinano T, Yazaki J, Fujii F, Shimbo K, Yamamoto K, Sakata K, Sasaki T, et al. 2003. Transcriptomic analysis of metabolic changes by phosphorus stress in rice plant roots. *Plant, Cell and Environment* **26**: 1515-1523.

Watt M, Evans JR. 1999. Proteoid roots. Physiology and development. *Plant Physiology* **121**: 317-323.

Wheeler G, Jones M, Smirnoff N. 1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* **393**: 365-369.

Williamson LC, Ribrioux S, Fitter AH, Leyser O. 2001. Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**: 875-882.

Wolucka BA, Van Montagu M. 2003. GDP-Mannose 3',5'-Epimerase Forms GDP-L-gulose, a Putative Intermediate for the de Novo Biosynthesis of Vitamin C in Plants. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 47483-47490.

Woo J, MacPherson CR, Liu J, Wang H, Kiba T, Hannah MA, Wang XJ, Bajic VB, Chua NH. 2012. The response and recovery of the *Arabidopsis thaliana* transcriptome to phosphate starvation. *BMC plant biology* **12**: 62.

Wu P, Ma L, Hou X, Wang M, Wu Y, Liu F, et al. 2003. Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in *Arabidopsis* roots and leaves. *Plant Physiol* **132**: 1260-1271.

Wyss M, Brugger R, Kronenberger A, Rémy R, Fimbel R, Oesterhelt G, Lehmann M, van Loon APGM. 1999. Biochemical characterization of fungal phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 367-373.

-X-

Xiao K, Liu J, Dewbre G, Harrison M, Wang ZY. 2006. Isolation and characterization of root-specific phosphate transporter promoters from *Medicago truncatula*. *Plant Biol.(Stuttg.)* **8**: 439-449.

Xiong L, Lee B, Ishitani M, Lee H, Zhang C, Zhu JK. 2001. FIERY1 encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in *Arabidopsis*. *Genes and Development* **15**: 1971-1984.

Xu J, Brearley C A, Lin W H, Wang Y, Ye R, Mueller-Roeber B, Xu Z H, Xue H W. 2005. A role of *Arabidopsis* inositol polyphosphate kinase, AtIPK2 α , in pollen germination and root growth. *Plant Physiol.* **137**: 94-103.

-Y-

Yang WT, Baek D, Yun DJ, Hwang WH, Park DS, Nam MH, Chung ES, Chung YS, Yi YB, Kim DH. 2014. Overexpression of OsMYB4P, an R2R3-type MYB transcriptional activator, increases phosphate acquisition in rice. *Plant Physiol Biochem* **80**: 259-267.

Ye HX, Zhang XQ, Broughton S, Westcott S, Wu DX, Lance R, Li CD. 2011. A nonsense mutation in a putative sulphate transporter gene results in low phytic acid in barley. *Functional Integrative Genomics* **11**: 103-110.

Yi K, Menand B, Bell E, Dolan L. 2010. A basic helix-loop-helix transcription factor controls cell growth and size in root hairs. *Nature Genetics* **42**: 264-267.

Yip W, Wang L, Cheng C, Wu W, Lung S, Lim BL. 2003. The introduction of a phytase gene from *Bacillus subtilis* improved the growth performance of transgenic tobacco. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **310**: 1148-1154.

York JD. 2006. Regulation of nuclear processes by inositol polyphosphates. *Biochimica et Biophysica Acta* **1761**: 552-559.

Yoshimoto N, Takahashi H, Smith FW, Yamaya T, Saito K. 2002. Two distinct high-affinity sulfate transporters with different inducibilities mediate uptake of sulfate in *Arabidopsis* roots. *Plant J* **29**: 465-473.

Yu B, Xu C, Benning C. 2002. *Arabidopsis* disrupted in SQD2 encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth. *Proc. Natl.Acad. Sci.USA* **99**: 5732-5737.

Yuan F, Zhao H, Ren X, Zhu S, Fu X, Shu Q. 2007. Generation and characterization of two novel low phytate mutations in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Theor. Appl. Genet.* **115**: 945-957.

-Z-

Zhang Z, Liao H, Lucas WJ. 2014. Molecular mechanisms underlying phosphate sensing, signaling, and adaptation in plants. *J Integr Plant Biol.* **56**: 192-220.

Zhang F, Shen J, Zhang J, Zuo Y, Li L, Chen X. 2010. Rhizosphere processes and management for improving nutrient use efficiency and crop productivity: implications for China. *Adv Agron* **107**: 1-32.

Zhang W, Gruszewski HA, Chevone BI, Nessler CL. 2008. An *Arabidopsis* purple acid phosphatase with phytase activity increases foliar ascorbate. *Plant Physiology* **146**: 431-440.

Zhao H, Frank T, Tan Y, Zhou C, Jabnune M, Bulak Arpat A, Cui H, Huang J, He Z, Poirier Y, Engel K-H, Shu Q. 2016. Disruption of OsSULTR3;3 reduces phytate and phosphorus concentrations and alters the metabolite profile in rice grains. *New Phytologist* doi: 10.1111/nph.13969

Zhou J, Jiao F, Wu Z, Li Y, Wang X, He X, Zhong W, Wu P. 2008. OsPHR2 is involved in phosphate-starvation signaling and excessive phosphate accumulation in shoots of plants. *Plant Physiol* **146**: 1673-1686.

Zhu YY, Zeng HQ, Dong CX, Yin XM, Shen QR, Yang ZM. 2010. microRNA expression profiles associated with phosphorus deficiency in white lupin (*Lupinus albus L.*). *Plant Science* **178**: 23-29.

Zhu YG, Smith SE, Smith FA. 2001. Plant growth and cation composition of two cultivars of spring wheat (*Triticum aestivum L.*) differing in P uptake efficiency. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1277-1282.

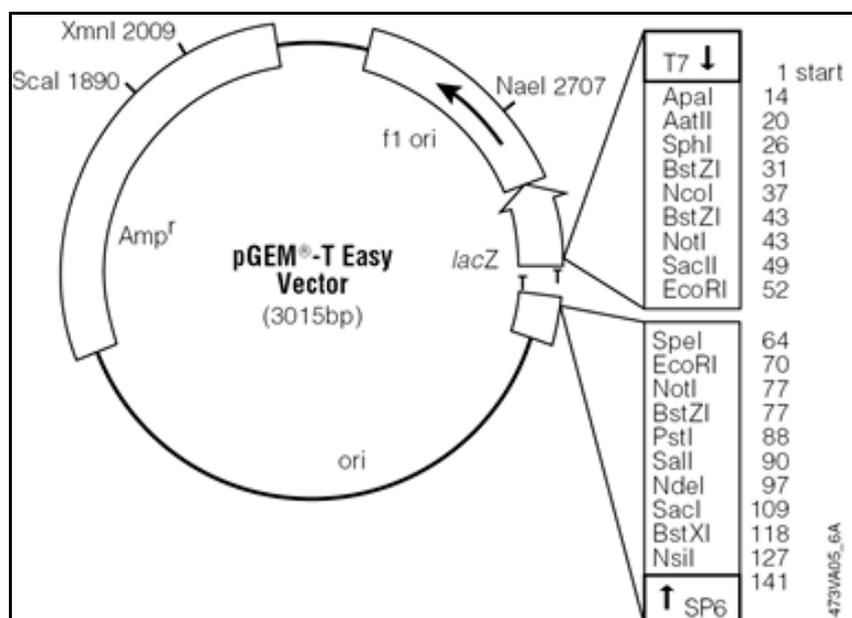
Zimmermann P, Zardi G, Lehmann M, Zeder C, Amrhein N, Frossard E, Bucher M. 2003. Engineering the root-soil interface via targeted expression of a synthetic phytase gene in trichoblasts. *Plant Biotechnol. J.* **1**: 353-360.



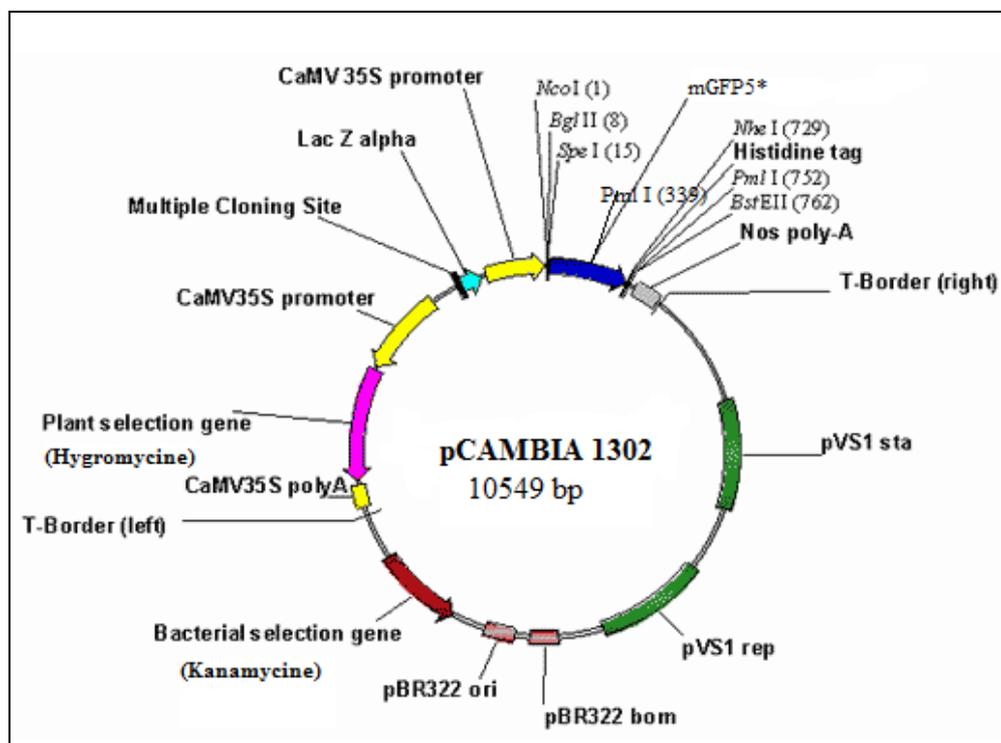
Annexes

Annexes

Annexe 1 : Carte de restriction des vecteurs utilisés dans les clonages

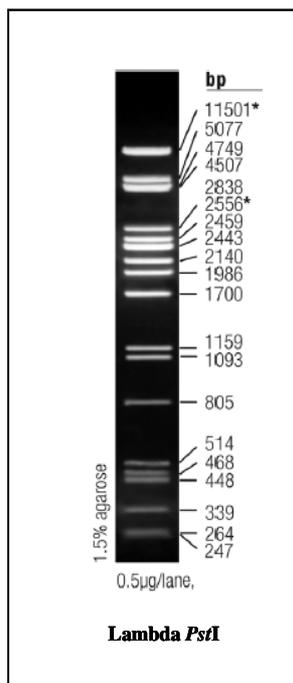


Carte de restriction du vecteur pGEM-T Easy



Carte de restriction du vecteur binaire pCAMBIA 1302

Annexe 2 : Marqueur de taille utilisé



Annexe 3 : Composition du milieu MS

Milieu MS (Murashige and Skoog) pour la croissance des plantes : il a la composition suivante :

Saccharose	: 10	g/L
Macroéléments	: 50	ml/L
Microéléments	: 2.5	ml/L
Solution organique	: 10	ml/L
Fer EDTA	: 10	ml/L
Phytigel	: 4	g/L
H ₂ O q.s.p	: 1	L

Le PH doit être compris entre 5.8 et 6. Le Phytigel est ajouté à la fin pour solidifier le milieu.

Les solutions mères pour le milieu MS sont préparées comme suit :

Macroéléments (20%)	Microéléments	Solution organique	Fer EDTA
NH ₄ NO ₃ 33 g/l	H ₃ BO ₃ 2,48 g/l	Myo-inositol 10 g/l	FeSO ₄ .7H ₂ O 2,78 g/l
KNO ₃ 38 g/l	MnSO ₄ 8,92 g/l	Nicotinicacide 0,05 g/l	Na-EDTA.2H ₂ O 3,73 g/l
MgSO ₄ 5 g/l	ZnSO ₄ 3,44 g/l	Pyridixine-HCl 0,05 g/l	
7H ₂ O	KI 0,332 g/l		
CaCl ₂ 3 g/l	CoCl ₂ 0,01 g/l		
2H ₂ O	CuSO ₄ 0,01 g/l		
KH ₂ PO ₄ 3.4 g/l	Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O 0,1 g/l		

Annexe 4 : Liste des amorces utilisées dans ce travail (clonages, q-RT-PCR, RT-PCR)

Amorces	Séquences 5' - 3'
PHYC-Bg PHYC-Sp	GCAGATCTATGTCCGATCCTTATCATTTTACC GCACTAGTTTATTTTCCGCTTCTGTCCGGTC
Ext3-Fw Ext3-Rv	GCTCTAGAATGGCCTCTTTAGTGGCAA TAGGATCCAGAAGAATAGAAATAGTTAGCGGTTG
PHYC-BH PHYC-Sph	GCGGATCCTTATGTCCGATCCTTATCA GCGCATGCTTATTTTCCGCTTCTGTCCGG
HPTR HPTF	CTCTATTTCTTTGCCCTCG ATGAAAAAGCCTGAACTCAC
Ar-ActF Ar-ActR	GGCGATGAAGCTCAATCCAAACG GGTCACGACCAGCAAGATCAAGACG
SP6	TAAGATATCACAAGTGGATTTA
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
OligodT	ACGCGTATCGATGTTCGAC (T) ₁₈
PHT1;1 F PHT1;1 R	GGTTTTGGTTGGGATTTGG CAACTTGAGGAGGCGTTGA
PHT1;4 F PHT1;4 R	TCAATGGCGTTGCCTTCTGT ATCACCAAGCCACCCGAAA
PHO1 F PHO1 R	TACCCTACTTCTGGCGTGCC TCAGGGTTTGATTTCGTCCCA
PHO1;H1 F PHO1;H1 R	TGAAACGAGCCACCTAGTGAA TGTTCCAGCGGCTAACATAGC
SULTR1;1 F SULTR1;1 R	GCCATCACAATCGCTCTCCAA TTGCCAATTCCACCCATGC
SULTR1;2 F SULTR1;2 R	CCGTCTTCCCAGTCTTCGATTGG GATTTCGCCAACTTAGCGTA
NRT1;1 F NRT1;1 R	GCACATTGGCATTAGGCTTT CTCAATCCCCACCTCAGC
NRT2;1 F NRT2;1 R	AAACAGAGCAGCCGTGAAAG GTCCGAGCTTGAATTGTGAGT
pht1.4F pht1.4R	TCAATGGCGTTGCCTTCTGT CTTGCATAGCAAAAACCGCA
pho1.h3F pho1.h3R	CAGACAAGTCCTGCTTGTGTTGGT GGGATGACAGCAACAATGAAGA
zip9F zip9R	TGGGAATAGTGTACATTTCA TCATCCCAGCTCCAAGAAAC
zip4F zip4R	TCTAATAGTCATGGTACATGTGA ATCAGCTGCGATGAGGTCAC



Publications

Over-expression of the Bacterial Phytase US417 in *Arabidopsis* Reduces the Concentration of Phytic Acid and Reveals Its Involvement in the Regulation of Sulfate and Phosphate Homeostasis and Signaling

Nibras Belgaroui^{1,3}, Ikram Zaidi¹, Ameny Farhat², Hichem Chouayekh², Nadia Bouain³, Sandrine Chay³, Catherine Curie³, Stéphane Mari³, Khaled Masmoudi^{1,5}, Jean-Claude Davidian³, Pierre Berthomieu³, Hatem Rouached^{3,*} and Moez Hanin^{1,4,*}

¹Laboratoire de Protection et Amélioration des Plantes, Centre de Biotechnologie de Sfax, BP “1177” 3018, Sfax, Tunisie

²Laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules, Centre de Biotechnologie de Sfax, BP “1177” 3018, Sfax, Tunisie

³Institut National de la Recherche Agronomique, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Montpellier 2, Montpellier SupAgro, Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, Bat 7, 2place Viala, 34060 Montpellier cedex 2, France

⁴Université de Sfax, Institut Supérieur de Biotechnologie, BP “1175” 3038 Sfax, Tunisie

⁵Current address: International Center for Biosaline Agriculture (ICBA), PO Box 14660, Dubai, UAE

*Corresponding authors: Moez Hanin, Tel/Fax, +216 (0)74875818; E-mail, moez.hanin@cbs.rnrt.tn; Hatem Rouached, Fax, +33 (0)4 67 52 57 37; E-mail, hatem.rouached@supagro.inra.fr.

(Received February 20, 2014; Accepted August 28, 2014)

Phytic acid (PA) is the main phosphorus storage form in plant seeds. It is recognized as an anti-nutrient for humans and non-ruminant animals, as well as one of the major sources of phosphorus that contributes to eutrophication. Therefore, engineering plants with low PA content without affecting plant growth capacity has become a major focus in plant breeding. Nevertheless, lack of knowledge on the role of PA seed reserves in regulating plant growth and in maintaining ion homeostasis hinders such an agronomical application. In this context, we report here that the over-expression of the bacterial phytase PHY-US417 in *Arabidopsis* leads to a significant decrease in seed PA, without any effect on the seed germination potential. Interestingly, this over-expression also induced a higher remobilization of free iron during germination. Moreover, the PHY-over-expressor lines show an increase in inorganic phosphate and sulfate contents, and a higher biomass production after phosphate starvation. Finally, phosphate sensing was altered because of the changes in the expression of genes induced by phosphate starvation or involved in phosphate or sulfate transport. Together, these results show that the over-expression of PHY-US417 reduces PA concentration, and provide the first evidence for the involvement of PA in the regulation of sulfate and phosphate homeostasis and signaling.

Keywords: Homeostasis • Phosphorus • Phytic acid • Phytase • Sulfate • Signaling.

Abbreviations: Pi, inorganic phosphate; MS, Murashige and Skoog; P, phosphorus; PA, phytic acid.

Introduction

Phosphorus (P) is an essential element for optimal plant growth and animal nutrition. Plants serve as the major entry point for

this element into the food chain. P is absorbed by plant roots from the soil predominantly as inorganic phosphate (Pi), which is present in very low concentrations (Marschner 1995, Poirier and Bucher 2002, Lin et al. 2014). At the end of the plant life cycle, Pi is mainly stored in the seed as phytic acid (PA), which is a myo-inositol ester with six phosphate groups (Raboy 2009). The abundance of PA in crop seeds used as food and feed is a long-standing issue. PA is considered as a key anti-nutrient element for humans and non-ruminant animals (Raboy 2006, Raboy 2009). Indeed, the PA-associated P is in general not bio-available to the non-ruminant animals because they produce little or no phytase in their digestive tract (Nys et al. 1996, Wodzinski et al. 1996). Phytases are special acid phosphatases with the capacity to hydrolyze PA by cleaving the Pi off the inositol backbone (Yao et al. 2011, Lei et al. 2013). They can be classified into four families namely histidine acid phosphatases, β -propeller phytases, purple acid phosphatases and more recently protein tyrosine phosphatase-like phytases (for review see Lei et al. 2013). Thus, monogastric diets need to be supplemented with Pi to meet the P requirement for animal growth. PA has additional anti-nutritional properties since it acts as a chelating agent for several essential cations such as iron (Fe), preventing their absorption, and thus contributing to mineral deficiencies (Maga et al. 1982, Raboy 2009, Veum et al. 2009). On the other hand, high PA content in cereal seeds is one of the major P sources that contribute to eutrophication, which is aggravated by the release of Pi from the manure (Bali and Satyanarayana 2001). Therefore, reducing the PA levels in grain would contribute to improving animal and human diets through better micronutrient resorption, and decreasing the negative impact of P excess on the environment.

The regulation of Pi homeostasis, transport and signaling in plants are highly regulated by complex processes (Rouached et al.

2010, Lin et al. 2014). At the transport level, multiple Pi transporters implicated in acquiring Pi at the root surface, distributing Pi to various organelles and organs have been identified including members of the PHT1 and the PHO1 gene families (Nussaume et al. 2011, Stefanovic et al. 2011, Bouain et al. 2014). At the signaling level, some regulatory pathways describing plant response to Pi starvation have been proposed (Bari et al. 2006, Lin et al. 2008a, Rouached et al. 2010, Lin et al. 2014), including key regulators such as the *Arabidopsis* non-coding RNAs *AT4* and *IPS1*, which were first described as phosphate starvation induced genes (Shin et al. 2006). Mutants affected in the above cited genes cause an alteration of Pi inter-organ distribution (for review Lin et al. 2014, Lott and West, 2001). The transport of Pi in plant is also influenced by a complex interconnection between the Pi homeostasis and those of essential nutrients such as iron (Fe) (Ward et al. 2008, Bournier et al. 2013, Bouain et al. 2014). Therefore, it is clear that future work that aims to modulate PA content in seed by manipulation of the Pi transport and/or signaling should first consider the complexity of these regulatory pathways.

In crop plants, various genetic and biotechnological strategies have been employed to reduce the PA contents (Lucca et al. 2001, Brinch-Pedersen et al. 2003, Chiera et al. 2004, Drakakaki et al. 2005). The classical mutagenesis approach has been used to generate mutants having low phytic acid (*lpa*) content (Raboy 2009). This strategy was shown to be effective in cereals including wheat (Guttieri et al. 2004), maize (Raboy et al. 2000, Pilu et al. 2003, Shi et al. 2005), and rice (Larson et al. 2000, Kim et al. 2008a, b). The maize mutants, namely *lpa1-1* and *lpa2-1*, show a reduction in PA content by 66% and 50% in mature seeds respectively (Raboy et al. 2000). Molecular studies led to the identification of the genes responsible for the *lpa2* and *lpa3* phenotype in maize. LPA2 and LPA3 have been shown to be an inositol phosphate kinase and a myo-inositol kinase, respectively (Shi et al. 2003, Shi et al. 2005). While the maize *lpa1* gene encodes a multidrug resistance-associated protein (MRP) ATP-binding cassette (ABC) transporter (Shi et al. 2007). However, many other genes responsible for the *lpa* phenotype remain largely unknown. It is important to note that the reduction in PA levels in the *lpa* mutants is sometimes associated with the alteration of agronomic traits such as crop yield (Raboy 2009). For this reason Shi et al. (2007) proposed a new alternative where through silencing of the MRP-ABC transporter in an embryo-specific manner, they successfully produced maize and soybean seeds with low-PA and high-P contents and which germinate normally without significant decreases in seed dry weights. However, such a strategy was not always successful since in rice the seed-specific silencing of a MRP (*osMRP5*) causes a reduction of PA levels but also a decrease in seed weight accompanied by reductions in seed germination and seedling emergence (Li et al. 2014).

Despite its primary importance, the biological role of PA in plants remains poorly understood either under standard growth conditions or under challenging environments. A different strategy is now actively pursued, which is the generation of transgenic crops by manipulating the PA biosynthetic pathway (Kuwano et al. 2006, Suzuki et al. 2007, Kuwano et al. 2009, Kim and Tai

2011, Zhao et al. 2013). Such a strategy becomes feasible in the light of a better understanding of the PA biosynthetic pathway, which involves both inositol-lipid intermediates and a lipid-independent pathway (Stevenson-Paulik et al. 2005, Raboy 2009). Some genes of the PA biosynthetic pathway have been cloned such as the inositol 3-phosphate synthase (MIPS) and several inositol polyphosphate kinases (*IPK1*, *IPK2*, *IPK3*, *INK1*) (Raboy 2009). In rice, *lpa* lines were generated by seed-specific down regulation of MIPS, the key enzyme which catalyzes the conversion of glucose 6-phosphate into inositol monophosphate (Ins(3)P), the early substrate in PA biosynthetic pathway (Kuwano et al. 2009, Ali et al. 2013a). The *IPK1* gene is required for the later steps of PA synthesis and its mutation in *Arabidopsis* has lowered the PA content in seed (Stevenson-Paulik et al. 2005, Kim and Tai 2011). Furthermore, molecular and physiological analyses of several *lpa* mutants revealed the relevance of *IPKs* in phosphorylating IP intermediates. Recently, the RNAi-mediated seed-specific silencing of *OsIPK1* resulted in a substantial reduction in seed PA levels without negatively affecting the growth and development of transgenic rice plants (Ali et al. 2013b). This finding strongly supports the possibility of uncoupling low PA content from plant growth capacity.

On the other hand, multiple attempts to increase Pi availability via PA hydrolysis through heterologous expression of microbial phytases *in planta* have been successfully made in the last decade (Brinch-Pedersen et al. 2002, Lei et al. 2013). In most cases, a fungal phytase of *Aspergillus niger* or bacterial phytases from *Bacillus subtilis* strains were expressed in transgenic plants as intracellular or secreted forms (Richardson et al. 2001, Brinch-Pedersen et al. 2002, Yip et al. 2003, Lung et al. 2005, Bilyeu et al. 2008). So far, numerous transgenic plants heterologously expressing a phytase have been developed, but one ideal enzyme for all applications does not exist. Therefore, screening for phytases with suitable catalytic properties and stability is of primary interest. In this report, we explored the effects of a novel thermostable phytase PHY-US417 from *B. subtilis* (Farhat et al. 2008) on plant growth in *Arabidopsis*. Our results showed that the over-expression of an intracellular form of PHY-US417 leads to a significant decrease in the PA content, which is concomitant with a higher Fe remobilization during seedling establishment compared to control plants. Remarkably, PHY-US417 over-expression results in up to 50% and 45% increase in shoot Pi and sulfate (SO₄) concentrations respectively, and promotes plant growth with a significant enhancement in root growth capacity after Pi starvation. The results presented here strongly support a role for PA in the regulation of the Pi and the SO₄ homeostasis and signaling pathways.

Results

The purified bacterial phytase PHY-US417 promotes growth of *Arabidopsis* seedlings under P-limited conditions

Few reports described previously the contribution of extracellular phytases or externally applied phytases in promoting the plant-growth capacity under Pi stress conditions (Richardson

et al. 2001, Idriss et al. 2002, Lung et al. 2008). In this study, the β -propeller phytase PHY-US417 of *Bacillus subtilis* US417 was chosen because of its interesting catalytic properties since the in vitro enzymatic activity exhibited a great pH stability with an optimum at pH 7.5, and was previously reported to be specifically active on PA (Farhat et al. 2008). We were interested here to investigate whether these enzymatic properties can be of a beneficial effect for plant growth under P-limited conditions. For this reason, wild type *Arabidopsis* seedlings were germinated on standard MS growth medium and then transferred to low-P medium containing PA and in the presence or the absence of the purified enzyme PHY-US417. Compared to standard conditions, seedlings grown on low-P medium are dwarfed and exhibit small dark green leaves, which are typical Pi deficiency features (Fig. 1A). When PA (0.33 mM) was supplied as the sole P-source in the growth media, the growth of seedlings is also inhibited but to a less extent in comparison with those grown on low-P medium (Fig. 1A). In the presence of the purified phytase PHY-US417 together with PA as a sole P-source, the seedlings grow far better, and even more vigorously than those grown on a standard MS. Under these conditions, the purified phytase seems to stimulate significantly root growth (Fig. 1B), and the seedlings display up to ~5 times more shoot and root fresh biomasses than those grown on low-P medium (Fig. 1C). Like other β -propeller phytases, PHY-US417 is expected to hydrolyze PA by sequential removal of only 3 Pi groups to finally generate myo-inositol triphosphates (Kerovuo et al. 2000, Greiner et al. 2007), and the addition of PA at a concentration of 0.33 mM would result in the release of \cong 1 mM Pi, the usual concentration used in a standard MS medium. Therefore, this finding indicates that under P-limited conditions, the bacterial phytase is capable of restoring and promoting the growth of *Arabidopsis* seedlings most likely by hydrolyzing the PA present in the medium leading to the increase of the Pi bio-availability.

Generation of transgenic *Arabidopsis* plants over-expressing the bacterial phytase PHY-US417

The capacity of the supplied phytase PHY-US417 to promote plant growth under P-limited conditions prompted us to investigate the effect of the over-expression of the PHY-US417 gene in *Arabidopsis* plants. The full length ORF encoding the mature form of this phytase (presumably cytoplasmic according to protein sub-cellular localization prediction programs, such as WoLF PSORT software <http://wolffpsort.org>) was first cloned in the binary vector pCambia1302 under the control of the 35S promoter and the NOS terminator. The vector also bears the HPT gene (conferring resistance to hygromycin) as a selectable marker for plant transformation. After *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis* plants, several transformants were selected on a hygromycin-containing medium (see Materials and Methods). PCR screenings on genomic DNA of a number of T1 transformants allowed the amplification of both HPT and PHY-US417 transgenes (Supplementary Fig. 1B, C). Homozygous T3 plants were

then generated, where both transgenes were shown to be stably expressed (Supplementary Fig. 1D) at seemingly variable levels that might be linked to the transgene integration sites. Two transgenic lines (L7 and L9) harboring single transgene inserts were finally chosen for further molecular and physiological analyses.

The transgenic lines over-expressing PHY-US417 gene exhibit higher phytase activities and lower seed PA concentrations

To assess whether PHY-US417 is active *in planta*, 2-week-old seedlings from both lines L7 and L9 grown on MS medium, were harvested for phytase assays. These assays were performed under optimal conditions (pH 7.5 and 55°C) for PHY-US417 but not for endogenous *Arabidopsis* phytases. Our results showed that phytase activities were approximately eight and 28 times higher in the extracts of lines L7 (1.31 ± 0.81 U/g FW) and L9 (4.79 ± 0.64 U/g FW), respectively, in comparison with the wild-type control (0.17 ± 0.04 U/g FW). Together with the expression data of the PHY-US417 gene (Supplementary figure 1D), this finding demonstrates that *Arabidopsis* plants can produce an active form of this phytase. The effects of the PHY-US417 gene over-expression on the PA accumulation were determined in the seeds of the two transgenic lines L7 and L9 and wild type plants (Col) grown under standard condition as described by Haug and Lantzsch (1983). Our results showed that both transgenic lines contain ~40% less PA compared to the control (Fig. 2), thus demonstrating that the phytase PHY-US417 activity in planta resulted in decreasing the PA contents.

The over-expression of PHY-US417 gene in *Arabidopsis* improves plant growth after P re-supply

In order to assess the effect of the constitutive over-expression of PHY-US417 on the tolerance of the transgenic lines L7 and L9 to Pi starvation, plant growth and fresh and dry masses were evaluated in plants grown for five to 20 days under Pi deficiency and then transferred to standard MS medium containing 1 mM KH₂PO₄ (+Pi) for 10 additional days (Fig. 3). The *Arabidopsis ipk1-1* mutant known to accumulate low PA level (Stevenson-Paullik et al. 2005) was also included in this experiment. Both transgenic lines show a better recovery from P-starvation than wild-type plants (Fig. 3A). Although to a less extent, the *ipk1-1* mutant has also a better capacity to recover from P starvation. After 10 days of growth on MS medium, L7 and L9 lines exhibited higher growth rates (especially of roots) which were illustrated by net increases (up to 50%) in fresh and dry masses compared to wild-type plants (Fig. 3B, C). These data demonstrate that the over-expression of the bacterial phytase promotes *Arabidopsis* growth during recovery from Pi-starvation.

The rate of Fe remobilization is higher in low phytic acid lines compared to wild-type plants

PA is deposited in seeds within protein storage vacuoles as mixed salts (Raboy 2009) that are made with different metal

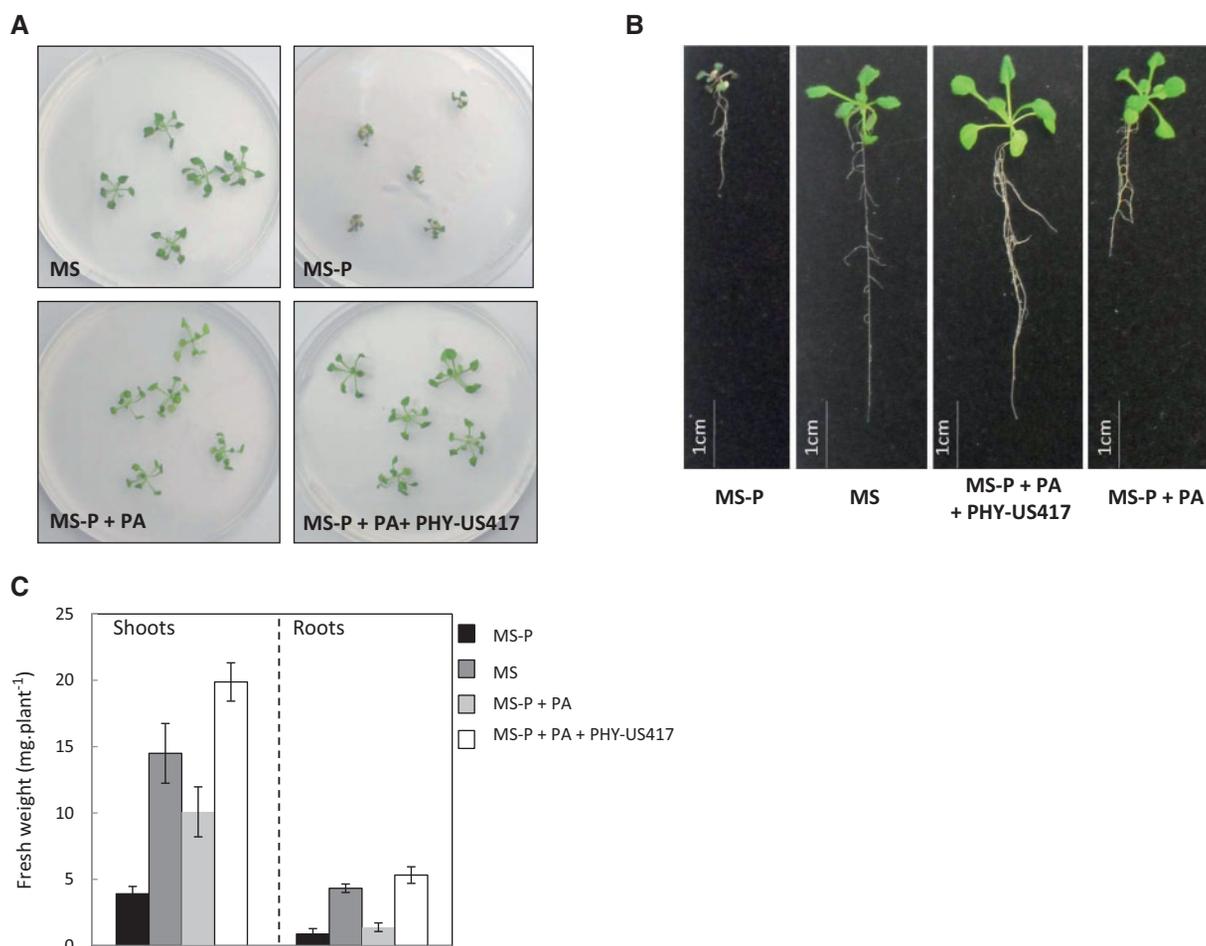


Fig. 1 Effect of *in vitro* phytase supply on the growth of *Arabidopsis* wild type plants. (A) Seedlings were first grown on MS medium for 1 week then transferred to standard MS medium (MS with 1 mM Pi, as a control), or to low-P medium (MS-P), in the absence or in the presence of 0.33 mM phytic acid (PA) and the phytase PHY-US417 (6.5 U). (B) Photographs of the roots of seedlings grown under the above conditions. All photographs were taken 15 d after transfer. Representative data of three biological replicates are shown. (C) Fresh weights of shoots and roots from seedlings grown under conditions indicated in (A). Measurements were recorded 15 d after transfer. Data are mean \pm SD of three individual replicates. Each replicate was obtained from the analysis of shoots and roots collected from a pool of six plants.

cations such as Fe. In *Arabidopsis*, it has been shown that during germination, the Fe pool is remobilized from mature embryos to feed the developing tissues of the seedling (Roschztardt et al. 2009). Here, the effect of lowering seed PA on the Fe remobilization during germination was examined using an Fe histochemical detection assay as described previously (Roschztardt et al. 2009). The Fe staining of the wild type, *ipk1-1* and the two PHY-over-expressor lines reveal that in mature embryos the Fe pattern is identical in all genotypes (Fig. 4A). However, two days after germination it is clear that the concentration of Fe in the vascular tissues of the mutant and transgenic lines is significantly lower than in the wild-type, indicating that during the two days of post-germinative growth, the rate of Fe remobilization was higher in the mutant lines, compared to the wild type (Fig. 4B). These data strongly suggest that the decrease in PA levels, via the over-expression of the PHY-US417 gene may enhance the Fe remobilization during seed germination in *Arabidopsis*.

The PHY-US417 over-expression alters phosphate and sulfate concentrations in *Arabidopsis*

We have investigated the effects of lowering PA levels in the PHY-over-expressing lines on the concentrations of major inorganic anions including Pi. Plants were grown on medium with low Pi concentration for 15 d. Only subsets of these plants were transferred to standard medium containing 1 mM KH₂PO₄ (+Pi) for 10 additional days. Measurement of anion concentrations revealed that under P-starvation (–Pi), the transgenic lines accumulated ~40–50% more Pi in their shoots than the wild type (Fig. 5). Once transferred to medium with added Pi, the differences in shoot Pi-accumulation between wild type plants and transgenic lines were attenuated. In the roots, no significant differences were recorded between tested lines, neither under P starvation nor during the recovery phase. Interestingly, among other inorganic anions, the SO₄ anions accumulated to higher levels in the shoots (up to 45% increase) of the transgenic plants during Pi starvation (–Pi) and the

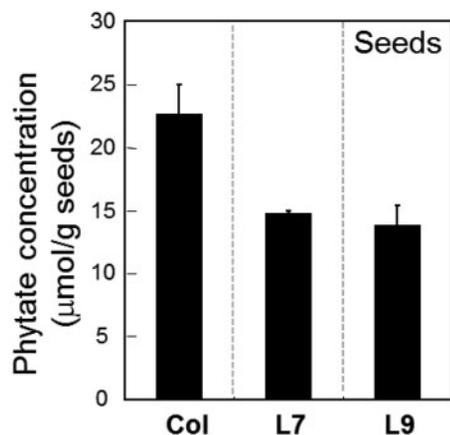


Fig. 2 Measurement of seed phytate concentrations in wild type plants and in the two PHY-US417 transgenic lines L7 and L9. All plant genotypes including wild type Col-0, were grown in the greenhouse and seeds were collected at the end of their life cycle. Seed PA concentrations were determined by colorimetric method as described previously (Haug and Lantzsch 1983) and expressed as µmol PA/g seed. Data are mean ± SD of three individual replicates. Each replicate was obtained from the analysis of seeds collected from a pool of six plants.

recovery phase (+Pi), compared to wild-type plants (Fig. 5). There is a less significant difference regarding SO₄ concentrations in the roots of the lines tested. No significant changes were recorded for other inorganic (i.e. nitrate) and organic anions (i.e. malate) in shoots or roots of the transgenic lines, in comparison to wild-type plants (data not shown). Therefore, these data demonstrate that the over-expression of PHY-US417 in P-limited *Arabidopsis* plants, affects inter-organ distribution of two essential macronutrients, Pi and SO₄.

Expression of phosphate and sulfate transporters is up-regulated in the PHY-US417 transgenic lines

To better understand the underlying molecular mechanisms by which the reduction of the PA levels in the PHY-over-expressors affects Pi and SO₄ inter-organ distribution, we performed expression analysis of a subset of transporters: *PHT1,1*, *PHT1,4*, *PHO1*, and *PHO1,H1* (for Pi) (Misson et al. 2004, Shin et al. 2004, Stefanovich et al. 2007) and *SULTR1,1* and *SULTR1,2* (for SO₄) (Yoshimoto et al. 2002). This expression analysis included also the nitrate (NO₃) uptake transporters, *NRT1,1* and *NRT2,1*, (Forde 2000, Tsay et al. 2007) as well as *IRT1* gene which is involved in Fe uptake (Vert et al. 2002). Both transgenic lines (L7 and L9), the *ipk1-1* mutant and wild-type plants were grown under -Pi conditions for 15 days and then transferred to standard conditions (+Pi) for 10 days, and the mRNA accumulation levels of these root transporters were determined by quantitative RT-PCR as described by Rouached et al. (2008). The transcript abundances of the *PHT1,1*, *PHT1,4*, and *PHO1,H1*, but not *PHO1*, show an up-regulation in both L7 and L9 transgenic lines compared to wild-type plants (Fig. 6). Also, the transcript accumulation of *SULTR1,2*, but not *SULTR1,1*, increases in these lines. No significant changes in the expression levels of the two tested NO₃

transporters, and of the *IRT1* gene, were observed. This result clearly indicates that the over-expression of PHY-US417, and consequently the reduction of PA levels, may affect both the Pi and SO₄ transport systems in *Arabidopsis*. Of note, the *ipk1-1* mutant shows expression patterns similar to those observed with both transgenic lines, which strongly suggests that the PA is involved in the signaling cascades regulating the expression of a subset of genes involved in Pi and SO₄ transport in the plant.

The over-expression of the PHY-US417 gene affects phosphate sensing and signalling in plants

Because the L7 and L9 transgenic lines appear to have altered Pi homeostasis (similar to the *ipk1-1* mutant), and show a greater root growth capacity after Pi-starvation, we were interested to see whether the sensitivity to extracellular Pi supply was also altered. Seeds from the PHY-US417 over-expressor lines, the *ipk1-1* mutant, and wild-type plants were germinated in a vertical position on low-P MS medium for 5 d and then transferred to Pi-containing MS medium (+1 mM Pi) for five additional days. Subsequently, light microscopy observations of root sections revealed that both transgenic lines and the *ipk1-1* mutant produce long and numerous root hairs, which were completely absent on the roots of wild type plants (Fig. 7A). These data, which are in line with those reported for the *ipk1-1* mutant (Stevenson-Paullik et al. 2005), strongly suggest that the over-expression of this bacterial phytase reduces the capacity of *Arabidopsis* to sense extracellular Pi levels, since L7 and L9 transgenic lines are unable to form shorter root hairs at higher Pi concentrations. To strengthen our hypothesis, we further analysed the transcript accumulation of the two Pi starvation induced non coding RNAs, *IPS1* and *AT4*, in the PHY-US417 transgenic lines and *ipk1-1* mutant in comparison to wild type plants grown on standard media (1 mM Pi). Interestingly, our results showed that compared to wild type plants, these marker genes are both induced in the transgenic lines albeit to lower levels than in the *ipk1-1* mutant (Fig. 7B). Therefore, this finding reinforces the idea that lowering PA levels, either in the PHY-US417 over-expressing lines or in the *ipk1-1* mutant affects Pi signaling in *Arabidopsis*.

Discussion

A comprehensive understanding of the role of PA in plant biology is of a great scientific interest, with implications for biotechnological and agronomic strategies aimed at reducing PA levels in the grain. PA is known as the storage compound of phosphorus in seeds. Divergent effects of lowering the PA content on seed germination potential have been reported (Nunes et al. 2006, Kuwano et al. 2009, Campion et al. 2009, Doria et al. 2009, Nusrat et al. 2013, Zhao et al. 2013). In this study, we have generated *Arabidopsis* transgenic lines compromised in their ability to accumulate PA by the over-expression of an intracellular form of the *B. subtilis* phytase PHY-US417. Interestingly, the decrease in PA levels in PHY-US417 transgenic seeds did not alter the germination potential, and even resulted in a better

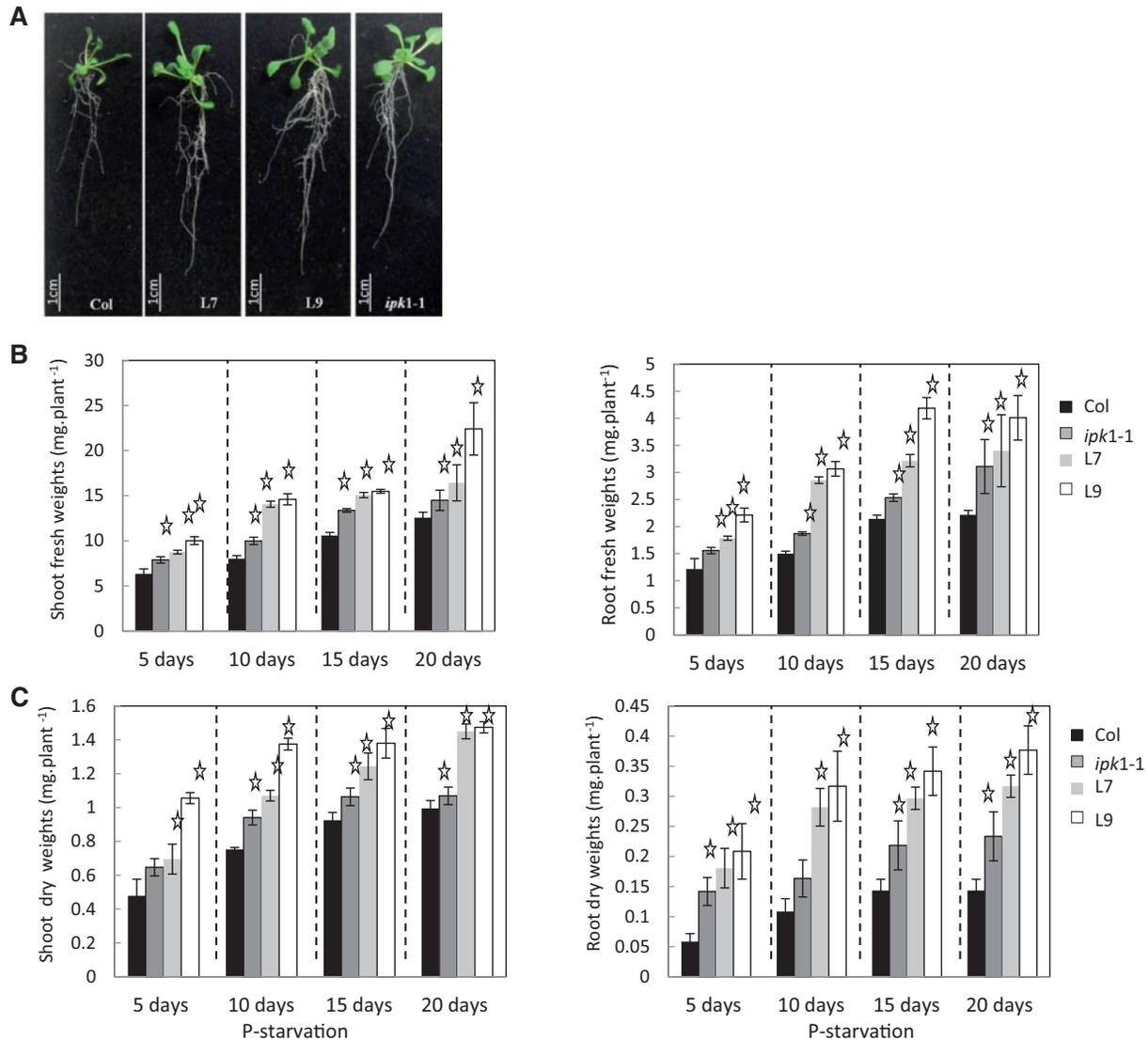


Fig. 3 Growth performance of *Arabidopsis* PHY-US417 over-expressing lines grown under Pi-limited conditions. Seedlings germinated on Pi deficient MS medium (–Pi) were transferred after 5, 10, 15 or 20 d, to standard MS plates (+Pi) and grown for additional 10 d. (A) Photographs of representative wild-type (Col), *ipk1-1* mutant and transgenic lines (L7, L9) were taken 10 d after transfer to MS medium (+Pi), following their growth on low-P medium for 15 d. (B), (C) Fresh and dry weights of shoots and roots of WT, *ipk1-1* mutant and L7 and L9 lines which were grown on low-P medium for 5 to 20 d as indicated, and then transferred to MS medium for 10 d. Mean \pm SD is shown for three replicates. Stars indicate a statistically significant difference ($P < 0.05$).

seedling establishment. So far, only few studies have described normal seed germination behavior in plants accumulating lower levels of PA. In rice, silencing of the *IPK1* gene can mediate a substantial reduction in seed PA levels without negatively affecting the growth and development of transgenic plants (Ali et al. 2013). In *Arabidopsis*, the *ipk1* mutation causes a severe decrease in PA level without altering the kinetics of seed germination or the cotyledon's appearance (Stevenson-Paulik et al. 2005). So far, the transgenic lines reported in this study, together with the *ipk1-1* mutant, offer a good opportunity to assess the biological role of PA in seed germination in *Arabidopsis*.

PA is a natural cation chelator (Borg et al. 2009), because of its negatively charged Pi side groups. It is generally assumed that

the appropriate release of essential ions during seed germination is crucial to determine seedling vigor. Interestingly, the PHY-US417 transgenic lines, as well as the *ipk1-1* mutant, show a stronger remobilization of Fe during germination compared to wild type (Fig. 4). Therefore, it is tempting to propose that reduction of PA level leads to an increase in the proportion of bio-available Fe in the endosperm, hence improving seedling establishment. Although the site of Fe storage is now well described in *Arabidopsis* embryos, the chemical form of this vacuolar pool of Fe remains unknown (Roschztardt et al. 2009). Nevertheless, the co-localization of Fe and P atoms in globoids inside the storage vacuoles (Lanquar et al. 2005) has led these authors to propose that Fe may be bound to PA and thus that during germination, the remobilization of Fe may

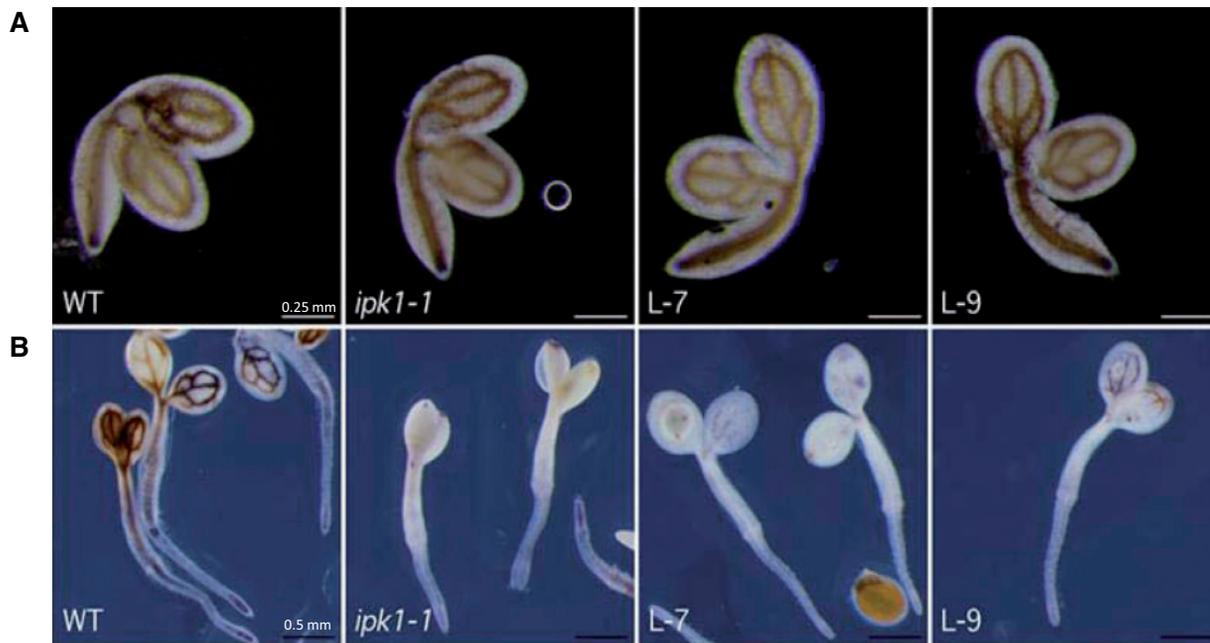


Fig. 4 Fe remobilization is faster in low phytate mutants during germination. Fe was stained with Perls/DAB in mature embryos extracted from dry seeds (upper panels) or in 2-day-old seedlings (of wild type, *ipk1-1*, and transgenic lines L7 and L9) after germination in liquid medium without Fe (lower panels).

require specific biochemical processes to release Fe atoms from this type of ligand. Although not demonstrated in the present report, the increased remobilization of Fe in mutants affected in their PA content is a strong indication that in the globoids, Fe is associated to PA and that specific enzymes may be required to allow the correct solubilization of Fe before its efflux from the vacuole (Lanquar et al. 2005). Taken together, these results suggest that the normal germination potential and the growth promotion observed in the transgenic lines described here may be due to the phytase activity of PHY-US417, which by PA hydrolysis can reduce the harmful effects of PA linked to its binding capacity to essential cations for plant metabolism, such as Fe (Raboy et al. 2009). This finding represents the first experimental illustration for a link between PA and Fe remobilization during seedling establishment.

The regulation of plant growth is a complex process and involves several phytohormones, such as auxin, which may interact with PA. It has been reported that auxin response mutants, *axr1* and *aux1*, affect plant development and particularly root growth (Pitts et al. 1998). Interestingly, a link between PA and auxin has been established, since PA was found in crystals of the auxin receptor TIR1, and discussed as potent functional cofactor, but its precise role remains to be confirmed (Tan et al. 2007). Similarly inositol pentakisphosphate (InsP₅) was found to be a cofactor of jasmonate receptor COI (Sheard et al. 2010). Therefore, the high affinity of PA and InsP₅ with two homologous plant hormone receptors, COI1 and TIR1, offers profound implications for the role of inositol polyphosphates in plant hormone signaling. In our study, whether the alteration in PA concentration in the transgenic lines expressing the PHY-US417 gene interferes with auxin and or jasmonate

biosynthesis or responses (which ultimately may improve plant growth), requires further investigation.

On the other hand, regulation of ion homeostasis plays a key role in determining plant growth and responses to various environmental stresses. Results presented here provide lines of evidence that the heterologous expression of an intracellular phytase can improve *Arabidopsis* growth capacity under nutritional stress, namely Pi deficiency, without any apparent negative traits. The low-PA transgenic lines, L7 and L9, exhibit better growth under Pi-starvation compared to the control, as they appear more vigorous with expanded roots and shoots after stress recovery, suggesting a potential role for PA in the response of plants to Pi availability. The majority of low-PA mutants (i.e. *Atipk1-1* mutant) described in the literature exhibited an increase in inorganic phosphate, which is in favor of improving the availability of Pi and other micronutrients, such as Fe that are chelated by PA. The current study further supports this general observation (Fig. 4 and Fig. 5). Of note, the PHY-US417 over-expressing lines show an increase of intracellular Pi and SO₄ concentrations in their shoots, under Pi-starvation, indicating an apparent defect in the 'rheostat' that monitors the Pi and SO₄ status of the leaves. Once transferred to standard conditions, the shoot Pi and SO₄ concentrations levels remains higher in *ipk1-1* mutant and transgenic lines in comparison to wild type. The observed increase in the expression of genes involved in Pi and SO₄ transport is consistent with the accumulation of Pi and SO₄ in the shoot of the PHY-over-expressors and *ipk1-1* mutant. An interaction between SO₄ and Pi homeostasis has been reported (Rouached et al. 2011), but no metabolite has yet been identified in higher plants that affects, at gene expression and physiological levels,

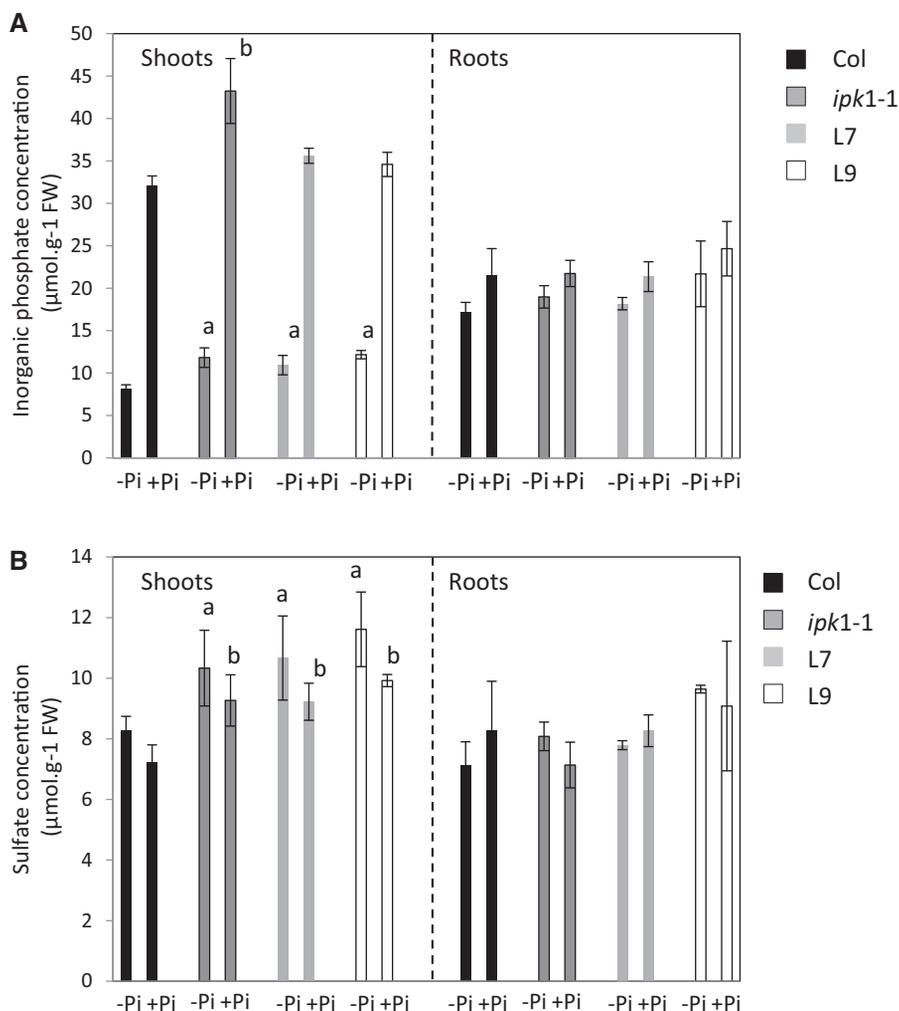


Fig. 5 Effect of the over-expression of PHY-US417 in *Arabidopsis* on organ phosphate and sulfate concentrations. Wild-type plants (Col-0), *ipk1-1*, as well as the PHY-US417 transgenic lines were grown on medium containing low Pi (-Pi) for 15 d, followed by additional 10 days in media containing 1 mM Pi (+Pi). Shoots and roots were harvested separately and anion concentrations expressed as $\mu\text{mol}\cdot\text{gFW}^{-1}$, were quantified by HPLC. Individual measurements performed before (-Pi) and after (+Pi) transfer of seedlings to MS containing 1 mM of Pi, were obtained from the analysis of shoots or roots collected separately from three biological repeats. Each repeat was obtained from the analysis of shoots and roots collected from a pool of six plants. Error bars indicate SD; (a) and (b) are values significantly different ($P < 0.05$) from WT plants.

the response to both elements. Our finding introduces PA as an attractive candidate for controlling Pi and SO_4 transport and homeostasis. PA is known to accumulate in large amounts in seeds but much less in other organs including leaves (Bentsink et al. 2003, Raboy 2003). It has been also shown that PA synthesis can occur in vacuoles of cell suspension cultures (Mitsuhashi et al. 2005). In this work, we showed that the PA levels decrease in the seeds of PHY-over-expressors. Whether PA contents are also affected in other organs of these transgenic lines, remains to be determined. Although PA concentrations in mature roots/shoots were not detected by the method used, the results indicated that the modulation of PA levels may affect directly or indirectly the expression of P-related genes and root architectural traits. It is likely that such effects could be due not only to Pi mobilization but also to regulatory, and in particular hormonal networks.

In addition, it appears that low-PA transgenic lines L7 and L9 are affected in Pi sensing. Indeed, the microscopic analysis

revealed that in contrast to wild-type plants, the roots of both transgenic lines develop root hairs even when Pi was supplied in the media. These observations are in line with the previous report by Stevenson-Paulik et al. (2005). Taken together, these results strongly suggest that low PA levels interfere with the regulation of Pi sensing. The Pi signaling is also altered in these lines, since the expression of *IPS1* and *AT4* genes is up-regulated in the roots of the transgenic lines grown under standard conditions whereas in wild type plants, both genes are only induced under Pi-starvation (Burleigh and Harrison 1999, Liu et al. 1997). It is worth to note that *IPS1* and *AT4* genes are also known to interfere with the shoot-to-root Pi distribution (Shin et al. 2006). In this context, given their similar phenotypes, it will be interesting to explore a possible genetic interaction between *Arabidopsis at4* or *ips1* and the low PA lines.

In conclusion, this report demonstrates that the bacterial phytase PHY-US417 is effective in *Arabidopsis* and its expression leads to a significant decrease in the seed PA content, without

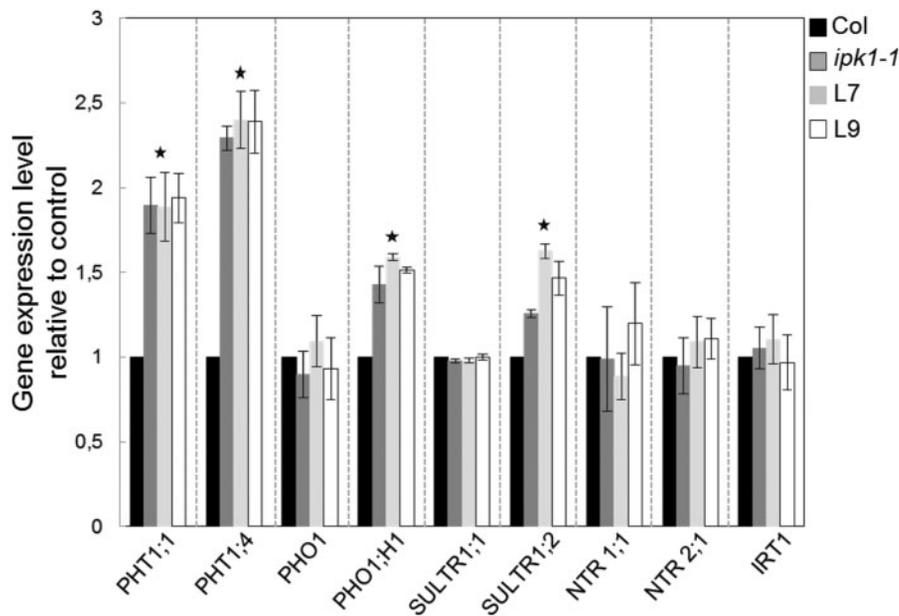


Fig. 6 Effect of the over-expression of PHY-US417 in *Arabidopsis* on the expression of a sub-set of phosphate, sulfate, and nitrate transporter encoding genes. Expression levels of phosphate (PHT1; 1, PHT1; 4, PHO1 and PHO; H1), sulfate (SULTR1; 1 and SULTR1; 2), nitrate (NRT1; 1 and NRT2; 1) and iron (IRT1) transporter genes were analysed in the transgenic lines (L7 and L9) and in the *ipk1-1* mutant in comparison to wild-type plants. Plants were grown on Pi-limited conditions for 15 d and then transferred to MS medium containing 1 mM of Pi for 10 additional days. Roots were harvested and the mRNA accumulation inferred from quantitative PCR analysis. Individual measurements were obtained from the analysis of roots collected from pools of five plants. Transcript levels were normalized to the level of the control ubiquitin10 mRNA (UBQ10: At4g05320). Error bars correspond to SD of three biological repeats and each repeat was obtained from the analysis of roots collected from a pool of six plants.

any effect on the seed germination potential. Such a feature would encourage exploiting this bacterial phytase as a biotechnological means for sustainable and environmentally friendly agriculture. The data presented here strongly support an active role of PA in the regulation of Pi and SO₄ homeostasis including transport and signaling. The future challenge will be to develop a comprehensive understanding of the role of PA in the acquisition and assimilation of these two elements by discovering new regulatory networks. Therefore, this knowledge will be certainly valuable not only for an effective and a more targeted approach to engineering low-phytate crops, but also to fully appreciate the role of PA in the regulation of plant physiology and metabolism.

Materials and Methods

Plant material, growth conditions and P-stress treatments

Seeds of *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia (Col-0) (used as a wild-type control for all experiments), transgenic lines expressing PHY-US417 gene (see below) and the *ipk1-1* mutant (Stevenson-Paulik et al. 2005) were used in these experiments. Seeds were sterilized with 70% ethanol for 5 min and with 5% bleach for 15 min, rinsed five times with sterile water and plated on MS medium agar with 1% sucrose and 0.8% (w/v) agar (Sigma, A1296) under a photoperiod of light/dark cycle of 8 h/16 h, light intensity of 250 μmol m⁻² s⁻¹, and temperature of 22–24°C.

For growth analyses under low phosphate conditions, 7-day-old wild-type seedlings grown on MS agar medium (Murashige and Skoog 1962) were transferred onto the following media: standard MS medium (with 1 mM KH₂PO₄) or

low-P MS medium (with 5 μM KH₂PO₄) in which Pi was replaced with 0.33 mM PA without or with added phytase PHY-US417 (6.5U) purified as previously described (Farhat et al. 2008).

For recovery tests, seedlings were first grown on low-P MS medium for 5, 10, 15 or 20 d and then transferred carefully to complete MS medium for 10 d. After photo documentation, the plant materials (shoots and roots) were collected for fresh and dry weight determinations, as well as quantitative real-time PCR and High-Performance Ion Chromatography (HPIC) analyses.

For light microscopy, seedlings were grown on vertical plates on low-P medium for 5 days and then transferred to MS medium for further 5 d. Then roots were regularly scanned using an Epson Perfection 1240U scanner.

Molecular cloning and generation of transgenic plants

The nucleotide sequence encoding the mature form of the phytase PHY-US417 (accession no. AM501550) of *Bacillus subtilis* (Farhat et al. 2008) was amplified by PCR with PfuTurbo DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA), using the PHYC-Bg (5'GCAGATCTATGTCGCCATCCTTATCATTTTACC3'), and PHYC-Sp (5'GCACTA-GTTTATTTCCGCTTCTGTCGGTC3') primers, which harbour the BglII and SpeI restriction sites respectively. An ATG start codon was introduced into the forward primer PHYC-Bg, immediately upstream the coding sequence of the mature peptide. The amplified fragment was first subcloned into the pGEM-T easy cloning vector (Promega) and then introduced as BglII-SpeI fragment into the pCambia1302 binary vector between the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter and the nopaline synthase (NOS) terminator. This binary vector contains also the hygromycin resistance gene (HPT) as a selection marker. The resulting construct pC1302-phy US417 (Supplementary Fig. 1A) was used to transform *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia, Col-0) plants by floral dipping using *Agrobacterium* strain GV3101 (Clough and Bent 1998).

Transgenic plants were selected on MS agar medium supplemented with 15 μg/ml hygromycin. From 20 T1 independent transformants, six T2 lines showing a 3:1 segregation for hygromycin resistance (indicative of single

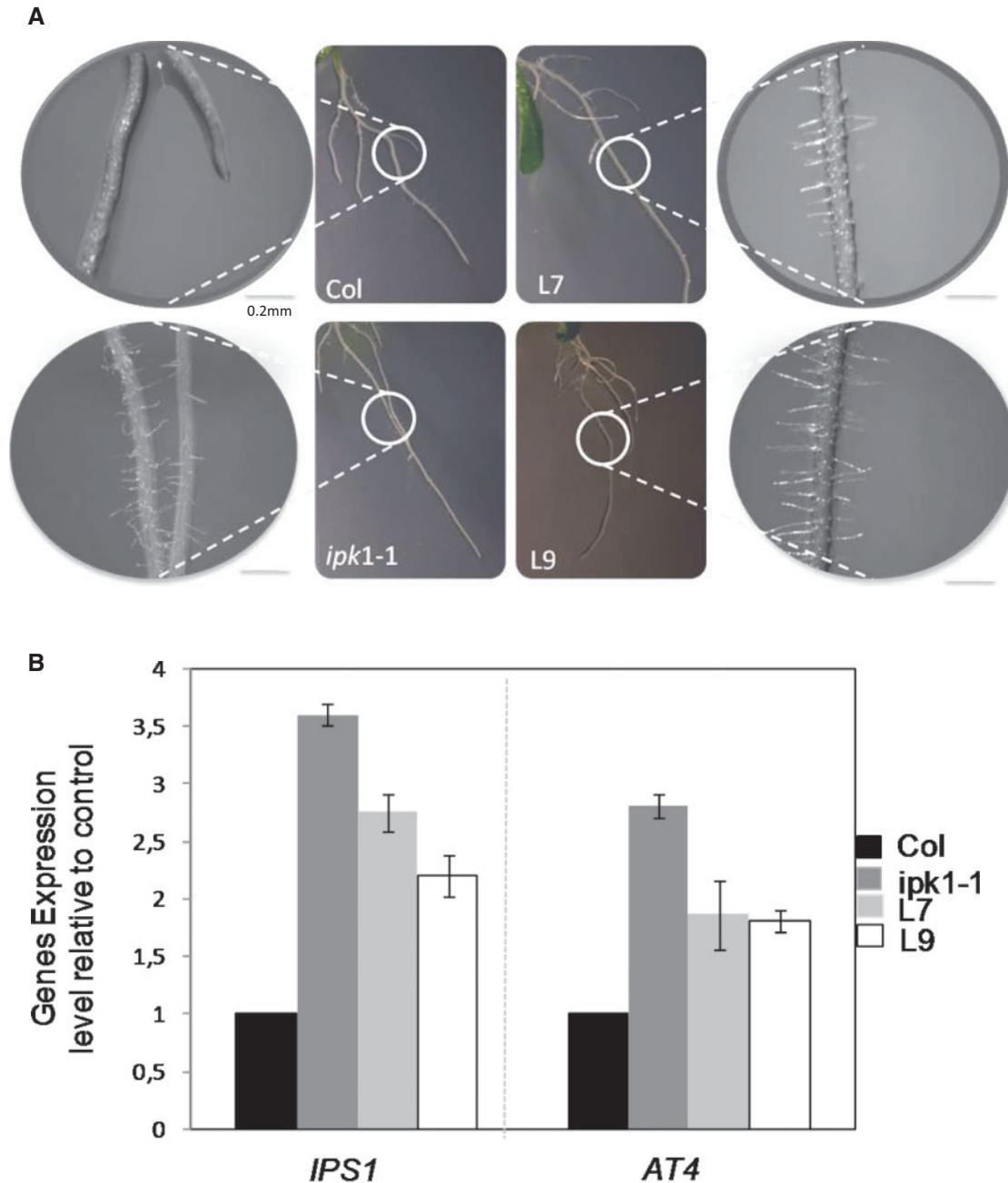


Fig. 7 The over-expression of *PHY-US417* gene alters Pi sensing and signaling in *Arabidopsis*. (A) Representative images of primary root and root hairs of 10-day-old Wild-type (Col), *ipk1-1* mutant and *PHY-US417* over-expressor lines L7 and L9 grown for 5 d on MS +Pi after 5 d on low-P medium. Images were taken by light microscopy (Olympus Soft imaging system). The root segments chosen for examination of root hair formation are indicated in additional windows. (B) Expression levels of two phosphate starvation induced non-coding RNAs, *IPS1* and *AT4*, determined by quantitative RT-PCR from 10-old seedlings grown as described in (A). Transcript levels were normalized to the level of the control ubiquitin-10 mRNA (*UBQ10*: At4g05320). Error bars correspond to SD of three biological repeats and each repeat was obtained from the analysis of roots collected from a pool of six plants.

transgene insertion) were grown up to T3 generation to identify plants homozygous for the transgene and from which two lines, L7 and L9, were chosen for further detailed molecular and physiological analyses.

Molecular characterization of transgenic lines

Genomic DNA was prepared from fresh leaves of independent transformants. The presence of *PHY-US417* and *HPT* genes was verified by PCR screening. The forward and reverse primers for *HPT* gene were HPTIF (5'ATGAAAAAGCCTGAAC

AC3') and HPTIR (5'CTCT-ATTCTTTGCCCTCG3'), and those for the *PHY-US417* gene were PHYC-Bg and PHYC-Sp.

To perform expression analysis by RT-PCR, total RNA was first extracted from 200 mg of 2-week-old seedlings of wild type *Arabidopsis* and transgenic lines using Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. To remove contaminating DNA, RNAs were treated with DNaseI (Promega) at 37°C for 15 min. DNase-treated RNA samples (2 µg) were reverse-transcribed using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). The reverse transcription (RT)

reactions were performed at 37°C for 1 h using 2 µM oligo-dT18. Two micro-litres of first strand cDNAs were employed as a template for PCR amplifications with a pair of *PHY-US417*-specific primers, PHYC-Bg/PHYC-Sp or HPT-specific primers HPTIF/HPTIIR. An *Arabidopsis* Actin gene fragment, used as an internal control, was amplified with the primers: ActF: 5'GGCGATGAAGCTCAA TCCAAACG-3' and ActR: 5'GGTCACGACCAGCAAGATCAAGACG-3'. For PCR reactions, samples were denatured for 5 min at 94°C and then run for 30 cycles of 30 sec at 94°C, 1 min at 56°C, and 30 sec at 72°C with a final extension of 5 min at 72°C. Finally, the RT-PCR products were separated by agarose gel electrophoresis.

Quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated from frozen root tissues of *Arabidopsis* plants using the RNeasy Plant mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. RNA samples were quantified with Nano Drop spectrophotometer (Thermo Scientific) and cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA using an oligo(dT) primer and M-MLV reverse transcriptase (Promega). Quantitative real-time RT-PCR was performed with the LightCycler[®] 480 Real-Time PCR System (Roche) using SYBR green dye technology. PCR reactions were done in a 10 µl containing 500 nM of each forward and reverse primers, 5 µl of the SYBER green I master and 1 µl of 1:3 cDNA dilution. Reactions were performed in lightCyber[®] 480 Multiwell Plates 384 (Roche) covered with optical film (Sarstedt). Specific primers used for quantitative real-time RT-PCR analysis are described in Pfaffl *et al.* (2002) and Rouached *et al.* (2008). All mRNA levels were calculated from threshold cycle values (C_T , Livak and Schmittgen, 2001) and as relative to controls and normalized with respect to Ubiquitin 10 (UBQ10) transcript levels according to Gruber *et al.* (2001).

Phytase activity assay

Phytase activity was estimated colorimetrically by monitoring the release of Pi from PA (Na-InsP₆, P-8810, Sigma) as previously reported (Engelen *et al.* 1994). Briefly, 2-week old seedlings (three replicates, 20 plants per replicate) were ground in a mortar and pestle at 4°C with three volumes (v/w) of MES/Ca buffer (15 mM MES buffer with 0.5 mM CaCl₂, pH 7.5) containing 1 mM EDTA. Extracts were then centrifuged for 10 min at 12,000 g and from which 100 µg were reacted at 55°C for 30 min in a 100 mM NaOAc (pH 7.5) assay buffer containing 2 mM PA as a substrate. The reaction was terminated with the addition of an equal volume of 10% (w/v) trichloroacetic acid. The released Pi was quantified spectrophotometrically at 820 nm with molybdate-blue method (Murphy and Riley, 1962). Background readings due to Pi contamination (time 0) were subtracted before calculation. One unit (U) of phytase is the activity that releases 1 µmol of phosphate per minute under these assay conditions. The protein concentrations were determined according to Bradford method (1976) using bovine serum albumin as a standard.

Phytic acid measurement

The seed PA contents were determined by colorimetric method as described previously (Haug and Lantzsch, 1983). Four mg of seeds were extracted with 0.4 N HCl during 3.5 h with constant stirring at room temperature (RT). The extract was transferred into a glass tube with a stopper ammonium iron (III)-sulfate solution (0.02% NH₄Fe(III)-sulfate in 0.2 N HCl). Next, the mixture was heated at 95°C for 30 min and cooled on ice for 15 min, followed by an incubation at RT for 20 min. Then, the mix was centrifuged at 4000 g at room temperature for 30 min and the supernatant was transferred to another glass tube to which 1% (w/v) 2,2'-bipyridine in 1% (v/v) thioglycolic acid was added. After a defined time, absorbance was measured at 519 nm.

High-performance ion chromatography analysis

Anion content measurements were performed as described by Rouached *et al.* (2008). Briefly, after determining the mass of the fresh shoot and root materials, anions were extracted by incubating the tissue in Milli-Q water heated at 70°C for 60 min. The extract was centrifuged for 10 min at maximum speed, and the supernatants were passed through 0.2 µm filters. Anion content of the final clear supernatant was determined by HPIC (LC20 Dionex) using an IonPac AS11

column and a sodium hydroxide linear gradient (Rouached *et al.* 2008). The identification and quantification of each anion were performed using the Chromeleon software (Dionex).

Iron histochemical detection

Embryos were dissected from dry seeds after 2 h of imbibition in water. Seedlings were germinated on half-strength MS medium without sucrose and Fe and grown for 2 d at 21°C in long days (16 h light). For Fe histochemical detection, mature embryos and 2-day-old seedling were stained using the Perls/DAB procedure described by Roschttardt *et al.* (2009). The presence of Fe is revealed as brown pigments.

Statistical analyses

Statistical analyses of the data were performed using analysis of variance (ANOVA) and the Tukey's test to compare mean values. Only differences with P values < 0.05 were considered as significant.

Supplementary data

Supplementary data are available at PCP online.

Funding

This work was supported by grants provided by the Ministry of Higher Education and Scientific Research (Tunisia) and the Institut National de la Recherche Agronomique (France).

Acknowledgments

Authors would like to thank Drs Zaigham Shahzad and Sikander Chowdhary for their critical reading of this manuscript.

References

- Ali, N., Paul, S., Gayen, D., Sarkar, S.N., Datta, S.K. and Datta, K. (2013a) RNAi mediated down regulation of myo-inositol-3-phosphate synthase to generate low phytate rice. *Rice* 6: 12.
- Ali, N., Paul, S., Gayen, D., Sarkar, S.N., Datta, K. and Datta, S.K. (2013b) Development of low phytate rice by RNAi mediated seed-specific silencing of inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase gene (IPK1). *PLoS one* 8: e68161.
- Bali, A. and Satyanarayana, T. (2001) Microbial phytases in nutrition and combating phosphorus pollution. *Everyman's Sci.* 4: 207–209.
- Bari, R., Datt Pant, B., Stitt, M. and Scheible, W.R. (2006) PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol.* 141: 988–999.
- Bentsink, L., Yuan, K., Koornneef, M. and Vreugdenhil, D. (2003) The genetics of phytate and phosphate accumulation in seeds and leaves of *Arabidopsis thaliana*, using natural variation. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1234–1243.
- Bilyeu, K.D., Zeng, P., Coello, P., Zhang, Z.J., Krishnan, H.B., Bailey, A. *et al.* (2008) Quantitative conversion of phytate to inorganic phosphorus in soybean seeds expressing a bacterial phytase. *Plant Physiol.* 146: 468–477.
- Borg, S., Brinch-Pedersen, H., Tauris, B. and Holm, P.B. (2009) Iron transport, deposition and bioavailability in the wheat and barley grain. *Plant Soil* 325: 15–24.
- Bouain, N., Shahzad, Z., Rouached, A., Khan, G.A., Berthomieu, P., Abdely, C., Poirier, Y. and Rouached, H. (2014) Phosphate and zinc

- transport and signalling in plants: toward a better understanding of their homeostasis interaction. *J Exp Bot. in press*.
- Bournier, M., Tissot, N., Mari, S., Boucherez, J., Lacombe, E., Briat, J.F. and Gaymard, F. (2013) Arabidopsis FERRITIN 1 (AtFer1) gene regulation by the PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 (AtPHR1) transcription factor reveals a direct molecular link between iron and phosphate homeostasis. *J. Biol. Chem.* 288: 22670–22680.
- 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.
- Brinch-Pedersen, H., Sørensen, L.D. and Holm, P.B. (2002) Engineering crop plants: getting a handle on phosphate. *Trends Plant Sci.* 7: 118–125.
- Brinch-Pedersen, H., Hatzack, F., Sorensen, L.D. and Holm, P.B. (2003) Concerted action of endogenous and heterologous phytase on phytic acid degradation in seed of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Transgenic Res.* 12: 649–659.
- Burleigh, S.H. and Harrison, M.J. (1999) The down-regulation of Mt4-like genes by phosphate fertilization occurs systemically and involves phosphate translocation to the shoots. *Plant Physiol.* 119: 241–248.
- Campion, B., Sparvoli, F., Doria, E., Tagliabue, G., Galasso, I., Fileppi, M. et al. (2009) Isolation and characterisation of an lpa (low phytic acid) mutant in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet.* 118: 1211–1221.
- Chiera, J.M., Finer, J.J. and Grabau, E.A. (2004) Ectopic expression of a soybean phytase in developing seeds of Glycine max to improve phosphorus availability. *Plant Mol. Biol.* 56: 895–904.
- Doria, E., Galleschi, L., Calucci, L., Pinzino, C., Pilu, R., Cassani, E. et al. (2009) Phytic acid prevents oxidative stress in seeds: evidence from a maize (*Zea mays* L.) low phytic acid mutant. *J. Exp. Bot.* 60: 967–978.
- Drakakaki, G., Marcel, S., Glahn, R.P., Lund, E.K., Pariagh, S., Fischer, R. et al. (2005) Endosperm-specific co-expression of recombinant soybean ferritin and Aspergillus phytase in maize results in significant increases in the levels of bioavailable iron. *Plant Mol. Biol.* 59: 869–880.
- Engelen, A.J., van der Heeft, F.C., Randsdorp, P.H. and Smit, E.L. (1994) Simple and rapid determination of phytase activity. *J. AOAC Int.* 77: 760–764.
- Farhat, A., Chouayekh, H., Ben Farhat, M., Bouchaala, K. and Bejar, S. (2008) Gene cloning and characterization of a thermostable phytase from *Bacillus subtilis* US417 and assessment of its potential as a feed additive in comparison with a commercial enzyme. *Molecular Biotech.* 40: 127–135.
- Forde, B.G. (2000) Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1465: 219–235.
- Greiner, R., Lim, B.L., Cheng, C. and Carlsson, N.G. (2007) Pathway of phytate dephosphorylation by beta-propeller phytases of different origins. *Can. J. Microbiol.* 53: 488–495.
- Gruber, F., Falkner, F.G., Dorner, F. and Hämmerlee, T. (2001) Quantitation of viral DNA by real-time PCR applying duplex amplification, internal standardization, and two-color fluorescence detection. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2837–2839.
- Guttieri, M., Bowen, D., Dorsch, J., Raboy, V. and Souza, E. (2004) Identification and characterization of a low phytic acid wheat. *Crop Sci.* 44: 418–424.
- Haug, W. and Lantzsch, H. (1983) Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. *J. Sci. Food Agric.* 34: 1423–1426.
- Idriss, E.E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H. et al. (2002) Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology* 148: 2097–2109.
- Kerovuo, J., Rouvinen, J. and Hatzack, F. (2000) Analysis of myo-inositol hexakisphosphate hydrolysis by *Bacillus* phytase: indication of a novel reaction mechanism. *Biochem J.* 352: 623–628.
- Kim, S.I. and Tai, T.H. (2011) Identification of genes necessary for wild-type levels of seed phytic acid in *Arabidopsis thaliana* using a reverse genetics approach. *Mol. Genet. Genomics* 286: 119–133.
- Kim, S.I., Andaya, C.B., Goyal, S.S. and Tai, T.H. (2008a) The rice *OsLpa1* gene encodes a novel protein involved in phytic acid metabolism. *Theor. Appl. Genet.* 117: 769–779.
- Kim, S.I., Andaya, C.B., Newman, J.W., Goyal, S.S. and Tai, T.H. (2008b) Isolation and characterization of a low phytic acid rice mutant reveals a mutation in the rice orthologue of maize MIK. *Theor. Appl. Genet.* 117: 1291–1301.
- Kuwano, M., Mimura, T., Takaiwa, F. and Yoshida, K.T. (2009) Generation of stable 'low phytic acid' transgenic rice through antisense repression of the 1D-myo-inositol 3-phosphate synthase gene (RINO1) using the 18-kDa oleosin promoter. *Plant Biotech. J.* 7: 96–105.
- Kuwano, M., Ohshima, A., Tanaka, Y., Mimura, T., Takaiwa, F. and Yoshida, K.T. (2006) Molecular breeding for transgenic rice with low phytic acid phenotype through manipulating myo inositol 3 phosphate synthase gene. *Mol. Breeding* 18: 263–272.
- Lanquar, V., Lelievre, F., Bolte, S., Hames, C., Alcon, C., Neumann, D. et al. (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *The EMBO J.* 24: 4041–4051.
- Larson, S., Rutger, J., Young, K. and Raboy, V. (2000) Isolation and genetic mapping of a non-lethal rice (*Oryza sativa* L.) low phytic acid 1 mutation. *Crop Sci.* 40: 1397–1405.
- Lei, X., Weaver, J., Mullaney, E., Ullah, A. and Azain, M. (2013) Phytase, a new life for an "old" enzyme. *Ann. Rev. Ani. Bios.* 1: 283–309.
- Li, W.X., Zhao, H.J., Pang, W.Q., Cui, H.R., Poirier, Y. and Shu, Q.Y. (2014) Seed-specific silencing of OsMRP5 reduces seed phytic acid and weight in rice. *Transgenic Res* 23: 585–599.
- Lin, S.I., Chiang, S.F., Lin, W.Y., Chen, J.W., Tseng, C.Y., Wu, P.C. et al. (2008a) Regulatory network of microRNA399 and PHO2 by systemic signaling. *Plant Physiol.* 147: 732–746.
- Lin, W.Y., Huang, T.K., Leong, S.J. and Chiou, T.J. (2014) Long-distance call from phosphate: systemic regulation of phosphate starvation responses. *J. Exp Bot.* 65: 1817–1827.
- Liu, C., Muchhal, U.S. and Raghothama, K.G. (1997) Differential expression of TPS11, a phosphate starvation-induced gene in tomato. *Plant Mol. Biol.* 33: 867–874.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta T}$ Method. *Methods* 25: 402–408.
- Lott, J.N.A. and West, M.M. (2001) Elements present in mineral nutrient reserves in dry *Arabidopsis thaliana* seeds of wild type and *pho1*, *pho2*, and *man1* mutants. *Can. J. Bot.* 79: 1292–1296.
- Lucca, P., Hurrell, R. and Potrykus, I. (2001) Genetic engineering approaches to improve the bioavailability and the level of iron in rice grains. *Theor. Appl. Genet.* 102: 392–397.
- Lung, S.C., Chan, W.-L., Yip, W., Wang, L., Yeung, E. and Lim, B. (2005) Secretion of beta-propeller phytase from tobacco and *Arabidopsis* roots enhances phosphorus utilisation. *Plant Sci.* 169: 341–349.
- Lung, S.C., Leung, A., Kuang, R., Wang, Y., Leung, P. and Lim, B.L. (2008) Phytase activity in tobacco (*Nicotiana tabacum*) root exudates is inhibited by a purple acid phosphatase. *Phytochemistry* 69: 365–373.
- Maga, J. (1982) Phytate: Its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. *J. Agric. Food Chem.* 30: 1–9.
- Marschner, H. (1995) Mineral nutrition of higher plants. 2nd edn, 889 pp. Academic Press, London.
- Misson, J., Thibaud, M.C., Bechtold, N., Raghothama, K. and Nussaume, L. (2004) Transcriptional regulation and functional properties of *Arabidopsis* Pht1,4, a high affinity transporter contributing greatly to phosphate uptake in phosphate deprived plants. *Plant Mol. Biol.* 55: 727–741.
- Mitsuhashi, N., Ohnishi, M., Sekiguchi, Y., Kwon, Y.U., Chang, Y.T., Chung, S.K., Inoue, Y., Reid, R.J., Yagisawa, H. and Mimura, T. (2005) Phytic acid synthesis and vacuolar accumulation in suspension-cultured

- cells of *Catharanthus roseus* induced by high concentration of inorganic phosphate and cations. *Plant Physiol.* 138: 1607–1614.
- Murphy, J. and Riley, J.P. (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal.Chim. Act.* 27: 31–36.
- Nunes, A.C., Vianna, G.R., Cuneo, F., Amaya-Farfan, J., de Capdeville, G., Rech, E.L. et al. (2006) RNAi-mediated silencing of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene (GmMIPS1) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content. *Planta* 224: 125–132.
- Nys, Y., Frapin, D. and Pointillart, A. (1996) Occurrence of phytase in plants, animals, and microorganisms. In *Phytase in Animal Nutrition and Waste Management*. Edited by M. B. Coelho and E. T. Kornegay. A BASF Reference Manual, pp. 213–240. BASF Corporation, Mt. Olive, New Jersey.
- Nussaume, L., Kanno, S., Javot, H., Marin, E., Nakanishi, T.M. and Thibaud, M.C. (2011) Phosphate import in plants: focus on the PHT1 transporters. *Front Plant Sci.* 2: 1–8.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. and Dempfle, L. (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucl. Acids Res.* 30: e36.
- Pilu, R., Panzeri, D., Gavazzi, G., Rasmussen, S.K., Consonni, G. and Nielsen, E. (2003) Phenotypic, genetic and molecular characterization of a maize low phytic acid mutant (lpa241). *TheorAppl. Genet.* 107: 980–987.
- Pitts, R.J., Cernac, A. and Estelle, M. (1998) Auxin and ethylene promote root hair elongation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 1: 553–560.
- Poirier, Y. and Bucher, M. (2002) Phosphate transport and homeostasis in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists* 1: e0024.
- Raboy, V. (2009) Approaches and challenges to engineering seed phytate and total phosphorus. *Plant Sci.* 177: 281–296.
- Raboy, V. (2006) Seed phosphorus and the development of low-phytate crops. In *Inositol Phosphates: Linking Agriculture and Environment*. Edited by Turner, B.L., Richardson, A.E. and Mullaney, E.J. pp. 111–132. CAB International, Oxfordshire, UK.
- Raboy, V. (2003) Myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochemistry* 64: 1033–1043.
- Raboy, V., Gerbasí, P., Young, K.A., Stoneberg, S., Pickett, S.G., Bauman, A.T. et al. (2000) Origin and seed phenotype of maize low phytic acid 1-1 and low phytic acid 2-1. *Plant Physiol.* 124: 355–368.
- Richardson, A.E., Hadobas, P.A. and Hayes, J.E. (2001) Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. *Plant J.* 25: 641–649.
- Robson A.D. and Pitman M.G. (1983) Interactions between nutrients in higher plants. In *Encyclopaedia of Plant Physiology*. Edited by Lauchli, A., Bielecki, R.L. vol. 15A, pp. 287–312. New series. Springer-Verlag, Berlin and New York.
- Roschzttardtz, H., Conejero, G., Curie, C. and Mari, S. (2009) Identification of the endodermal vacuole as the iron storage compartment in the *Arabidopsis* embryo. *Plant Physiol.* 151: 1329–1338.
- Rouached, H., Arpat, A.B. and Poirier, Y. (2010) Regulation of phosphate starvation responses in plants: signaling players and cross-talks. *Mol. Plant* 3: 288–299.
- Rouached, H., Secco, D., Arpat, B. and Poirier, Y. (2011) The transcription factor PHR1 plays a key role in the regulation of sulfate shoot-to-root flux upon phosphate starvation in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* 11: 19.
- Rouached, H., Wirtz, M., Alary, R., Hell, R., Arpat, A.B., Davidian, J.C. et al. (2008) Differential regulation of the expression of two high-affinity sulfate transporters, SULTR1.1 and SULTR1.2, in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 147: 897–911.
- Sheard, L.B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T.R. et al. (2010) Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* 468: 400–405.
- Shi, J., Wang, H., Schellin, K., Li, B., Faller, M., Stoop, J.M. et al. (2007) Embryo-specific silencing of a transporter reduces phytic acid content of maize and soybean seeds. *Nat Biotechnol.* 25: 930–937.
- Shi, J., Wang, H., Hazebroek, J., Ertl, D.S. and Harp, T. (2005) The maize low-phytic acid 3 encodes a myo-inositol kinase that plays a role in phytic acid biosynthesis in developing seeds. *Plant J.* 42: 708–719.
- Shi, J., Wang, H., Wu, Y., Hazebroek, J., Meeley, R.B. and Ertl, D.S. (2003) The maize low-phytic acid mutant lpa2 is caused by mutation in an inositol phosphate kinase gene. *Plant Physiol.* 131: 507–515.
- Shin, H., Shin, H.S., Chen, R. and Harrison, M.J. (2006) Loss of At4 function impacts phosphate distribution between the roots and the shoots during phosphate starvation. *Plant J.* 45: 712–726.
- Shin, H., Shin, H.S., Dewbre, G.R. and Harrison, M.J. (2004) Phosphate transport in *Arabidopsis*: Pht1,1 and Pht1,4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. *Plant J.* 39: 629–642.
- Stefanovic, A., Ribot, C., Rouached, H., Wang, Y., Chong, J., Belbahri, L. et al. (2007) Members of the PHO1 gene family show limited functional redundancy in phosphate transfer to the shoot, and are regulated by phosphate deficiency via distinct pathways. *Plant J.* 50: 982–994.
- Stefanovic, A., Arpat, A.B., Bigny, R., Gout, E., Vidoudez, C., Bensimon, M. et al. (2011) Over-expression of PHO1 in *Arabidopsis* leaves reveals its role in mediating phosphate efflux. *Plant J.* 66: 689–699.
- Stevenson-Paulik, J., Bastidas, R.J., Chiou, S.T., Frye, R.A. and York, J.D. (2005) Generation of phytate-free seeds in *Arabidopsis* through disruption of inositol polyphosphate kinases. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 12612–12617.
- Suzuki, M., Tanaka, K., Kuwano, M. and Yoshida, K.T. (2007) Expression pattern of inositol phosphate-related enzymes in rice (*Oryza sativa* L.): implications for the phytic acid biosynthetic pathway. *Gene* 405: 55–64.
- Takahashi, H., Watanabe-Takahashi, A., Smith, F.W., Blake-Kalff, M., Hawkesford, M.J. and Saito, K. (2000) The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 23: 171–182.
- Tan, X., Calderon-Villalobos, L.I.A., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C.V., Estelle, M. and Zheng, N. (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 446: 640–645.
- Tsay, Y.F., Chiu, C.C., Tsai, C.B., Ho, C.H. and Hsu, P.K. (2007) Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Letters* 581: 2290–2300.
- Vert, G., Grotz, N., Dédaldéchamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M.L., Briat, J.F. et al. (2002) IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* 14: 1223–1233.
- Veum, T.L., Ledoux, D.R., Shannon, M.C. and Raboy, V. (2009) Effect of graded levels of iron, zinc, and copper supplementation in diets with low-phytate or normal barley on growth performance, bone characteristics, hematocrit volume, and zinc and copper balance of young swine. *J. Ani. Sci.* 87: 2625–2634.
- Ward, J.T., Lahner, B., Yakubova, E., Salt, D.E. and Raghothama, K.G. (2008) The effect of iron on the primary root elongation of *Arabidopsis* during phosphate deficiency. *Plant Physiol.* 147: 1181–1191.
- Wodzinski, R.J. and Ullah, A.H. (1996) Phytase. *Adv. Appl. Microbiol.* 42: 263–302.
- Yao, M.Z., Zhang, Y.H., Lu, W.L., Hu, M.Q., Wang, W. and Liang, A.H. (2012) Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications. *J. Appl. Microbiol.* 112: 1–14.
- Yip, W., Wang, L., Cheng, C., Wu, W., Lung, S. and Lim, B.L. (2003) The introduction of a phytase gene from *Bacillus subtilis* improved the growth performance of transgenic tobacco. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 310: 1148–1154.
- Yoshimoto, N., Takahashi, H., Smith, F.W., Yamaya, T. and Saito, K. (2002) Two distinct high-affinity sulfate transporters with different inducibilities mediate uptake of sulfate in *Arabidopsis* roots. *Plant J* 29: 465–473.
- Zhao, H.J., Cui, H.R., Xu, X.H., Tan, Y.Y., Fu, J.J., Liu, G.Z. et al. (2013) Characterization of OsMIK in a rice mutant with reduced phytate content reveals an insertion of a rearranged retrotransposon. *Theor. Appl. Genet.* 126: 3009–3020.

The secretion of the bacterial phytase PHY-US417 by *Arabidopsis* roots reveals its potential for increasing phosphate acquisition and biomass production during co-growth

Nibras Belgaroui^{1,2}, Pierre Berthomieu², Hatem Rouached^{2,*} and Moez Hanin^{1,3,*}

¹Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes, Centre de Biotechnologie de Sfax, Sfax, Tunisie

²Institut National de la Recherche Agronomique, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Montpellier 2, Montpellier SupAgro. Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, Montpellier Cedex 2, France

³Institut Supérieur de Biotechnologie, Université de Sfax, Sfax, Tunisie

Received 16 December 2015;

revised 9 February 2016;

accepted 16 February 2016.

*Correspondence (Tel +216 74 875 818; fax +216 (0)74 875 818; email moez.hanin@cbs.rnrt.tn and Tel +33499613154;

hanin@cbs.rnrt.tn and Tel +33499613154;

fax +33 (0)4 67 52 57 37; email hatem.rouached@supagro.inra.fr

rouached@supagro.inra.fr

Summary

Phytic acid (PA) is a major source of inorganic phosphate (Pi) in the soil; however, the plant lacks the capacity to utilize it for Pi nutrition and growth. Microbial phytases constitute a group of enzymes that are able to remobilize Pi from PA. Thus, the use of these phytases to increase the capacity of higher plants to remobilize Pi from PA is of agronomical interest. In the current study, we generate transgenic *Arabidopsis* lines (ePHY) overexpressing an extracellular form of the phytase PHY-US417 of *Bacillus subtilis*, which are characterized by high levels of secreted phytase activity. In the presence of PA as sole source of Pi, while the wild-type plants show hallmark of Pi deficiency phenotypes, including the induction of the expression of Pi starvation-induced genes (PSI, e.g. *PHT1;4*) and the inhibition of growth capacity, the ePHY overexpressing lines show a higher biomass production and no PSI induction. Interestingly, when co-cultured with ePHY overexpressors, wild-type *Arabidopsis* plants (or tobacco) show repression of the PSI genes, improvement of Pi content and increases in biomass production. In line with these results, mutants in the high-affinity Pi transporters, namely *pht1;1* and *pht1;1-1;4*, both fail to accumulate Pi and to grow when co-cultured with ePHY overexpressors. Taken together, these data demonstrate the potential of secreted phytases in improving the Pi content and enhancing growth of not only the transgenic lines but also the neighbouring plants.

Keywords: phytic acid, phytases, phosphorus, intercropping.

Introduction

Plant growth and crop productivity are largely hindered by the low availability of phosphorus (P) in soil. Plants can only assimilate P as inorganic phosphate (Pi) forms H_2PO_4^- and HPO_4^{2-} , which occur in soil solutions at very low concentrations 0.1–10 μM (Hinsinger, 2001). Therefore, intensive use of P fertilizers was largely followed by farmers to prevent P deficiency and increase agricultural yields (Gilbert, 2009). However, only 10%–20% of fertilizer P is available for utilization by crops in the first year after application (Holford, 1997). The majority of the added P is transformed into inorganic and organic forms which are of limited availability to plants (Sanyal and De Datta, 1991). Between 30 and 80% of the total P in soils exist as organic phosphate (Po), of which up to 60–80% is inositol hexakisphosphate, also known as phytic acid or phytate (PA) that is not directly available to plants (Dalal, 1977; Schachtman *et al.*, 1998).

To enhance their ability to obtain adequate P from soil under P limiting conditions, plants have developed a variety of mechanisms, including changes in root morphology and architecture, up-regulation of high-affinity phosphate transporters, improvement of internal phosphatase activity and secretion of organic acids and phosphatases (Baker *et al.*, 2015; Schachtman *et al.*, 1998; Scheible and Rojas-Triana, 2015; Vance *et al.*, 2003).

Phosphatases are required for the mineralization of organic P to release Pi into the soil (Raghothama, 1999).

Phytases are special phosphatase enzymes that catalyse the hydrolysis of PA into lower inositol phosphates and Pi. Based on protein structure and catalytic properties, phytases are classified into four distinct families namely histidine acid phosphatases, β -propeller phytases, purple acid phosphatases and protein tyrosine phosphatase-like phytases (for review, see Lei *et al.*, 2013). Phytases have been detected and characterized in fungi, yeast and bacteria (Lei *et al.*, 2007) and have also been found in roots and root exudates of several plants (Hayes *et al.*, 2000; Li *et al.*, 1997; Richardson *et al.*, 2000). However, it has been reported that the enzymatic activity in root exudates is not sufficient for effective utilization of Po (Brinch-Pedersen *et al.*, 2002; Richardson *et al.*, 2000).

It is well established that Pi is released from PA following the exogenous application of commercial bacterial phytases in the growth media (Belgaroui *et al.*, 2014; Hayes *et al.*, 2000; Idriss *et al.*, 2002; Richardson *et al.*, 2000). Moreover, expression of the intracellular form of β -propeller phytases from *Bacillus subtilis* in *Arabidopsis* and tobacco was tested and showed an enhancement of the growth performance of these transgenic plants under Pi-limited conditions (Belgaroui *et al.*, 2014; Lung *et al.*, 2005). Nevertheless, these approaches had only limited success for

implementing strategies to increase crop production under P limitation. In this regard, more attention has been focused on the potential of extracellular form of phytases produced by plant roots for the improvement of organic P use from soil. To date, several genes have been tested using this strategy and led to the improvement of phytate-P utilization and plant growth in different plant species such as subterranean clover, potato, *Nicotiana tabacum*, cotton, *Brassica napus*, white clover and *Arabidopsis* (George *et al.*, 2004, 2005; Liu *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2005; Zimmermann *et al.*, 2003). However, despite the increasing interest on intercropping, an important agronomical practice defined as the cultivation of two or more crops in proximity, the potential of extracellular phytases to increase the growth of neighbouring plants was not assessed before. In this study, we have generated transgenic *Arabidopsis* that secrete the phytase PHY-US417 of *Bacillus subtilis* US417. This β -propeller phytase showed interesting catalytic properties as it exhibits a great pH stability (with an optimum at pH 7.5) and high specificity to PA (Farhat *et al.*, 2008). We have set up an experimental system where we demonstrate that the secreted enzyme resulted in promoting growth of not only the transgenic plants but also of neighbouring wild-type *Arabidopsis* or tobacco plants, grown in medium containing phytate as the sole P source. We provide the evidence that the plant growth promotion of the transgenic and neighbouring plants is due to their capacity to acquire P released from phytate hydrolysis by the secreted PHY US417. Therefore, these data can serve as a basis for implementing an innovative way to maintain plant growth capacity while decreasing the use of P fertilizers by engineering plant-secreting phytases in intercropping practices.

Results

Generation of transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing an active form of the extracellular PHY-US417 phytase

In a recent study (Belgaroui *et al.*, 2014), we have established that *Arabidopsis* plants are able to produce an active intracellular form of the phytase PHY-US417, leading to changes in the response to Pi signalling pathway. As aforementioned, there is a growing interest for the use of secreted phytases not only to better utilize extracellular PA but also for intercropping practices. Therefore, transgenic plants expressing the PHY-US417 open reading frame fused to the AtExt3 peptide signal sequence

(ePHY-US417) were generated (Figure S1A). Molecular and genetic analyses of a number of transformants led to the identification of several T3 independent transgenic lines that are homozygous for HPT (marker gene) and ePHY-US417 genes (Figure S1B-D). Three transgenic lines named hereafter e4, e5 and e9 were chosen for further analyses.

To evaluate the phytase activity of root-secreted PHY-US417 on the three selected transgenic lines, two distinct assays were performed. In the first assay, seedlings were germinated on low-P MS plates containing PA as a sole P source (MS-P+PA), and then, the plates were stained with 0.03% FeCl₃ as described by Latta and Eskin (1980). As shown in Figure 1, a pink staining could be detected around the roots of the transgenic lines but not of the control plants, revealing the hydrolysis of PA. The second assay consisted of measuring the extracellular phytase activities from exudates of 10-day-old seedlings grown on MS-P+PA medium. Results showed that in contrast to WT plants, high levels of secreted phytase activities (ranging from 27 to 39 mU/ μ g) were registered in exudates collected from e4, e5 and e9 transgenic lines (Table 1). All these data confirm that the PHY-US417 secreted by roots of the transgenic lines is active and able to release Pi from PA supplied to the growth medium.

The ePHY-US417 overexpressing lines exhibited improved growth and Pi contents under Pi-limited conditions

The growth rates of the ePHY US417 overexpressing lines were assessed on either MS or MS-P+PA media for 2 weeks. Under such Pi-limited conditions, the growth of wild-type control plants is significantly decreased compared to those grown on MS medium. By contrast, the transgenic lines (e4, e5 and e9) were only slightly affected when PA was supplied instead of Pi (Figure 2a) and showed longer roots (>2-fold) and higher biomass levels (>2-fold), compared to control plants (Figure 2b,c). Consistently, when grown on MS-P+PA medium, all three transgenic lines accumulated more Pi in their shoots than the wild-type plants. Interestingly, the Pi accumulation reached levels similar to those registered under +Pi conditions (MS medium) (Figure 2d), indicating that they are readily able to obtain Pi from PA. No significant differences in growth were measured between transgenic lines and wild-type plants, under either -Pi (MS-P) or +Pi (MS) treatments. These results indicate that root secretion of the phytase PHY-US417 maintains growth and Pi nutrition of *Arabidopsis* transgenic plants on MS medium containing PA as sole P source.



Figure 1 Detection of phytase activity secreted by the roots of ePHY transgenic lines. Three-week-old seedlings of three ePHY lines (e4, e5 and e9) together with wild-type (Col) plants were grown on MS agar plates containing PA as sole P source and stained with FeCl₃. Pink staining around the roots indicates the absence of PA in the media.

Table 1 Extracellular phytase activity and Pi content in transgenic *Arabidopsis* lines grown in sterile nutrient solution. Phytase activity was determined between day 10 and day 12 of growth. Data are presented as means \pm SD of three individual replicates. For each parameter, the values marked by different letters (a and b) are significantly different ($P < 0.05$)

	Secreted phytase activity mU/ μ g secreted protein	Pi (μ M)
Col	0.1 \pm 0.01 ^a	34.25 \pm 1.06 ^a
e4	34 \pm 6 ^b	166 \pm 2.82 ^b
e5	39.6 \pm 4.2 ^b	166.5 \pm 2 ^b
e9	27.4 \pm 3.1 ^b	120 \pm 1.41 ^b

Secretion of phytase from the roots of ePHY transgenic lines promotes growth of co-cultivated plants under Pi-limited conditions

As abovementioned, secretion of the phytase PHY-US417 from plant roots improved the ability of the transgenic plants to acquire Pi from PA. This finding prompted us to test whether the secreted phytase can also contribute in promoting the growth of other plants co-cultivated with the transgenic lines under Pi-limited conditions. For this reason, the ePHY transgenic lines (e4, e5 and e9) and wild-type *Arabidopsis* seedlings were germinated on MS-P agar medium and then transferred together with MS-P+PA liquid medium. Wild-type plants co-cultivated with ePHY lines grow far better (with up to ~75% increases in shoot and root fresh weights) than those co-cultivated with empty vector control plants (ev line) (Figure 3b) and achieve 2 weeks after transfer, high shoots Pi contents, nearly the same registered in the e4 and e5 transgenic lines (Figure 4). Moreover, in these wild-type plants co-cultivated with ePHY lines, the Pi uptake increases at rates of 19 \pm 2%, 31 \pm 1% and 51 \pm 2% higher than those co-cultivated with control plants, after 3, 7 and 15 days of transfer to MS-P+PA media, respectively (Figure 4). No significant differences in growth and Pi contents (Figures 3 and 4) were observed between wild-type plants co-cultivated with transgenic or with ev lines under -Pi or +Pi conditions. These results strongly suggest that the growth promotion of co-cultivated *Arabidopsis* is closely linked to the activity of the phytase secreted by ePHY lines, which is responsible for increasing the Pi concentration in the growth medium.

To assess whether the phytase secreted from ePHY overexpressors can promote the growth of co-cultivated plants other than *Arabidopsis*, similar growth assays were performed where tobacco plants were transferred together with either e4, e5 or e9 to liquid MS-P media supplemented or not with PA. Under Pi-limiting conditions, the growth of tobacco seedlings, co-cultivated with control plants or transgenic lines, was significantly affected. With the addition of PA in the growth medium, tobacco co-cultivated with wild-type *Arabidopsis* plants showed a strong inhibition of growth with chlorosis symptoms. This may be related to the unavailability of not only Pi but also other minerals (such as Ca, Zn, Mg and Fe) due to the chelating effect of PA. However, tobacco plants co-cultivated with ePHY lines showed higher growth rates (Figure 5a) as well as shoot (from 1.6 to 2.2-fold) and root (from 1.5- to 2-fold) fresh weights (Figure 5b) compared to those co-cultivated with WT plants. Collectively, these prove that the secreted phytase improves the growth of tobacco

neighbouring plants cultivated in the presence of PA as sole source of Pi.

The ePHY overexpressors promote Pi accumulation in shoots and growth capacity of neighbouring plants

The growth promotion of plants co-cultivated with the ePHY overexpressors in the presence of PA as sole source of P can be most plausibly explained by an increase in Pi availability following PA hydrolysis by PHY-US417 phytase excreted in the medium and its (Pi) uptake by the plants. To confirm this, two mutants in high-affinity Pi transporters, *pht1;1* or *pht1;1-1;4*, which are characterized by a limited Pi uptake capacity, were used in this work (Shin *et al.*, 2004). Under standard growth conditions (MS liquid medium), the Pi contents in shoots are 31% and 68% lower in *pht1;1* and *pht1;1-1;4*, respectively, compared to transgenic lines or WT control (Figure 6b). The growth capacity of *pht1;1* or *pht1;1-1;4* mutants was severely restricted when grown under Pi-limited conditions, regardless co-cultivated with ePHY overexpressors or not (Figure 6a). Such data confirm that *Arabidopsis* plants are able to grow in the presence of PA as sole source of P only when they take benefits from Pi released via the activity of secreted phytase PHY US417, and therefore, we can rule out the effect of any intermediate components produced during PA hydrolysis. This study shows a potential advantage of using these e-PHY overexpressors to demonstrate the critical role of Pi transport system during plant co-growth under Pi-limited conditions.

Expression of phosphate transporters is down-regulated in plants co-cultured with ePHY overexpressors in the presence of PA as sole source of Pi

Because *Arabidopsis* wild-type plants show an improved growth capacity when co-cultured with ePHY overexpressors in the presence of PA as sole source of Pi, we were interested to assess the expression of Pi uptake transporters (*PHT1;1* and *PHT1;4*), and the Pi exporters (*PHO1* and *PHO1;H1*) both in wild-type plants and ePHY overexpressors grown together under this cultural condition, using MS and MS-P conditions as controls.

As expected, in all tested lines (wild-type plants, ev control line and ePHY overexpressors) the expression of these Pi transporters was up-regulated in response to Pi depletion (MS-P; Figure 7), compared to MS medium. When grown under MS-P+PA condition together with ev control line, wild-type plants showed only a moderate decrease in the expression of all Pi transporters, suggesting that the presence of PA did not alter their Pi deficiency signalling pathway. In contrast, a down-regulation of these genes was observed in the ePHY overexpressors grown under the same condition, indicating the recovery of the Pi status following the hydrolysis of PA. Most interestingly, when co-cultured with ePHY overexpressors in MS-P+PA medium, the wild-type plants showed also a down-regulation of the Pi transporters to levels similar to those observed under standard growth conditions. Such a down-regulation seems to be again due to Pi that becomes more available in the growth medium after PA hydrolysis by the phytase secreted from the roots of ePHY overexpressing lines.

The GUS reporter gene driven by the native promoter of *PHT1;4* (*PHT1;4::GUS*) (Misson *et al.*, 2004) was then chosen to infer the expression of the *PHT1;4* gene in roots of this transgenic line co-cultivated with ePHY overexpressors. Seven-day-old seedlings of *PHT1;4::GUS* line were transferred with ePHY transgenic lines or with wild-type *Arabidopsis* plants into hydroponic culture for two additional weeks. The expression of

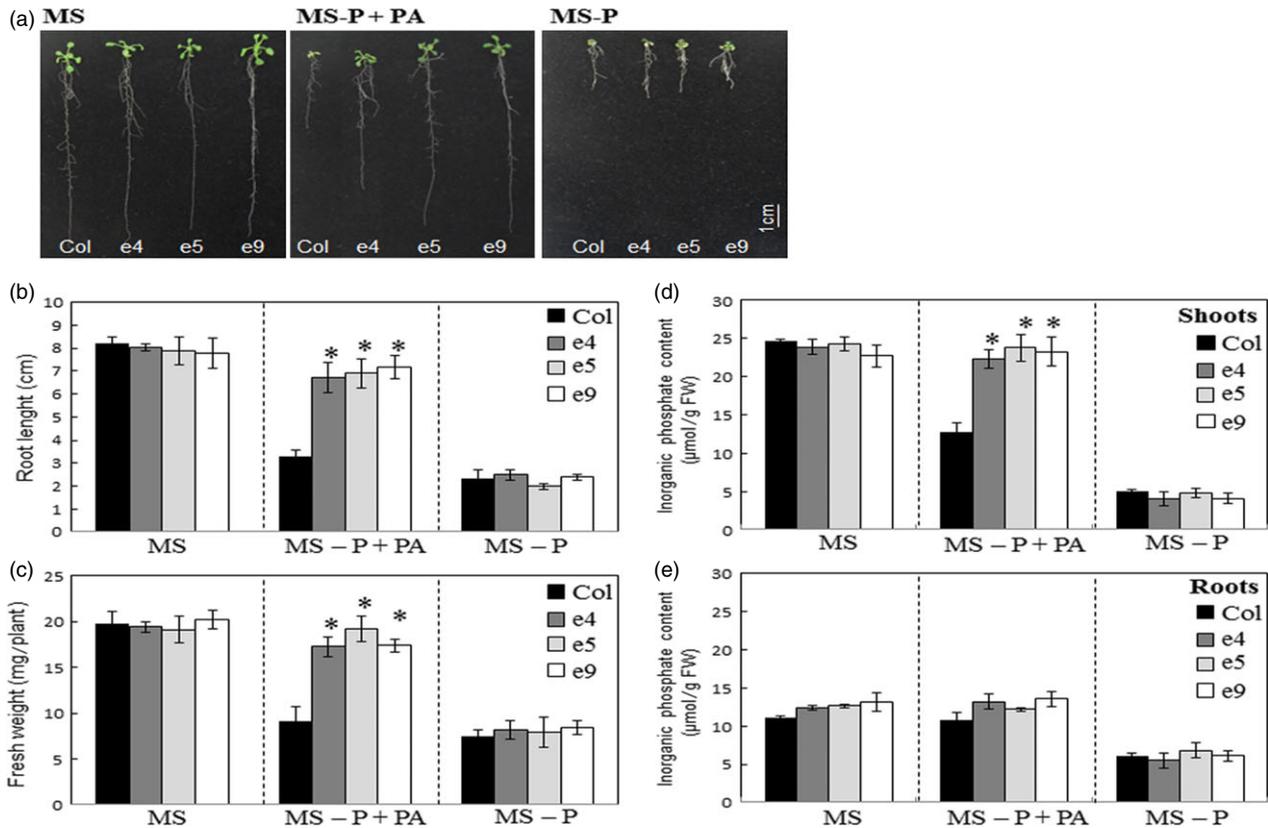


Figure 2 The ePHY transgenic lines maintain their growth on media containing PA as sole P source. (a) Photographs of representative wild-type (Col) and transgenic (e4, e5 and e9) seedlings were taken after 2 weeks of growth on three types of media: MS (with 1 mM Pi), MS-P or MS-P+PA (0.33 mM). (b), (c), (d) and (e) Root lengths, seedling fresh weights and Pi concentrations in roots and shoots. All measurements were performed on WT and transgenic plants grown under growth conditions indicated in (a). Data are means \pm SD of three replicates ($n = 6$). For determination of fresh weights and Pi concentrations, pools of 6 plants were used in each replicate. All measurements were performed on 2-week-old seedlings. Asterisks indicate a statistically significant difference ($P < 0.05$) with control plants.

PHT1;4::GUS was detected after 3, 7 and 15 days of transfer together with WT plants to MS-P+PA or to MS-P. When co-transferred with ePHY overexpressors, similar GUS staining was detected but only on MS-P medium. On MS-P+PA, the roots of *PHT1;4::GUS* line showed only a weak GUS activity at 3 days after transfer, but not at 7 or 15 days after transfer (Figure 8). These results indicate that the Pi deficiency signal was repressed following a substantial increase in Pi concentrations in the growth medium, which is taken up by the plants. This finding provides additional evidence showing that Pi release from PA could be sensed and uptaken efficiently by neighbouring plants.

Discussion

The world's main source of P is phosphate (Pi) rock. Pi in fertilizers comes from P-rich mines, and there will be no other economically viable solution once these P-rich deposits are fully exploited. Knowing that the majority of Pi is associated to PA in soils and that plants cannot use this organic form because of their weak extracellular phytase activity (Hayes *et al.*, 2000; Richardson *et al.*, 2000), alternative approaches to use the PA are urgently needed. As aforementioned, different strategies have been proposed ranging from the supply of growth medium with microbial phytases (purified mainly from *Aspergillus niger* or *Bacillus subtilis*), to the generation of plants expressing and

secreting phytases in root-medium interface. These strategies were successfully established, but are limited to the benefit of individual plants (Belgaroui *et al.*, 2014; Richardson *et al.*, 2001), and until now, an eventual benefit for plants grown in proximity was not investigated. So far, the use of secreted microbial phytases to explore new growing strategies such as intercropping was never reported. In this context, the present work shows (i) that *Arabidopsis* plants are able to produce and secrete a functional *Bacillus subtilis* phytase PHY-US417, which in turn improves plant growth in the presence of PA as sole source of P; (ii) the involvement of high-affinity transport system, namely PHT1;1 and PHT1;4, in the uptake and accumulation of Pi released by PHY-US417-mediated PA hydrolysis; (iii) and most importantly, plant-secreting microbial phytases have the potential to enhance growth of neighbouring plants under Pi-limited conditions.

Arabidopsis is not able to use PA as source of Pi, and plants undergo Pi deficiency stress as revealed by the induction of the expression of Pi starvation response gene. In the presence of PA, the transgenic plants (e4, e5 and e9 lines) showed a recovery from Pi deficiency stress and exhibit a better growth capacity. These results are consistent with earlier works showing transgenic *Arabidopsis* and tobacco plants secreting microbial phytases exhibit a better growth (Lung *et al.*, 2005; Richardson *et al.*, 2001).

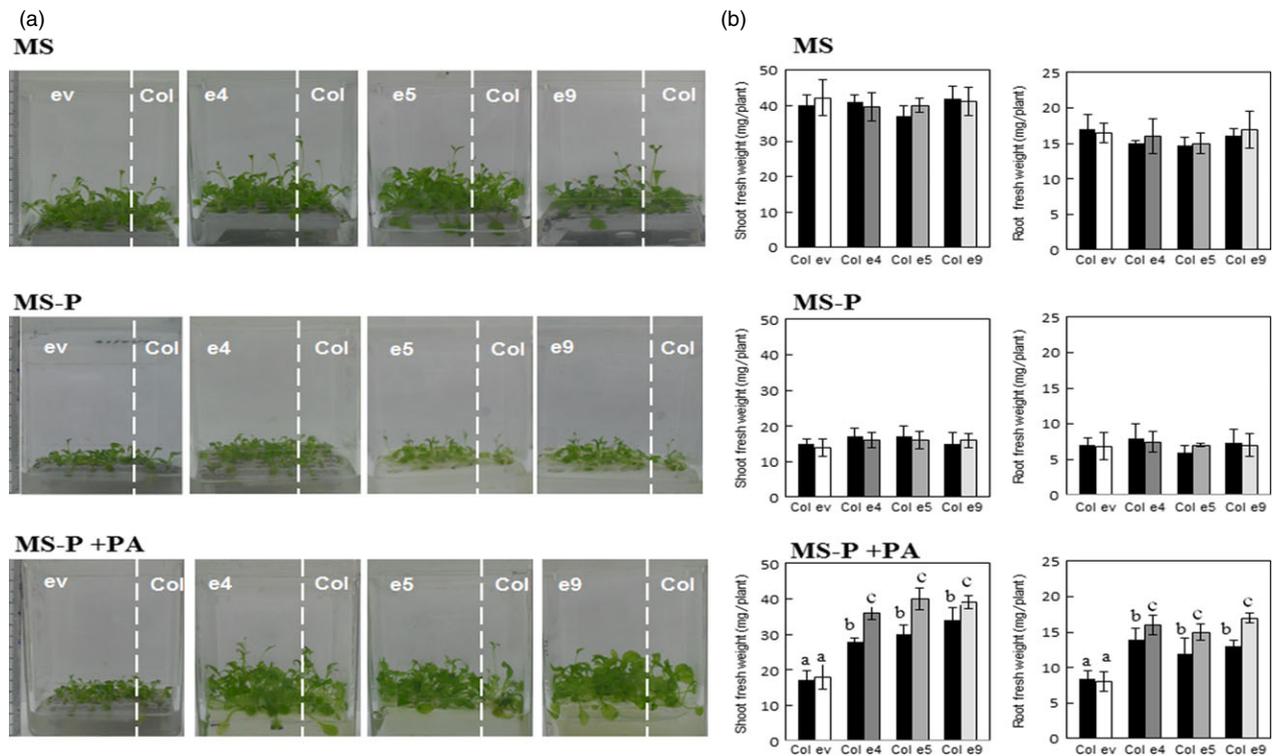


Figure 3 Growth performance of *Arabidopsis* wild-type plants co-cultivated with ePHY overexpressing lines in Pi-deficient MS medium supplied with phytate. Seven-day-old seedlings of wild type (Col), a transgenic line harbouring empty vector (ev) or ePHY overexpressors (e4, e5 and e9) were germinated on MS-P agar medium, transferred together as indicated, to 50 ml liquid MS (with 1 mM Pi), MS-P or MS-P+PA (0.33 mM) and grown for further 2 weeks. Seedlings of WT were co-cultivated with Ev or ePHY lines using a seedling ratio (Col:ev or Col:ePHY) of 1:4. (a), (b) Phenotypes and root and shoot fresh weights of WT plants and transgenic plants co-cultivated in MS, MS-P or MS-P+PA. Values shown represent mean \pm SD of three individual replicates ($n = 6$). Values marked with different letters are significantly different $P < 0.05$, ANOVA.

It is worth noting that to enable the ePHY transgenic lines secreting the ePHY-US417, they were transformed with a construct containing the coding sequence of this bacterial phytase that is driven by the constitutive CaMV 35S promoter and fused to signal sequence of the *Arabidopsis* extensin gene *AtExt3*. Similar approaches were also previously performed using microbial or plant phytases. Transgenic *Arabidopsis* or tobacco plants constitutively expressing extracellular forms of the fungal phytase *phyA* were engineered using signal peptides from carrot or *Arabidopsis* extensins (George *et al.*, 2004, 2005; Lung *et al.*, 2005). In other reports, root-specific promoters were employed to express the fungal phytase in transgenic crop plants, such as cotton and potato (Liu *et al.*, 2011; Zimmermann *et al.*, 2003). There were also few reports dealing with transgenic plants expressing the phytase (MtPHY1) and a purple acid phosphatase (MtPAP1) genes of *Medicago truncatula*, harbouring their native signal peptides that direct the extracellular secretion of the expressed enzymes (Ma *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2005). In all these cases, an improvement in plant Pi acquisition and growth under Pi-limited conditions was observed. However, again attention was given only to the effect of secreted phytases on P nutrition and growth of the transgenic plants expressing the phytase and never of neighbouring plants. From our findings, we expect that similar positive effects on plant co-growth can be also observed with other transgenic plants expressing extracellular phytases.

On the other hand, the hydrolysis of PA which releases not only Pi but also other inositol phosphate intermediates posed the

question about the role of the hydrolysis products on the growth of the plants. The fact that the high-affinity Pi transporter mutants *pht1;1* or *pht1;1-1;4* fail to take benefit from the co-growth with the ePHY transgenic lines (Figure 6) constitutes a genetic evidence that Pi absorbed is the major factor contributing into improving growth of co-cultured plants when supplied with PA as sole P source.

Remarkably, Pi contents in *Arabidopsis* wild-type plants co-cultivated with the ePHY overexpressors under Pi-limited conditions remained almost as recorded when grown on complete medium (MS), which involves the high-affinity Pi transporters to absorb the Pi released from PA by the phytase secreted from ePHY lines. Consistent with this data, Figure 7 shows that the increase of Pi in the growth medium via the hydrolysis of PA by the root-secreted phytase is sensed by neighbouring plants which in turn down regulates the expression of Pi starvation-induced genes such as the *PHT1.4* transporter.

The present study shows for the first time that the phytase PHY-US417 of *B. subtilis* secreted by the roots of transgenic *Arabidopsis* plants promotes the growth of neighbouring plants, *Arabidopsis* or tobacco, on medium supplied with PA as sole P source. Under such conditions, *Arabidopsis* and tobacco plants showed growth rates similar to those registered under standard conditions. Our findings constitute a promising start for developing novel intercropping practices, and further suited assays would be a plant growth assessment in amended soils with higher PA availability as previously reported (George *et al.*, 2005).

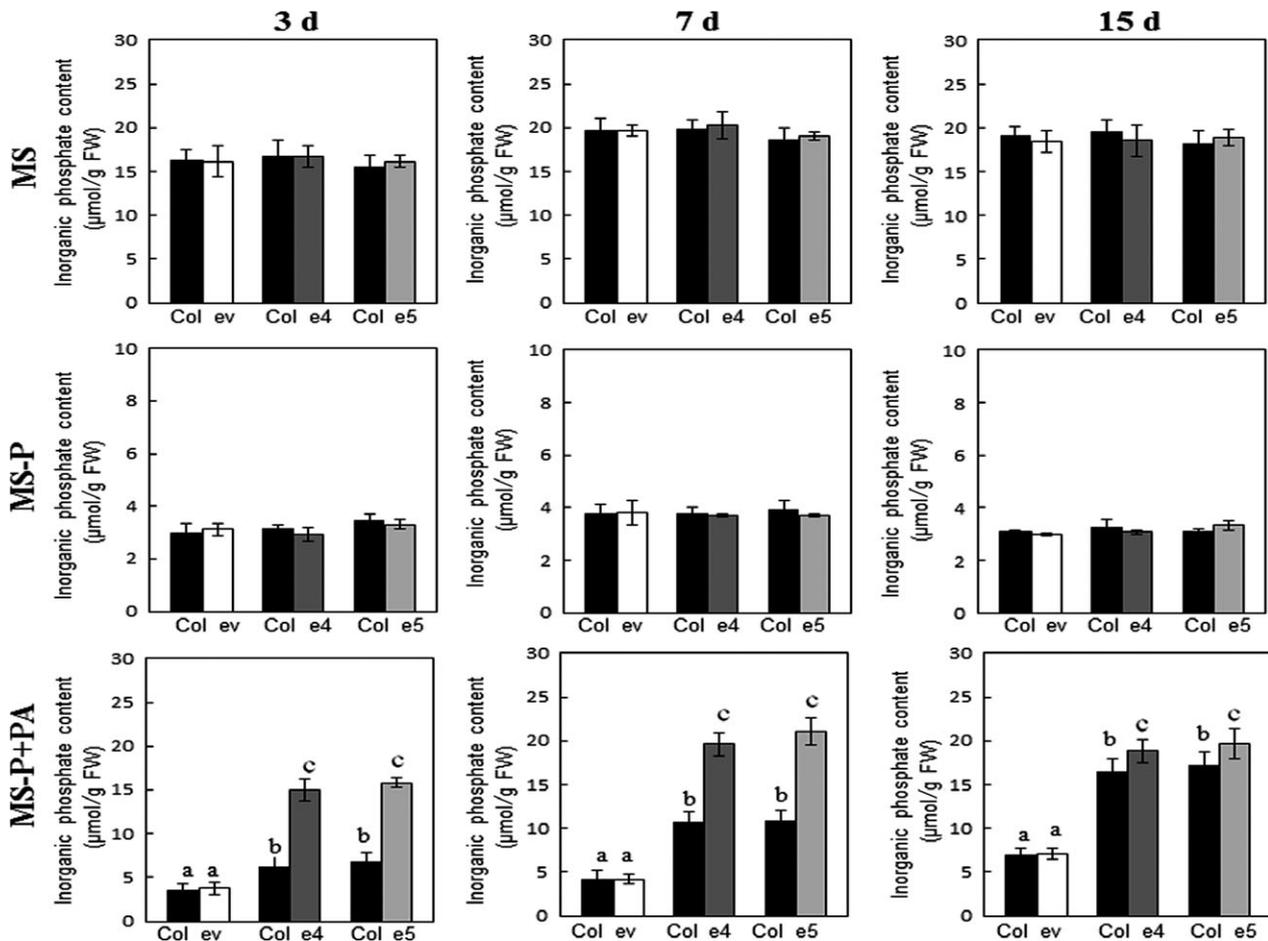


Figure 4 Pi concentrations increase in shoots of WT seedlings when grown together with ePHY lines in medium containing phytate as sole P source. Seven-day-old WT seedlings were co-transferred to liquid MS, MS-P or MS-P+PA together with ev line or ePHY overexpressors (e4 and e5) as indicated in Figure 3. Seedlings were harvested 3, 7 and 15 days of transfer to liquid media, and Pi concentrations in shoots were quantified. Data are mean \pm SD of three individual replicates ($n = 6$). Values marked with different letters are significantly different $P < 0.05$, ANOVA.

Few studies explored the improvement of Pi acquisition and plant growth in intercropping systems. It was shown that chickpea mobilized soil organic P and left more Pi available to the intercropped wheat (Li *et al.*, 2003). Moreover, intercropping with faba bean has been reported to improve maize grain yield significantly and above-ground biomass, compared with maize grown with wheat, at lower rates of P fertilizer application, but not significantly at high rate of P application (Li *et al.*, 2007). In general, cereal and legumes represent the most popular combination in intercropping systems. It has been proposed that in most cereal/legume intercropping the cereal shall benefit from the legume species, because legumes are known to excrete larger amounts of carboxylates (Neumann and Römheld, 1999; Pearse *et al.*, 2006; Vance *et al.*, 2003), phosphatases (Nuruzzaman *et al.*, 2006) and mainly protons (Hinsinger *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 1997) in their rhizosphere. In this context, using permeable and impermeable root barriers, Li *et al.* (2007) found that maize overyielding resulted from its uptake of Pi mobilized by the acidification of the rhizosphere via faba bean root release of organic acids and protons.

The present work provides first evidence that engineering plants able to secrete a functional phytase that can release Pi from PA, results in promoting P nutrition and growth of not only the transgenic line but also neighbouring plants. These results

pave the way towards implementing innovative intercropping practices as an alternative for sustainable agriculture.

Experimental procedures

Plant material, growth conditions and P-stress treatments

Seeds of tobacco (*Nicotiana tabacum* var Xanthi), *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia (Col-0), transgenic lines expressing ePHY-US417 (see below), the *pht1;1* and *pht1;1-1;4* mutants and transgenic lines expressing the GUS reporter gene under the PHT1;4 promoter (Misson *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2004) were used in these experiments. In all experiments, plant were grown in growth chambers at 22–24°C with a light intensity of 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ under long-day conditions 16 h/8 h light/dark cycle. For *in vitro* growth assays, seeds of *Arabidopsis* were germinated and grown in a vertical position for 2 weeks on either MS (Murashige and Skoog, 1962) containing 1 mM Pi KH_2PO_4 , MS-P (5 μM KH_2PO_4) or MS-P+PA (5 μM KH_2PO_4 + 0.33 mM PA). For liquid culture, seedlings were first grown on MS-P medium for 1 week and then transferred carefully to Magenta boxes containing 50 mL MS, MS-P or MS-P+PA media, on an orbital shaker set at 60 rpm. Wild-type (WT) or mutant plants co-cultivated with transgenic lines (with a seedling ratio of 1:4) were

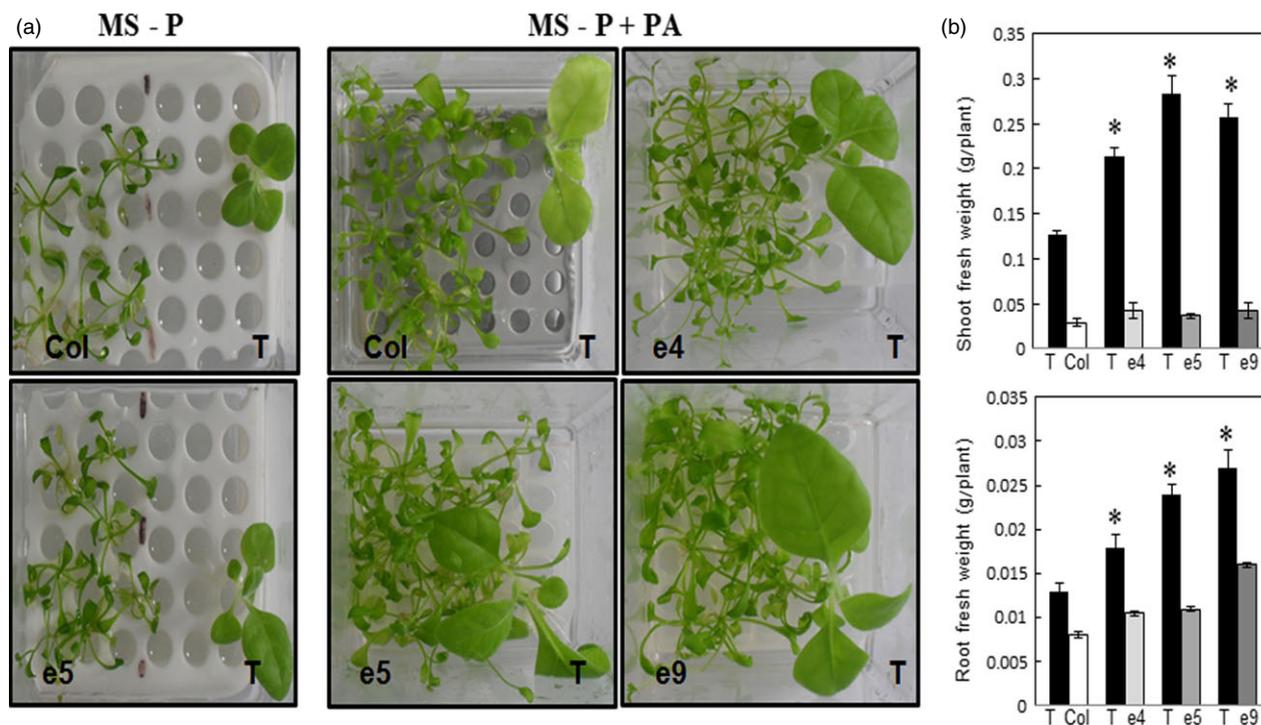


Figure 5 Growth performance of tobacco wild-type plants co-cultivated with ePHY overexpressing lines in Pi-deficient MS medium supplied with phytate. Two-week-old tobacco seedlings were transferred together with Col control plants or ePHY transgenic lines to liquid MS-P or MS-P+PA (0.33 mM) media. Tobacco seedlings (T) were co-cultivated in liquid media with WT or ePHY lines using a seedling ratio (T:Col or T:ePHY) of 1:4 for 2 weeks. (a), (b) Phenotypes and root and shoot fresh weights of tobacco seedlings, Arabidopsis WT and transgenic plants co-cultivated in MS or MS-P+PA. Data are mean \pm SD of three individual replicates ($n = 6$). Asterisks indicate statistically significant difference ($P < 0.05$).

collected after 3, 7 and 15 days of transfer for phenotypic, physiological and molecular analyses.

Molecular cloning and generation of transgenic plants

Signal sequence of extensin gene from *Arabidopsis thaliana* (AtExt3) was chosen for directing the secretion of the phytase PHY-US417 of *Bacillus subtilis* from plant roots. The extensin leader (32 amino acids) of the AtExt3 gene was amplified from genomic DNA of *A. thaliana* by PCR using the primers Ext3-Fw5'-GCTCTAGAATGGCCTCTTTAGTGGCAA-3' and Ext3-Rv5'-TAGGATCCAGAAGAATAGAAATAGTTAGCGGTTG-3'. The amplicon was subcloned into pGEM-T easy cloning vector (Promega) and sequenced. The open reading frame of PHY-US417, described previously (Belgaroui et al., 2014), was amplified by PCR with high-fidelity Taq polymerase (Stratagene, La Jolla, CA), using the primers PHYC-BH 5'-CGGATCCTTATGTCCGATCCTTATCA-3' (*Bam*HI site underlined) and PHYC-Sph 5'-GCGCATGCT-TATTTCCGCTTCTGTCCGG-3' (*Sph*I site underlined). The PCR product was introduced as a *Bam*HI/*Sph*I fragment, downstream the Ext3 leader sequence. Sequence analysis of the resulting construct confirms the in-frame fusion Ext3-PHY US417. Then, the fusion was introduced as *Spe*II/*Pml*I fragment into the pCAM-BIA1302 binary vector between the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter and the nopaline synthase (NOS) terminator. This binary vector contains also the hygromycin resistance gene (HPT) as a selection marker. The resulting construct pC1302-Ext3-PHY US417 (Figure S1A) was checked by sequencing and then used to transform *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia, Col-0) plants by floral dipping using *Agrobacterium* strain GV3101 (Clough and Bent, 1998).

Transgenic plants were selected on MS agar medium supplemented with 15 μ g/mL hygromycin. From 20 T1 independent transformants, eight T2 lines showing a 3:1 segregation for hygromycin resistance were grown up to T3 generation. Homozygous lines were selected and used in this work.

Molecular characterization of transgenic lines

Genomic DNA was prepared from leaves of independent transformants and used for PCR screening based on HPT marker as described previously (Belgaroui et al., 2014). The presence of Ext3- PHY US417 transgene in the genome of ePHY lines was verified by PCR using Ext3-Fw (forward) and PHYC-Sph (reverse) primers.

Total RNA was first extracted from 2-week-old seedlings of wild-type *Arabidopsis* and transgenic lines using Trizol reagent (Invitrogen) and used for RT-PCR analysis. DNase-treated RNA samples were reverse-transcribed using M-MLV reverse transcriptase (Promega). First-strand cDNAs were employed as a template for PCR amplifications with a Ext3-Fw/PHYC-Sph or HPT-specific primers (Belgaroui et al., 2014). *Actin* gene used as control was amplified with the primers: ActF: 5'GGCGATGAAGCTC AATCCAAACG-3' and ActR: 5'GGTCACGACCAGCAAGATCAA GACG-3'.

Detection and measurement of secreted phytase activities

Wild-type and transgenic lines were germinated and grown on agar MS media. Then, 10-day-old seedlings were transferred to 125-ml conical flasks containing the nutrient solution (liquid MS-P+PA) with agitation (~ 60 rpm) for a further 2 days. Extracel-

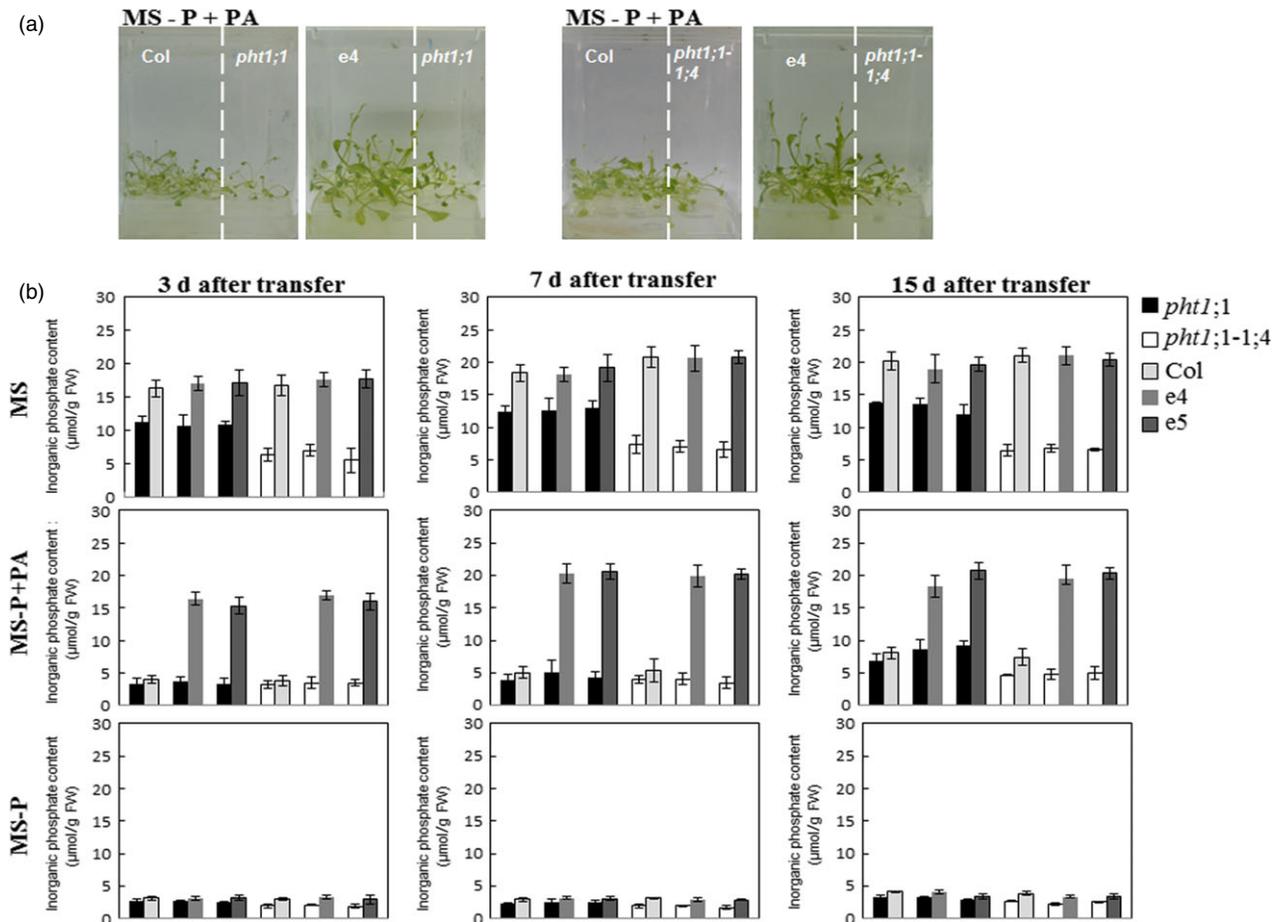


Figure 6 Growth and Pi contents of *phyt1;1* and *phyt1;1;4* mutants co-cultivated with wild-type or ePHY overexpressors. Seven-day-old seedlings of wild type (*Col*), *phyt1;1*, *phyt1;1;4* or ePHY overexpressors (*e4* and *e5*) were germinated on MS-P agar medium, transferred together as indicated, to 50 ml liquid MS (with 1 mM Pi), MS-P or MS-P+PA (0.33 mM) and grown for further 3, 7 or 15 days. (a) Photographs of representative 2-week-old seedlings co-cultivated in liquid MS-P+PA under seedling ratio (*phyt1;1* or *phyt1;1;4*:*Col* and *phyt1;1* or *phyt1;1;4*:*e4*) of 1:4. (b) Pi concentrations in shoots of co-cultivated plants after 3, 7 and 15 days of transfer to liquid MS, MS-P and MS-P+PA media. Data are mean \pm SD of three individual replicates ($n = 6$).

lular phytase was determined as the amount of activity secreted by seedlings into fresh nutrient solution. Briefly, root-bath solutions were filtered (0.45 μ m) to remove the sloughed-off cells. An aliquot of root exudates was then incubated with three volumes of MES/Ca buffer (pH 7.5) containing 2 mM myo-inositol hexakisphosphate (InsP₆; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MC) as a substrate and incubated at 55°C for 30 min. The reaction was terminated with the addition of an equal volume of 10% trichloroacetic acid (TCA) at either time zero or at the end of incubation. Released Pi was quantified spectrophotometrically at 820 nm using the molybdate blue method (Murphy and Riley, 1962). Enzyme activities were calculated as the difference in phosphate concentrations in supernatants between time zero and the end of incubation. One unit (U) of phytase is the activity that releases 1 mmol of phosphate per minute under these assay conditions. Protein concentrations were determined according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as a standard. Pi concentrations were calculated from a standard curve determined using known concentrations of potassium phosphate.

Phytase activity on agar medium containing phytate as sole P source was also visualized by staining of the plates using the Wade reagent (0.03% FeCl₃·6H₂O and 0.3% sulfosalicylic acid)

(Dragičević *et al.*, 2011; Latta and Eskin, 1980), following the procedure described by Richardson *et al.* (2001).

Histochemical GUS staining

Seedlings harbouring the PHT1;4::GUS transgene were transferred together with ePHY lines to either MS, MS-P or MS-P+PA. Following 3, 7 or 15 days of transfer, a GUS staining was performed on the roots of the PHT1;4::GUS line as described by Jefferson *et al.* (1987). Briefly, samples were submerged in a GUS staining solution (50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0; 0.5 mM K₃(Fe(CN)₆), 0.5 mM K₄(Fe(CN)₆), 0.1% Triton X-100, 1 mg/mL 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide cyclohexylammonium salt (X-Gluc)) and incubated at 37°C overnight. Endogenous pigments including chlorophyll were removed by soaking the plants tissues for several hours in 70% ethanol. Samples were photographed using a Zeiss binocular microscope (Olympus BH-2, Volketswil, Switzerland).

Pi measurements

Pi measurements were performed as described by Khan *et al.* (2014). Ion extractions from weighed fresh shoots and roots were performed in water by incubation for 30 min at 70°C. The

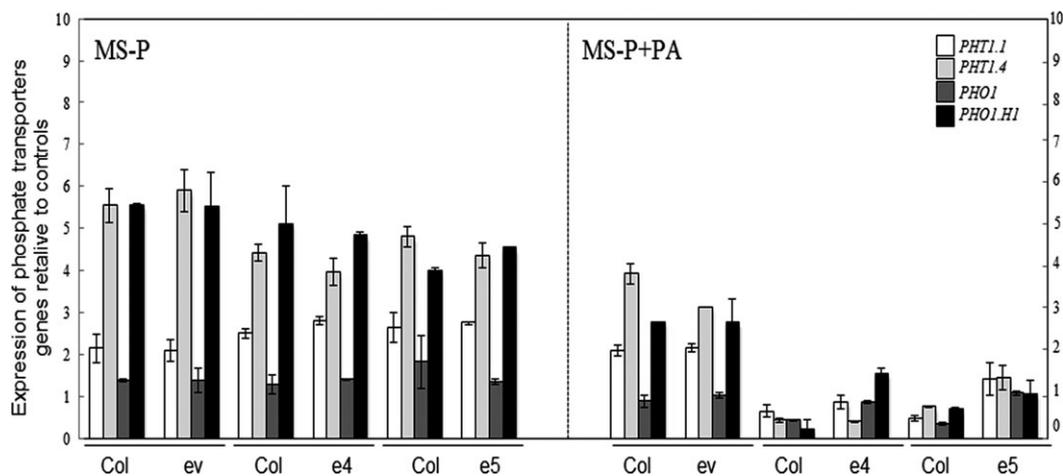


Figure 7 Analysis of the expression of Pi transporters *PHT1;1*, *PHT1;4*, *PHO1* and *PHO1;H1* after co-growth of *Arabidopsis* plants in liquid MS containing low Pi in the absence (MS-P), or in the presence of PA (MS-P+PA) for 2 weeks. WT (Col) was co-grown hydroponically with either transgenic lines expressing empty vector (ev) or the ePHY overexpressors (e4 and e5). Abundance of *PHT1;1*, *PHT1;4*, *PHO1* and *PHO1;H1* transcripts was normalized against their respective expression in control condition (MS). Individual measurements were obtained from the analysis of roots collected from a pool of five plants. Data are mean \pm SD of three biological replicates.

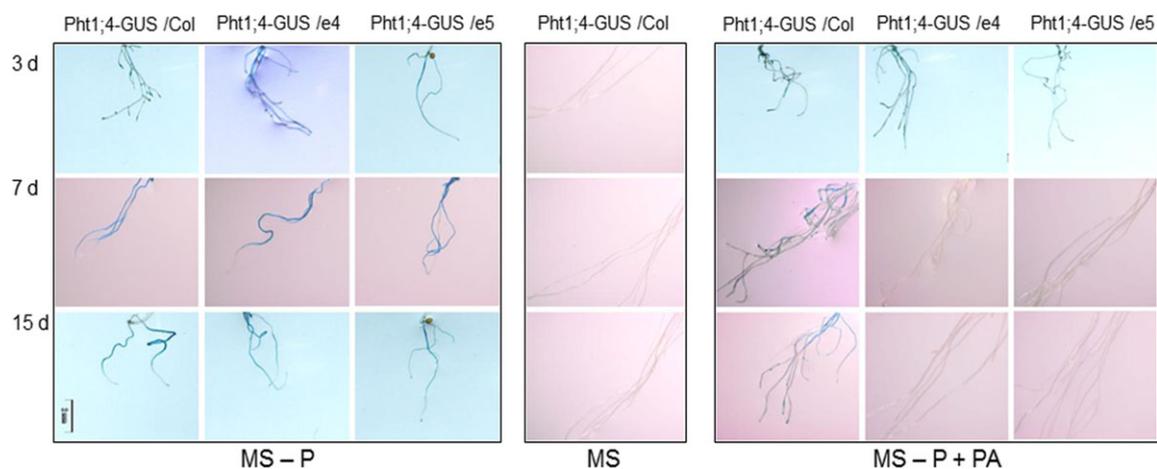


Figure 8 Detection of GUS activity in the *PHT1;4::GUS* line co-cultivated with ePHY transgenic line or WT plants. Seven-day-old seedlings of the *PHT1;4::GUS* line were transferred together wild type (Col), or ePHY overexpressors (e4 and e5) to liquid MS (with 1 mM Pi), MS-P or MS-P+PA (0.33 mM). GUS staining was performed on the roots of the *PHT1;4::GUS* line after 3, 7 and 15 days of transfer.

quantification of Pi was completed by the molybdate assay according to Ames (1966).

Real-time quantitative PCR

Total RNA free of residual genomic DNA was prepared from root tissues using the RNeasy extraction kit (Qiagen) and RQ1 RNase-free DNase (Promega). cDNA was synthesized from 2 μ g total RNA using an oligo (dT) primer and M-MLV reverse transcriptase (Promega). Real-time quantitative reverse-transcription PCR (qPCR) was performed with a LightCycler 480 Real-Time PCR System using SYBR green dye technology (Roche) and specific primers as described by Rouached *et al.* (2011). Data were analysed using the Roche LC480 software. Quantification of the relative transcript levels was performed using the comparative CT method (Livak and Schmittgen, 2001; Rouached *et al.*, 2008). The relative expression of each gene was normalized to the level

of ubiquitin10 transcript (UBQ10: At4 g05320) and expressed as relative values against wild-type plants grown in complete MS medium.

Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) and the Tukey's test were employed to perform statistical analysis presented in this work.

Acknowledgements

This work was supported by grants provided by the Ministry of Higher Education and Scientific Research (Tunisia) for NB and MH and by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA – France) for HR. Authors would like to thank Jean-François Briat and Thierry Desnos for their helpful discussion.

Conflict of interest

Authors have no conflict of interest to declare.

References

- Ames, B.N. (1966) Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol.* **8**, 115–118.
- Baker, A., Ceasar, S.A., Palmer, A.J., Paterson, J.B., Oi, W., Muench, S.P. and Baldwin, S.A. (2015) Replace, reuse, recycle: improving the sustainable use of phosphorus by plants. *J. Exp. Bot.* **12**, 3523–3540.
- Belgaroui, N., Zaidi, I., Farhat, A., Chouayekh, H., Bouain, N., Chay, S. and Curie, C. (2014) Over-expression of the bacterial phytase US417 in *Arabidopsis* reduces the concentration of phytic acid and reveals its involvement in the regulation of sulfate and phosphate homeostasis and signaling. *Plant Cell Physiol.* **55**, 1912–1924.
- 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.
- Brinch-Pedersen, H., Sørensen, L.D. and Holm, P.B. (2002) Engineering crop plants: getting a handle on phosphate. *Trends Plant Sci.* **7**, 118–125.
- 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.
- Dalal, R.C. (1977) Soil organic phosphorus. *Adv. Agron.* **29**, 83–117.
- Dragičević, V.D., Sredojević, S.D., Perić, V.A., Nišavić, A.R. and Srebrić, M.B. (2011) Validation study of a rapid colorimetric method for the determination of phytic acid and inorganic phosphorus from seeds. *Acta Period. Technol.* **42**, 11–21.
- Farhat, A., Chouayekh, H., Ben Farhat, M., Bouchaala, K. and Bejar, S. (2008) Gene cloning and characterization of a thermostable phytase from *Bacillus subtilis* US417 and assessment of its potential as a feed additive in comparison with a commercial enzyme. *Mol. Biotechnol.* **40**, 127–135.
- George, T.S., Richardson, A.E., Hadobas, P.A. and Simpson, R.J. (2004) Characterization of transgenic *Trifolium subterraneum* L. which expresses phyA and releases extracellular phytase: growth and P nutrition in laboratory media and soil. *Plant, Cell Environ.* **27**, 1351–1361.
- George, T.S., Simpson, R.J., Hadobas, P.A. and Richardson, A.E. (2005) Expression of a fungal phytase gene in *Nicotiana tabacum* improves phosphorus nutrition of plants grown in amended soils. *Plant Biotechnol. J.* **3**, 129–140.
- Gilbert, G.D. (2009) The disappearing nutrient. *Nature*, **461**, 716–718.
- Hayes, J., Simpson, R. and Richardson, A. (2000) The growth and phosphorus utilisation of plants in sterile media when supplied with inositol hexaphosphate, glucose 1-phosphate or inorganic phosphate. *Plant Soil*, **220**, 165–174.
- Hinsinger, P. (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil*, **237**, 173–195.
- Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C. and Jaillard, B. (2003) Origins of root-induced pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. *Plant Soil*, **248**, 43–59.
- Holford, I.C.R. (1997) Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. *Aust. J. Soil Res.* **35**, 227–239.
- Idriss, E.E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H. and Richter, T. (2002) Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology*, **148**, 2097–2109.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**, 3901–3907.
- Khan, G.A., Bouraine, S., Wege, S., Li, Y., de Carbonnel, M., Berthomieu, P., Poirier, Y. et al. (2014) Coordination between zinc and phosphate homeostasis involves the transcription factor PHR1, the phosphate exporter PHO1, and its homologue PHO1;H3 in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **65**, 871–884.
- Latta, M. and Eskin, M. (1980) A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *J. Agric. Food Chem.* **28**, 1313–1315.
- Lei, X.G., Porres, J.M., Mullaney, E.J. and Brinch-Pedersen, H. (2007) Phytase: source, structure and application. In *Industrial Enzymes* (Polaina, J. and MacCabe, A.P., eds), pp. 505–529. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Lei, X., Weaver, J., Mullaney, E., Ullah, A. and Azain, M. (2013) Phytase, a new life for an “old” enzyme. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **1**, 283–309.
- Li, M., Osaki, M., Madhusudana, Rao, I. and Tadano, T. (1997) Secretion of phytase from the roots of several plant species under phosphorus-deficient conditions. *Plant Soil*, **195**, 161–169.
- Li, L., Tang, C., Rengle, Z. and Zhang, F.S. (2003) Chickpea facilitates phosphorus uptake by intercropping wheat from an organic phosphorus source. *Plant Soil*, **248**, 305–312.
- Li, L., Li, S.M., Sun, J.H., Zhou, L.L., Bao, X.G., Zhang, H.G. and Zhang, F.S. (2007) Diversity enhances agricultural productivity via rhizosphere phosphorus facilitation on phosphorus-deficient soils. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **104**, 11192–11196.
- Liu, J.F., Wang, X.F., Li, Q.L., Li, X., Zhang, G.Y., Li, M.G. and Ma, Z.Y. (2011) Biolistic transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) with the phyA gene from *Aspergillus ficuum*. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* **106**, 207–214.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, **25**, 402–408.
- Lung, S.C., Chan, W.-L., Yip, W., Wang, L., Yeung, E. and Lim, B. (2005) Secretion of beta-propeller phytase from tobacco and *Arabidopsis* roots enhances phosphorus utilisation. *Plant Sci.* **169**, 341–349.
- Ma, X.F., Wright, E., Ge, Y., Bell, J., Xi, Y., Bouton, J.H. and Wang, Z.Y. (2009) Improving phosphorus acquisition of white clover (*Trifolium repens* L.) by transgenic expression of plant derived phytase and acid phosphatase genes. *Plant Sci.* **176**, 479–488.
- Misson, J., Thibaud, M.C., Bechtold, N., Raghothama, K. and Nussaume, L. (2004) Transcriptional regulation and functional properties of *Arabidopsis* Pht 1.4, a high affinity transporter contributing greatly to phosphate uptake in phosphate deprived plants. *Plant Mol. Biol.* **55**, 727–741.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473–497.
- Murphy, J. and Riley, J.P. (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Act.* **27**, 31–36.
- Neumann, G. and Römheld, V. (1999) Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant Soil*, **211**, 121–130.
- Nuruzzaman, M., Lambers, H., Bolland, M.D.A. and Veneklaas, E.J. (2006) Distribution of carboxylates and acid phosphatase and depletion of different phosphorus fractions in the rhizosphere of a cereal and three grain legumes. *Plant Soil*, **281**, 109–120.
- Pearse, S.J., Veneklaas, E.J., Cawthray, G.R., Bolland, M.D. and Lambers, H. (2006) Carboxylate release of wheat, canola and 11 grain legume species as affected by phosphorus status. *Plant Soil*, **288**, 127–139.
- Raghothama, K.G. (1999) Phosphate acquisition. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 665–693.
- Richardson, A.E., Hadobas, P.A. and Hayes, J.E. (2000) Acid phosphomonoesterase and phytase activities of wheat (*Triticum aestivum* L.) roots and utilization of organic phosphorus substrates by seedlings grown in sterile culture. *Plant, Cell Environ.* **23**, 397–405.
- Richardson, A.E., Hadobas, P.A. and Hayes, J.E. (2001) Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. *Plant J.* **25**, 641–649.
- Rouached, H., Wirtz, M., Alary, R., Hell, R., Arpat, A.B., Davidian, J.C., Fourcroy, P. et al. (2008) Differential regulation of the expression of two high-affinity sulfate transporters, SULTR1.1 and SULTR1.2, in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **147**, 897–911.
- Rouached, H., Secco, D., Arpat, B. and Poirier, Y. (2011) The transcription factor PHR1 plays a key role in the regulation of sulfate shoot-to-root flux upon phosphate starvation in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* **11**, 19.
- Sanyal, S.K. and De Datta, S.K. (1991) Chemistry of phosphorus transformations in soil. *Adv. Soil Sci.* **16**, 1–120.
- Schachtman, D.P., Reid, R.J. and Ayling, S.M. (1998) Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol.* **116**, 447–453.
- Scheible, W.R. and Rojas-Triana, M. (2015) Sensing, signalling, and control of phosphate starvation in plants: molecular players and applications. *Annu. Plant Rev. Phosphorus Metab. Plant*, **48**, 25.

- Shin, H., Shin, H.S., Dewbre, G.R. and Harrison, M.J. (2004) Phosphate transport in *Arabidopsis*: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. *Plant J.* **39**, 629–642.
- Tang, C., McLay, C.D.A. and Barton, L. (1997) A comparison of proton excretion of twelve pasture legumes grown in nutrient solution. *Aust. J. Exp. Agric.* **37**, 563–570.
- Vance, C.P., Uhde-Stone, C. and Allan, D.L. (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol.* **157**, 423–447.
- Wang, Y., Xu, H., Kou, J.J., Shi, L., Zhang, C.Y. and Xu, F. (2013) Dual effects of transgenic *Brassica napus* overexpressing CS gene on tolerances to aluminum toxicity and phosphorus deficiency. *Plant Soil*, **362**, 231–246.
- Xiao, K., Harrison, M.J. and Wang, Z.Y. (2005) Transgenic expression of a novel *M. truncatula* phytase gene results in improved acquisition of organic phosphorus by *Arabidopsis*. *Planta*, **222**, 27–36.
- Zimmermann, P., Zardi, G., Lehmann, M., Zeder, C., Amrhein, N., Frossard, E. and Bucher, M. (2003) Engineering the root-soil interface via targeted expression of a synthetic phytase gene in trichoblasts. *Plant Biotechnol. J.* **1**, 353–360.

Supporting information

Additional Supporting information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Generation of transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing espy-US417.