

# Réponses des plantes à la disponibilité en azote

Anne Krapp<sup>1,2</sup> et Loren Castaings<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UMR1318, Institut Jean-Pierre Bourgin, Saclay Plant Sciences, RD10, 78000 Versailles, France

<sup>2</sup> AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin, RD10, 78000 Versailles, France

<sup>3</sup> Department of Plant Developmental Biology, Max Planck Institute for Plant Breeding Research, 50829 Cologne, Allemagne

Auteur correspondant : Anne Krapp, [anne.krapp@versailles.inra.fr](mailto:anne.krapp@versailles.inra.fr)

Reçu le 24 juin 2012

**Résumé** – L'azote est un macronutriment essentiel au développement et à la productivité des plantes. L'adaptation face à des fluctuations de la disponibilité en azote dans le sol est cruciale, étant donné que les plantes sont immobiles. L'assimilation du nitrate, la source d'azote principale dans les zones tempérées, ainsi que son transport sont discutés en rapport avec l'adaptation à une carence azotée. L'intégration du métabolisme azoté avec le métabolisme primaire et secondaire ainsi que l'homéostasie avec d'autres macroéléments sont décrites. Le nitrate n'est pas qu'un élément nutritif mais joue également un rôle de signal. Les différents niveaux de régulation ainsi que les acteurs moléculaires et les réseaux de régulation sont discutés.

**Mots clés** : Plantes / azote / métabolisme / signalisation / adaptation à l'environnement

**Abstract** – Plant adaptation to nitrogen availability.

Nitrogen is an essential macronutrient for plant development and productivity. The adaptation toward changes in nitrogen availability in the soil is crucial for the immobile plant. Nitrate is the primary nitrogen source in temperate climate. Nitrate transport and assimilation are discussed with emphasis on the adaptation to nitrogen starvation. The integration of nitrogen metabolism with primary and secondary metabolism and the homeostasis with other nutrients are discussed. However, nitrate is not only a nutrient, but also a signaling molecule acting on multiple levels. The molecular players involved in the regulatory network are discussed.

**Key words**: Plants / nitrogen / metabolism / signaling / adaptation to the environment

## Introduction

Pour tous les organismes vivants, la capacité de détecter et de s'adapter aux changements de l'environnement est l'un des principaux défis pour leur survie et leur propagation. En particulier pour des organismes sessiles tels que les plantes, l'adaptation à court terme et à long terme face à des fluctuations des éléments nutritifs dans le sol est cruciale. L'azote est un macronutriment essentiel à la survie de tous les organismes vivants. Il représente environ 2 % de la matière sèche de la plante et entre dans la composition

de nombreuses biomolécules comme les protéines, les acides nucléiques et certains métabolites secondaires (Crawford & Forde, 2002). Les plantes et les champignons sont les seuls organismes multicellulaires capables d'assimiler l'azote inorganique présent dans le milieu. Le nitrate est la source principale d'azote pour les plantes supérieures dans les zones tempérées. Il est absorbé au niveau des racines et assimilé majoritairement dans les feuilles pour être incorporé aux acides aminés. Cet ion a également une fonction de molécule-signal participant au contrôle de nombreux processus développementaux ou adaptatifs. Si les plantes

sont immobiles et ne peuvent pas se déplacer pour acquérir les nutriments nécessaires à leur survie, elles ont néanmoins développé des stratégies pour percevoir et s'adapter efficacement à la disponibilité en nutriments en modulant leur morphologie, leur activité métabolique, de même que l'expression d'un grand nombre de gènes (Wang *et al.*, 2004, Scheible *et al.*, 2004). Le nitrate est responsable de la reprogrammation du métabolisme azoté et carboné. Il agit sur la distribution des ressources entre les parties aériennes et racinaires, ainsi que sur le développement racinaire (Scheible *et al.*, 1997, Zhang *et al.*, 1999).

Cependant, la quantité et la disponibilité en azote dans les sols sont souvent insuffisantes pour assurer une croissance optimale et deviennent par conséquent des facteurs limitant en agronomie. L'apport d'azote sous forme d'engrais permet d'assurer un bon rendement des cultures mais pose des problèmes économiques et environnementaux. Pour répondre à une demande croissante de nourriture, l'utilisation mondiale d'azote dans la production agricole devrait être multipliée par trois d'ici 2050, pour atteindre 249 millions de tonnes par an (Tilman *et al.*, 2002). En même temps, les coûts environnementaux et économiques augmentent de façon très importante en raison de la demande accrue et des prix de l'énergie nécessaire au processus de fabrication d'engrais azotés. Le principal problème réside dans le fait que l'efficacité du prélèvement des engrais azotés par les plantes est faible. Dans certains cas, seulement 30 à 50 % de l'azote appliqué sont utilisés par les plantes cultivées (Peoples *et al.*, 1995). L'azote restant sera en partie consommé par la culture suivante, mais aussi en partie perdu pour l'agroécosystème. De plus, les engrais azotés non utilisés peuvent contaminer les systèmes aquatiques et conduire à leur eutrophisation (Johnson *et al.*, 2007). En outre, l'azote émis dans l'atmosphère sous sa forme gazeuse, N<sub>2</sub>O, a un potentiel de réchauffement global 296 fois supérieur au CO<sub>2</sub> (IPCC, 2007). En plus de cet effet néfaste sur l'atmosphère, la fabrication des engrais est gourmande en énergie et contribue ainsi au réchauffement climatique par le biais des rejets de CO<sub>2</sub>.

Mieux comprendre le métabolisme azoté et l'adaptation des plantes à des fluctuations en disponibilité d'azote a donc un intérêt agronomique majeur visant à optimiser l'apport d'engrais pour maintenir une bonne productivité agricole tout en diminuant les coûts de production et en respectant l'environnement.

## Un réseau de transporteurs de nitrate

Les plantes disposent de plusieurs types de transporteurs de nitrate racinaires, qui diffèrent par leur affinité pour cet ion (Glass *et al.*, 1992). Ces différents

systèmes permettent aux plantes de s'adapter aux concentrations variables rencontrées dans les sols, qui peuvent aller de 1 à 10 mM dans les zones cultivées (Crawford & Forde, 2002). Les systèmes de transport dits « à haute affinité », ou HATS (*High Affinity Transport Systems*), sont capables de véhiculer le nitrate lorsque sa concentration dans le milieu est inférieure à 0,5 mM, alors que les systèmes dits « à faible affinité », ou LATS (*Low Affinity Transport Systems*), transportent le nitrate lorsque sa concentration est supérieure à 0,5 mM. Les gènes codant ces transporteurs de nitrate appartiennent à des familles multigéniques : les transporteurs *NRT1* ont une faible affinité pour le nitrate, alors que les *NRT2* ont une forte affinité (Orsel *et al.*, 2002).

La famille *NRT1* d'*Arabidopsis* compte 53 membres, dont 16 ont été caractérisés comme étant impliqués dans le transport de peptides ou de nitrate. Les gènes *NRT1.1* et *NRT1.2* ont été décrits dans le transport racinaire du nitrate à faible affinité (Tsay *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1999). Mais *NRT1.1* peut également fonctionner comme un transporteur de nitrate à haute affinité (Wang *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999). Le passage d'une affinité à l'autre dépend de l'état de phosphorylation du résidu thréonine 101, et le contrôle de cette phosphorylation dépend du statut nutritionnel de la plante (Liu & Tsay, 2003).

La famille des gènes *NRT2* comporte sept membres chez *Arabidopsis* (Orsel *et al.*, 2002). Le transporteur *NRT2.1* est localisé au niveau de la membrane plasmique des cellules de l'épiderme et de l'endoderme des racines (Chopin *et al.*, 2007) et assure 80 % du transport à haute affinité dans des conditions limitantes en azote. Un double mutant, délété pour le gène *NRT2.1* et une partie du gène *NRT2.2*, a permis de mettre en évidence le rôle physiologique de ces protéines dans l'influx racinaire de nitrate à haute affinité (Cerezo *et al.*, 2001; Filleur *et al.*, 2001; Orsel *et al.*, 2004). De plus, il semblerait que la protéine *NAR2.1* interagisse avec *NRT2.1* pour permettre le bon adressage de ce transporteur et le bon fonctionnement du HATS (Okamoto *et al.*, 2006; Orsel *et al.*, 2006; Wirth *et al.*, 2007; Yong *et al.*, 2010). *NRT2.7* est principalement exprimé dans les graines sèches. Il a été récemment montré que la protéine *NRT2.7* est localisée au tonoplaste (la membrane des vacuoles) et permet ainsi l'accumulation de nitrate dans la vacuole des graines (Chopin *et al.*, 2007). En réponse à une carence en azote, l'expression des gènes *NRT2.4* et *NRT2.5* (Orsel *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2003; Kiba *et al.*, 2012) est fortement induite. Si la fonction de la protéine *NRT2.5* est encore inconnue, il a été montré que celle de *NRT2.4*, protéine localisée de façon polarisée au niveau de la membrane plasmique, est de permettre l'influx racinaire du nitrate lorsque sa concentration est très faible. De plus,

l'expression de *NRT2.1* est également induite de façon transitoire en raison de la levée de sa répression par les acides aminés. Des triples mutants *nrt2.1 nrt2.2 nrt2.4* montrent un phénotype de croissance altérée en présence de faibles concentrations de nitrate dans le milieu, ce qui révèle un réseau sophistiqué de transporteurs au niveau racinaire.

Une fois que le nitrate est absorbé au niveau racinaire, son devenir dépend des besoins en azote de la plante. Si la plante n'a pas besoin d'azote, le nitrate absorbé peut être stocké dans les vacuoles, et/ou excrété par les cellules racinaires. Lorsque les besoins en azote de la plante augmentent, les réserves de nitrate accumulées dans les vacuoles sont utilisées pour la synthèse *de novo* d'acides aminés. Pour sa réduction mais aussi pour son stockage vacuolaire, le nitrate est majoritairement transporté *via* le xylème vers les feuilles et les pétioles (Clarkson, 1986; Bothe, 1987; Van der Leij *et al.*, 1998; Krapp *et al.*, 2011). Il existe un équilibre entre l'efflux de nitrate, sa réduction dans le cytosol, son stockage dans la vacuole et son export *via* le xylème (Agrell *et al.*, 1997). Cet équilibre est finement contrôlé par sa disponibilité dans le sol et par les besoins nutritionnels de la plante (Herdel *et al.*, 2001). Au niveau cellulaire, les mécanismes et les éléments régulateurs contrôlant les flux de nitrate dans la plante sont encore assez peu connus. Si les mécanismes d'efflux racinaire de nitrate sont moins connus que les mécanismes d'influx, un transporteur de la famille des PTR/NRT1, la protéine NAXT1 (*Nitrate excretion transporter 1*) a récemment été impliquée dans l'efflux de nitrate au niveau de la membrane plasmique (Segonzac *et al.*, 2007). De plus, NRT1.5, qui est impliqué dans le chargement du xylème en nitrate, agit par un mécanisme d'efflux. L'homéostasie du nitrate intracellulaire semble reposer en partie sur des protéines de la famille des canaux anioniques CLC (*chloride channels*) (Geelen *et al.*, 2000). Il a été récemment démontré par des approches de localisation subcellulaire et d'électrophysiologie que CLCa et CLCb étaient impliqués dans le chargement vacuolaire du nitrate (De Angeli *et al.*, 2006; von der Fecht-Bartenbach *et al.*, 2010). La remobilisation du nitrate de la vacuole vers le cytoplasme dépend de l'efficacité de son transport à travers le tonoplaste, mais aussi de son assimilation par la nitrate réductase (Van der Leij *et al.*, 1998; Cookson *et al.*, 2005).

Plusieurs transporteurs NRT1/NRT2 (NRT1.4, NRT1.5, NRT1.7, NRT1.9, NRT2.4) sont actifs dans la distribution du nitrate vers les parties aériennes *via* le xylème ou dans la remobilisation du nitrate *via* le phloème (Wang *et al.*, 2012). En plus des protéines des familles NRT1 et NRT2, les canaux anioniques X-QUAC (*Quick Activating Anion Conductance*), inducibles par le nitrate et situées sur la membrane plasmique des cellules du parenchyme, sont aussi

impliqués dans la translocation du nitrate (Köhler *et al.*, 2002). Seuls *NRT1.7* et *NRT2.4*, exprimés dans le phloème, sont induits par une carence en azote. Leurs mutants respectifs ont tous deux des taux de nitrate réduits dans les exsudats phloémiens. Pourtant, seuls les mutants *nrt1.7* ont une croissance réduite lorsque l'azote devient limitant.

## Assimilation de nitrate et remobilisation d'azote

L'assimilation du nitrate a lieu dans le cytosol et dans les chloroplastes. Le nitrate présent dans le cytosol est réduit en nitrite par la nitrate réductase (NR). Cette enzyme cytosolique fonctionne en homodimère et réduit le nitrate en nitrite grâce aux électrons fournis par le NADH (Rouzé & Caboche, 1992). Les monomères de NR sont liés entre eux par des ponts disulfure et sont associés à trois cofacteurs : la flavine adénine dinucléotide (FAD), l'hème (de type cytochrome b557) et le cofacteur à molybdène (Moco). Le nitrite est transporté vers les plastes pour y être réduit. Récemment, une protéine de la famille des POT (*Proton-dependent Oligopeptide Transporters*) a été identifiée comme un transporteur de nitrite et localisée au niveau des membranes du chloroplaste (Sugiura *et al.*, 2007). Une fois dans les plastes, le nitrite est réduit en ammonium par la nitrite réductase (Kleinhofs & Warner, 1990). L'ammonium est d'abord incorporé dans la glutamine, puis la glutamine est transformée en glutamate qui servira de base à la synthèse des autres acides aminés (Mifflin & Habash, 2002). La glutamine synthétase (GS) et la glutamate synthase (GOGAT) sont les enzymes principales qui catalysent ces deux réactions consécutives, nommées cycle GS/GOGAT. Une troisième enzyme, la glutamate déshydrogénase (GDH), a un rôle plus controversé.

Dans des conditions de carence en azote, les activités de la NR et de la GS diminuent fortement, alors que l'activité de la GDH augmente (Krapp *et al.*, 2011). Bien que la fonction de la GDH *in planta* soit encore incertaine, son rôle dans le catabolisme des acides aminés pourrait expliquer son implication dans la remobilisation d'azote en cas de carence azotée, comme cela a été proposé lors de la sénescence (Diaz *et al.*, 2006; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006). La désamination catalysée par la GDH semble être une source importante d'ammonium qui peut être ré-assimilé par exemple sous forme d'acides aminés. Toutefois, des études de plus en plus nombreuses indiquent que la GDH dans des réponses au stress offrirait un itinéraire supplémentaire/alternatif à la voie GS/GOGAT pour l'assimilation d'ammonium (Skopelitis *et al.*, 2006). Chez le tabac et la vigne, la

GDH semble jouer un rôle dans le recyclage d'ammonium dans les cellules compagnes (Dubois *et al.*, 2003; Tercé-Laforgue *et al.*, 2004; Fontaine *et al.*, 2006). Il a été montré que l'ammonium intracellulaire provenant de l'ammonium exogène (Tercé-Laforgue *et al.*, 2004), ainsi que des activités protéolytiques élevées induites par la sénescence (Masclaux *et al.*, 2000; Loulakakis *et al.*, 2002) ou encore des stresses abiotiques (Lutts *et al.*, 1999; Hoai *et al.*, 2003) entraînaient une augmentation de l'activité amination de la GDH *in vitro*. Dans des conditions de carence en azote, l'ammonium est produit par plusieurs processus cataboliques. Il a également été montré que l'activité GDH augmentait de 200 % chez les plantes cultivées en présence de quantités limitantes en azote (Tschoep *et al.*, 2009).

La remobilisation de l'azote implique la dégradation de protéines. Récemment, une ubiquitine ligase de type E3, NLA, a été identifiée comme étant impliquée dans la remobilisation (Peng *et al.*, 2007). Les plantes mutées pour le gène *NLA* présentent, dans des conditions limitantes en azote, une expression modifiée des gènes impliqués dans la synthèse des composés azotés, la dégradation des acides aminés, l'accumulation d'amidon, la sénescence, et la biosynthèse des anthocyanes et des phénylpropanoïdes (Peng *et al.*, 2007). Il semble donc que la dégradation des protéines *via* le protéasome soit importante pour la réponse au nitrate.

## Intégration avec le métabolisme primaire

La relation étroite entre les métabolismes azoté et carboné a été bien établie (pour revue, voir Krapp & Truong, 2006). Les squelettes carbonés sont essentiels pour l'incorporation de l'azote inorganique dans des composés comme les acides aminés, les protéines, les acides nucléiques et un grand nombre de métabolites secondaires. Au cours de l'assimilation du nitrate, 55 % du carbone fixé par la photosynthèse sont convertis par le biais de la glycolyse en phosphoenolpyruvate (PEP) et en acides organiques, par exemple le 2-oxoglutarate (2OG), qui est le squelette carboné de base des premières étapes de l'incorporation de l'azote en acides aminés (Huppe *et al.*, 1994). De plus, la réduction d'azote inorganique ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ) consomme beaucoup d'énergie et de pouvoir réducteur : la réduction du  $\text{NO}_3^-$  en  $\text{NH}_4^+$  nécessite 6 ferrédoxines, qui sont fournies par les réactions de la photosynthèse. Ainsi la réduction du  $\text{NO}_3^-$  et du  $\text{CO}_2$  sont potentiellement en concurrence pour les équivalents réducteurs produits par la chaîne de transport d'électrons dans le chloroplaste (Bloom, 1997).

Inversement, l'effet de l'assimilation d'azote sur la photosynthèse est évident, en particulier en ce qui concerne les protéines (produits azotés) impliquées

dans le processus de photosynthèse. L'enzyme-clé de la fixation du  $\text{CO}_2$ , la Rubisco, est la principale composante azotée d'une cellule photosynthétique. En effet, la proportion de la Rubisco dans une cellule de feuille peut atteindre jusqu'à 50 % des protéines totales. L'efficacité catalytique de l'enzyme Rubisco est plutôt faible ; par conséquent, elle doit être présente en grandes quantités. En outre, en plus de la Rubisco, un grand nombre de protéines thylakoïdales et un grand nombre d'autres activités catalytiques sont nécessaires pour des réactions photosynthétiques primaires et secondaires.

Une coordination de ces deux voies très interdépendantes est nécessaire pour assurer un développement optimal des plantes, car l'assimilation du carbone et de l'azote sous forme de matière organique a un effet marqué sur la productivité des plantes et le rendement des cultures (Lawlor *et al.*, 1989; Lawlor, 2002). En effet, au niveau de la plante entière, de nombreuses données montrent les interconnexions entre la photosynthèse et le métabolisme azoté, et leur importance pour la croissance et le développement des plantes. La photosynthèse est affectée par le métabolisme azoté. Ainsi la carence azotée peut provoquer une réduction de la capacité photosynthétique et une accumulation d'amidon et de sucres. Les sucres sont synthétisés dans les parties aériennes, mais comme la racine représente le puits principal en cas de carence en azote (voir ci-dessous), le saccharose est transporté vers les racines. Dans les études sur la carence azotée, il a été montré que le saccharose s'accumulait très rapidement dans les parties aériennes et seulement plus tard dans les racines (Krapp *et al.*, 2011). En outre, l'amidon s'accumule en quantités très élevées dans les feuilles et n'est pas complètement utilisé pendant la nuit. Une corrélation négative entre la teneur en amidon et la croissance a été observée dans les situations de stress, et il a été démontré que l'amidon jouait un rôle intégrateur majeur pour la croissance (Sulpice *et al.*, 2009).

En plus des concentrations de glucose, de fructose et de saccharose, les concentrations d'autres sucres mineurs augmentent pendant une carence en azote. Les teneurs en mannose et en galactose augmentent rapidement dans les parties aériennes, mais beaucoup moins rapidement dans les racines, alors que l'inverse a été observé pour les teneurs en xylose. Pour les parties aériennes, le composé dont la teneur augmente le plus est le raffinose (80 fois), tandis qu'il n'augmente que de trois fois dans les racines. Le raffinose s'accumule aussi en cas d'autres contraintes abiotiques, comme le froid ou la sécheresse (Taji *et al.*, 2002), et certains auteurs pensent qu'il joue un rôle dans l'osmoprotection et dans la stabilisation des membranes cellulaires. Toutefois, dans les plantes transgéniques avec des niveaux élevés de raffinose, aucun effet sur



l'acclimatation au froid n'a été observé (Zuther *et al.*, 2004). Une autre hypothèse suggère que le raffinose et son précurseur, le galactinol, peuvent agir comme des piègeurs de radicaux (Nishizawa *et al.*, 2008) et, par conséquent, protéger les cellules contre le stress oxydatif, qui est connu pour se produire lors de différents stressés tels que la carence en azote (Shin *et al.*, 2005).

La synthèse des acides organiques joue un rôle majeur dans l'assimilation de l'azote, parce que ces acides sont utilisés comme squelettes carbonés pour la biosynthèse d'acides aminés, et qu'ils sont également impliqués dans le maintien du pH. Lorsque du nitrate est ajouté à l'algue *Selenastrum minutum*, la pyruvate kinase et la PEP carboxylase (PEPC) sont activées et le flux de carbone sous forme d'acides organiques est stimulé (Huppe *et al.*, 1994; Turpin *et al.*, 1997). Il est également prouvé que les signaux du métabolisme azoté permettent de coordonner la régulation transcriptionnelle d'un groupe d'enzymes-clés de la synthèse des acides organiques dans les plantes supérieures (Scheible *et al.*, 1997). Le fumarate, un autre acide organique, semble se comporter comme un puits de carbone pour la photosynthèse, d'une manière similaire à l'amidon. Il a été rapporté que lorsque l'accumulation d'amidon est bloquée dans le mutant *pgm1*, le surplus en carbone est incorporé dans le fumarate (Chia *et al.*, 2000). Cependant ce rôle n'est pas encore clair : il a été montré que la teneur en fumarate augmentait de façon significative dans les parties aériennes de plantes carencées en azote, tandis qu'elle diminuait dans des plantes cultivées dans des conditions limitantes en azote (Tschoep *et al.*, 2009). L'analyse d'un mutant de la fumarase cytosolique (*fum2*) (Pracharoenwattana *et al.*, 2010) a révélé un lien entre les acides aminés et le fumarate.

Bien que la régulation de chaque voie métabolique par l'azote et le carbone soit assez bien décrite, nous commençons tout juste à découvrir les acteurs moléculaires impliqués dans ces processus, tels que les facteurs métaboliques ayant un rôle de régulation et les systèmes de détection de ces signaux (pour revue, voir Coruzzi & Bush, 2001; Coruzzi & Zhou, 2001; Foyer *et al.*, 2003). Des modifications simultanées des métabolismes carboné et azoté ont été réalisées par la surexpression du facteur de transcription DOF1 (Yanagisawa *et al.*, 2004). Ces plantes transgéniques poussent mieux en conditions limitantes en azote.

### L'effet de la disponibilité en azote sur l'homéostasie d'autres macroéléments

Récemment, Kant *et al.* (2011) ont montré que la teneur en phosphate augmente dans les parties aériennes des plantes cultivées en conditions limitantes en azote. À l'inverse, lorsque la carence en azote est complète,

la teneur en phosphate des parties aériennes diminue (Krapp *et al.*, 2011). Le modèle du *cross-talk* de nitrate et de phosphate proposé par Kant et ses collègues suggère que le nitrate inhibe l'absorption du phosphate par les racines et que, par conséquent, la plante absorbe davantage de phosphate en cas de faible apport externe de nitrate ; et ce dernier s'accumule alors dans les parties aériennes. En cas de carence en azote, il a été proposé que l'absorption accrue de phosphate conduise à une augmentation de la quantité totale de phosphate racinaire, car dans ce cas la plupart des ressources sont dirigées vers le puits le plus attractif, la racine. Un fin contrôle de l'homéostasie ionique *via* le *cross-talk* de la régulation en éléments nutritifs est peut-être une caractéristique générale, comme cela a été décrit pour le phosphore et le soufre (Rouached *et al.*, 2011).

En effet, plusieurs études ont montré des interactions entre la régulation de l'assimilation du soufre et la réduction des nitrates (Koprivova *et al.*, 2000). La cystéine synthétase (CS), dernière enzyme de la voie d'assimilation du sulfate, joue un rôle critique car l'OAS (o-acétylsérine), qui est le précurseur de la réaction qu'elle catalyse, est dérivé des voies d'assimilation carbonée et azotée. Une sur-représentation des transcrits de l'assimilation du soufre a été mise en évidence dans les racines et les parties aériennes en réponse à la carence en azote (Krapp *et al.*, 2011).

### Intégration avec le métabolisme secondaire

En réponse à une carence en azote, la plante accumule des anthocyanes, des flavonoïdes et des composés phénoliques dans la feuille (Hsieh *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2002; Scheible *et al.*, 2004; Lea *et al.*, 2007; Bernard *et al.*, 2009). Cette accumulation pourrait favoriser la résistance aux agents pathogènes (Matros *et al.*, 2006). En ce qui concerne l'impact de l'environnement, en particulier la disponibilité en nutriments, plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer les changements des teneurs en métabolites secondaires dans les tissus végétaux. La plus célèbre est l'hypothèse des équilibres de croissance-différenciation (GDBH : *growth-differentiation balance hypothesis*, Loomis, 1932). La GDBH est basée sur un compromis entre l'allocation des ressources au métabolisme primaire (favorisant la croissance) et la production de métabolites secondaires (bénéfique pour la défense). Donc, une ressource qui limite la croissance des plantes ainsi que la fixation du carbone (photosynthèse) favorise l'accumulation des métabolites secondaires. Si l'on considère la disponibilité en azote, la plupart des expériences sur l'accumulation des composés phénoliques corrobore la GDBH (Glynn *et al.*, 2007). Toutefois, il convient de noter que presque toutes ces

études ont été axées sur les parties aériennes, et que les données sur les racines sont rares.

Cependant, le mécanisme moléculaire par lequel la carence en azote favorise une concentration élevée en certains flavonoïdes n'est pas clair. La phénylalanine est un acide aminé essentiel à l'interface entre métabolismes primaire et secondaire. La phénylalanine ammonium-lyase (PAL) dirige le flux vers le métabolisme secondaire, et libère en même temps de l'ammonium qui est ré-assimilé. Le gène *PAL* et l'enzyme PAL sont tous deux fortement régulés par divers facteurs environnementaux (Herrmann & Weaver, 1999), mais aucune étude détaillée concernant leur régulation par la disponibilité en azote n'existe. Cependant, il a été montré que d'autres gènes impliqués dans le métabolisme secondaire étaient induits en cas de carence en azote (Scheible *et al.*, 2004). Les gènes de la synthèse des flavonoïdes sont principalement exprimés de manière différentielle dans les parties aériennes, tandis que d'autres gènes de la synthèse des phénylpropanoïdes sont les plus modulés dans les racines (Krapp *et al.*, 2011). Cette observation était prévisible, car les anthocyanes s'accumulent principalement dans les parties aériennes après une longue carence en azote. L'analyse détaillée de la régulation de la voie des flavonoïdes en aval de la PAL a révélé que la déficience en azote favorisait uniquement la transcription de certains gènes bHLH et MYB (*GL3*, *PAP2*, *MYB12*) importants pour l'accumulation des anthocyanes et des flavonols (Lea *et al.*, 2007).

## L'azote comme signal intervenant dans l'adaptation

Chez les végétaux supérieurs, différents macro- et micro-nutriments jouent non seulement un rôle nutritionnel, mais ont aussi une fonction de signalisation indépendante de leur métabolisme. Cette signalisation permet la régulation de l'expression des gènes impliqués dans leur transport et leur métabolisme, mais conduit également à la modification de la morphologie de la plante pour s'adapter aux conditions environnementales (Coruzzi & Bush, 2001). Il a été montré que le nitrate pouvait agir en tant que molécule-signal contrôlant l'expression des gènes et le développement des plantes. Si les effets du nitrate sur la morphologie de la plante sont assez bien décrits, les acteurs moléculaires de sa signalisation sont encore peu connus. Quelques éléments participant à cette signalisation commencent cependant à être identifiés et laissent présager de nombreuses interconnexions avec d'autres voies de signalisation comme celles des hormones ou des sucres (Coruzzi & Zhou, 2001).

## L'architecture racinaire et la perception du nitrate

Puisque les plantes doivent s'adapter à des teneurs en nitrate très variables dans les sols, elles ont développé des systèmes leur permettant de percevoir le nitrate du sol et de modifier leur architecture racinaire pour coloniser les régions les plus riches. Elles ont également élaboré un système de perception du nitrate endogène qui leur permet d'adapter l'expansion de leur système racinaire et foliaire en fonction de leurs besoins. Ainsi, lorsque l'apport d'azote est faible, les plantes vont développer leurs racines aux dépens des feuilles afin d'améliorer l'acquisition racinaire de l'azote (Drew, 1975; Scheible *et al.*, 1997). Cette redistribution des ressources a pour conséquence une diminution du ratio *shoot/root* de la plante, qui est le rapport des masses fraîches foliaires sur les masses fraîches racinaires. En plus de son effet sur le ratio *shoot/root*, le nitrate contrôle également la morphologie racinaire par deux mécanismes distincts et antagonistes décrits comme « l'effet localisé » et « l'effet systémique » du nitrate (Zhang *et al.*, 2007). Les voies de signalisation du nitrate aboutissant à ces différentes réponses de la plante sont encore peu connues, mais il semblerait qu'elles interfèrent avec de nombreuses autres voies de signalisation.

Chez *Arabidopsis*, plusieurs composantes de la voie de signalisation locale du nitrate ont été identifiées. Ainsi, ANR1, un facteur de transcription appartenant à la famille des MADS box, est impliqué dans l'élongation des racines latérales en réponse au nitrate. En effet, des plantes pour lesquelles l'expression de ce gène a été diminuée par stratégie anti-sens ou co-suppression ne répondent pas à l'application locale de nitrate (Zhang & Forde, 1998). Plus récemment, il a été démontré que des mutants pour le transporteur de nitrate NRT1.1 présentent un phénotype similaire à celui des lignées supprimées pour *ANR1* et sont insensibles à l'effet stimulant du nitrate sur la croissance des racines latérales. De plus, l'expression d'*ANR1* est fortement diminuée dans les mutants *nrt1.1*, suggérant que la protéine NRT1.1 participe à cette signalisation en amont d'ANR1 et serait impliquée dans la régulation transcriptionnelle de ce gène. L'étude de l'expression de *NRT2.1* dans le mutant *nrt1.1* a montré un défaut dans la régulation de ce gène par le nitrate, confirmant que NRT1.1 joue un rôle dans la signalisation de l'azote (Muñoz *et al.*, 2004). Il a donc été proposé que le transporteur de nitrate NRT1.1 jouerait un rôle de senseur du nitrate et participerait à la transmission locale du signal nitrate en induisant l'expression du gène *ANR1* pour aboutir à l'élongation des racines latérales (Remans *et al.*, 2006). Cependant, les mécanismes intervenant entre NRT1.1 et ANR1 sont encore à

découvrir, ainsi que ceux qui conduisent d'ANR1 à l'élongation des racines latérales. De récentes analyses transcriptomiques ont montré que des mutants du gène *NRT1.1/CHL1* présentaient une dérégulation de l'expression des gènes régulés par le nitrate, indépendamment du transport de l'ion (Hu, 2009; Wang, 2009). De plus, le mutant *nrt1.1-9* est découplé pour la signalisation et le transport, ce qui confirme le double rôle de NRT1.1/CHL1 dans le transport et la signalisation du nitrate (transcepteur).

Le transporteur de nitrate NRT2.1, tout comme NRT1.1, participe à la signalisation du nitrate de manière indépendante de ses fonctions de transporteur. Remans *et al.* (2006) ont montré que NRT2.1 était impliqué dans la signalisation qui conduit à l'initiation des *primordia* de racines latérales lorsque le nitrate est en faible concentration dans le milieu. L'initiation des racines latérales est inférieure chez le mutant *atnrt2.1* par rapport à celle de plantes sauvages présentant un influx de nitrate similaire à celui du mutant. Un rôle de senseur du nitrate avait déjà été proposé pour cette protéine par Little *et al.* (2005). Ces premières expériences avaient montré que le mutant *lin1*, portant une mutation ponctuelle dans le gène *NRT2.1*, était insensible à l'inhibition de l'émergence des racines latérales provoquée par un fort ratio carbone/azote (saccharose 4,5 %, nitrate d'ammonium 0,01 mM). Encore une fois, ce phénotype est indépendant de l'influx de nitrate dans les plantes, suggérant que NRT2.1 participe à la répression de l'émergence des racines latérales en tant que senseur ou élément de transduction du signal nitrate. Bien que le rôle signalétique de NRT2.1 ait clairement été établi par ces deux études, sa fonction dans l'initiation des racines latérales reste complexe puisqu'il peut soit la favoriser, soit l'inhiber en fonction des conditions.

## Régulation rapide de l'expression des gènes

En cas de carence en azote, environ 1000 gènes sont soit induits, soit réprimés, de façon organe-spécifique et de façon temporelle (Krapp *et al.*, 2011). En plus de son propre transport et de son assimilation, la carence en nitrate modifie l'expression des gènes liés à la biosynthèse des acides aminés et des acides nucléiques, ainsi que la transcription, la gestion des ARNs, la biosynthèse des ribosomes et des hormones, la production d'agents réducteurs, et le métabolisme du tréhalose. Il a été montré que la grande majorité de ces gènes était régulée de façon inverse par un apport en nitrate, ce qui laisse penser que les signalisations impliquées dans la perception du nitrate ou de sa carence sont en partie identiques.

Les acteurs moléculaires de ces signalisations sont encore très mal connus. Les transporteurs de nitrate

NRT2.1 et NRT1.1 participent à la signalisation du nitrate en tant que protéines senseurs (voir plus haut). Deux protéines kinases appartenant à la famille des protéines kinases CIPK, CIPK8 et CIPK23, ont été identifiées à la suite des études de transcriptome dans le mutant *nrt1.1 (chl1)*. Ces gènes, qui sont normalement induits fortement par le  $\text{NO}_3^-$ , répondent beaucoup moins fortement dans le mutant *nrt1.1 (chl1)*. Les CIPK interagissent avec les protéines CBL, des senseurs de calcium spécifiques des plantes qui, lorsqu'elles sont liées au calcium, activent les kinases CIPK et les cascades de signalisation qui en découlent (Albrecht, 2001). Les analyses de mutants *knock-out* de CIPK8 et CIPK23 ont montré que les deux kinases participaient à la réponse initiale au nitrate. Toutefois, CIPK8 est un régulateur positif de la phase de faible affinité de la réponse, alors que CIPK23 est un régulateur négatif de la phase de haute affinité. En cas de faible concentration de nitrate, CIPK23 phosphoryle CHL1 au niveau du résidu Thr101 (Ho *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2009).

Les facteurs de transcription sont les acteurs des voies de signalisation qui permettent la modification de l'expression des gènes en réponse à la perception d'un signal par des protéines senseurs ou récepteurs. Le premier facteur de transcription ayant été impliqué dans la signalisation du nitrate est ANR1, une protéine de la famille des *MADS-box*, qui participe à l'élongation des racines latérales par suite de la perception locale du nitrate par la protéine NRT1.1 (Zhang & Forde, 1998; Remans *et al.*, 2006). Ce n'est que récemment qu'une approche comparative a été utilisée avec succès pour identifier un second facteur de transcription, NLP7 (*Nin Like Protein 7*), impliqué dans la régulation du métabolisme azoté. NLP7 est l'un des neuf membres de la famille NLP chez *Arabidopsis* qui regroupe des facteurs de transcription RWP-RK. Les NLPs sont homologues à la fois à la protéine NIN, impliquée dans la formation des nodules en l'absence d'azote chez les légumineuses (Schauser *et al.*, 1999), et à la protéine NIT2 qui régule l'expression de la nitrate réductase (NIA) chez *Chlamydomonas* (Camargo *et al.*, 2007). Si le rôle moléculaire de la protéine NIN est encore inconnu chez les légumineuses, il a été montré en revanche que NIT2 se liait au promoteur du gène *NIA* chez *Chlamydomonas*. Nous avons montré que la protéine NLP7 constituait un régulateur positif des gènes inductibles par le  $\text{NO}_3^-$  et un régulateur négatif des gènes inductibles par la carence en azote (Castaings *et al.*, 2009). En outre, ces mutants présentent un phénotype constitutif de carence en azote, probablement dû à une altération de la signalisation azotée.

Tout récemment, trois autres facteurs de transcription de la famille LBD (*Lateral organ Boundary Domain*) ont été identifiés parmi des gènes inductibles

par le nitrate et ont été proposés comme candidats de sa signalisation. Ils se sont révélés être des régulateurs négatifs des signaux de la disponibilité en azote ainsi que de la biosynthèse des anthocyanes (Rubin *et al.*, 2009). Les mutants *lbd37*, *lbd38*, ou *lbd39* accumulent les anthocyanes lorsqu'ils sont cultivés dans des conditions suffisantes en azote et expriment constitutivement des gènes de la biosynthèse des anthocyanes. De plus, ces gènes *LBD* sont impliqués dans la répression directe ou indirecte de beaucoup d'autres gènes connus comme étant régulés par l'azote, y compris les gènes clés nécessaires à l'absorption et à l'assimilation de nitrate. Une élégante approche de biologie des systèmes a identifié un autre facteur de transcription, SPL9, comme impliqué lui aussi dans l'induction de gènes par le nitrate (Krouk *et al.*, 2010b).

Nous ne sommes qu'au début de la compréhension du réseau de régulation développé par les plantes pour s'adapter à la disponibilité en azote. Seule la partie émergée de l'iceberg est connue, et d'autres mécanismes épigénétiques tels que la régulation par des petits ARNs (Gifford *et al.*, 2008; Vidal *et al.*, 2010) ou par la modification de la chromatine (Widiez *et al.*, 2011) sont également impliqués.

### Crosstalk avec les voies de signalisation des phytohormones

La morphologie et le développement des plantes sont sous le contrôle de nombreux signaux environnementaux comme la disponibilité en nutriments, mais aussi sous le contrôle de signaux endogènes comme les hormones. La compréhension de ces signalisations progresse, et de nombreuses interconnexions entre les différentes voies commencent à émerger.

#### Interaction avec les cytokinines

La disponibilité en nitrate influence grandement la croissance des différents organes de la plante. Lorsque les plantes sont privées de nitrate, l'expansion des feuilles s'arrête au profit de l'expansion des racines, alors que l'inverse est observé lorsque le nitrate n'est pas limitant. Il a été démontré chez le tabac que la concentration en cytokinines augmentait dans les sèves du xylème après un apport de nitrate (Walch-Liu *et al.*, 2000). De manière analogue chez le maïs puis chez *Arabidopsis*, une réalimentation en nitrate entraîne une accumulation de cytokinines au niveau racinaire et un flux de ces hormones vers les parties aériennes (Takei *et al.*, 2001, 2002, 2004). Il est bien connu que les cytokinines jouent un rôle important dans la division cellulaire et la croissance. Il est donc possible qu'elles servent de médiateurs systémiques du signal nitrate conduisant à la croissance des parties aériennes (Walch-Liu *et al.*, 2000; Forde, 2002).

Au niveau moléculaire, une interaction entre les systèmes de régulation des cytokinines et du nitrate a été mise en évidence. Par exemple, le nitrate induit les gènes de biosynthèse des cytokinines comme *IPT3* (Takei *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004) ou des gènes de types *ARR* (*Arabidopsis Response Regulator*) intervenant dans la réponse aux cytokinines (Taniguchi *et al.*, 1998). En retour, les cytokinines contrôlent l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme et le développement, mais aussi dans l'acquisition des macronutriments dont le nitrate (Brenner *et al.*, 2005). Sakakibara *et al.* (2006) ont proposé un modèle d'intégration des signaux nitrate et cytokinines au niveau de la plante entière. Dans ce modèle, l'action couplée du nitrate et des cytokinines permettrait la régulation de la synthèse des protéines, du métabolisme hormonal ou des flux d'eau, mais aussi le contrôle des réponses morphologiques de la plante.

#### Interaction avec l'acide abscissique

L'acide abscissique (ABA) est une autre hormone qui joue un rôle important pour l'inhibition systémique de l'émergence et de l'élongation des racines latérales par de fortes concentrations en nitrate. Par exemple, des mutants de biosynthèse de l'ABA (*aba1-1*, *aba2-3*, *aba2-4* et *aba3-2*) et des mutants insensibles à l'ABA (*abi4-1*, *abi4-2* et *abi5-1*) sont moins sensibles à l'effet inhibiteur du nitrate (Signora *et al.*, 2001). De plus, l'application exogène d'ABA mime l'effet du nitrate en inhibant l'activité méristématique des racines latérales, ce qui a conduit au concept de « dormance des racines latérales ». Bien que le terme de dormance soit utilisé pour décrire cette inhibition, les mécanismes impliqués dans la dormance des graines et des racines latérales sont différents (Signora *et al.*, 2001). Les mutants *labi* (*lateral root ABA-insensitive*), capables de développer des racines latérales en présence de concentrations inhibitrices d'ABA, sont aussi insensibles à l'effet inhibiteur du nitrate (Zhang *et al.*, 2007). L'identification des gènes *LABI* pourra sans doute permettre de mieux comprendre l'interaction entre ABA et nitrate dans ces mécanismes.

#### Interaction avec l'auxine

L'auxine, synthétisée principalement dans les parties aériennes, est redistribuée par le phloème jusqu'à la pointe racinaire où elle joue un rôle important dans le contrôle de la croissance racinaire (Casimiro *et al.*, 2001). Une baisse du transport de cette hormone, en réponse à une accumulation de nitrate dans les feuilles, a été proposée comme faisant partie du signal systémique du nitrate conduisant à l'inhibition de la croissance racinaire (Forde, 2002). En accord



avec cette hypothèse, il a été démontré que le nitrate, apporté aux plantes à fortes concentrations, inhibait le flux d'auxine des feuilles vers les racines (Walch-Liu *et al.*, 2006). En plus de son rôle dans l'inhibition systémique de la croissance des racines latérales, l'auxine paraît également impliquée dans l'effet local du nitrate. En effet, le gène *AXR4* semble être engagé dans cet effet puisque le mutant *axr4*, résistant à l'auxine, n'est pas capable d'allonger ses racines latérales en réponse à l'application locale de nitrate (Zhang *et al.*, 1999). Il a été proposé qu'ANR1 pourrait agir en amont d'AXR4 pour aboutir, en réponse au nitrate, à la prolifération cellulaire du méristème des racines latérales *via* l'activation d'une cascade de MAP kinases (*Mitogen-Activated Protein kinases*) (Zhang *et al.*, 1999; Forde, 2002).

Des nouveaux liens entre la signalisation par l'auxine et la réponse au statut azoté ont été découverts grâce aux profils transcriptomiques de cinq types cellulaires de racines d'*Arabidopsis* en réponse à l'azote. Cette étude a montré qu'un circuit transcriptionnel entre le mir385 et un facteur de réponse à l'auxine (ARF8) contrôle la plasticité des cellules du pérycycle qui donne lieu à l'émergence des *primordia* de racines latérales en réponse à l'azote (Gifford *et al.*, 2008). En outre, le séquençage de petits ARNs induits par le nitrate a identifié miR393 et une de ses cibles, le récepteur à l'auxine AFB3, en tant qu'acteurs moléculaires dans la régulation de la croissance des racines primaires et latérales par le nitrate (Vidal *et al.*, 2010).

Plus récemment, un lien entre le transcepteur du nitrate NRT1.1 et l'action de l'auxine a été démontré. En effet, NRT1.1 transporte l'auxine si la concentration en nitrate est faible et l'augmentation de l'auxine conduit à la stimulation de la croissance des racines latérales (Krouk *et al.*, 2010a).

## Perspectives

Malgré une connaissance approfondie de l'adaptation physiologique et morphologique des plantes à la carence en azote, beaucoup reste à faire pour identifier les réseaux de signalisation impliqués dans ces mécanismes ainsi que le *cross-talk* avec les autres voies métaboliques et les autres voies de signalisation.

De concert avec les approches de biologie moléculaire et de biologie des systèmes, l'exploitation de la variabilité naturelle pourrait y contribuer de façon importante. Loudet *et al.* (2003) par exemple ont décrit 5 QTL (*Quantitative Trait Locus*) clefs pour des caractères en lien avec le statut azoté de la plante. L'identification des gènes soutenant ces QTL apportera des nouveaux éléments quant à la régulation de la réponse des plantes à la disponibilité en azote. De plus,

Ikram *et al.* (2012) ont récemment étudié des accessions d'*Arabidopsis* montrant des réponses contrastées à la carence en azote, ce qui ouvre un important potentiel pour l'exploitation de la variabilité naturelle.

*Remerciements.* Nous remercions Richard Berthomé ainsi que les membres de l'équipe AReNA pour des discussions enrichissantes.

## Références

- Agrell D., Larsson C., Larsson M., Mackown C., Rufty T., Initial kinetics of N-15-Nitrate labeling of root and shoot N fractions of barley cultured at different relative addition rates of nitrate-N. *Plant Physiol Biochem*, 1997, 35, 923–932.
- Albrecht V., Ritz O., Linder S., Harter K., Kudla J., The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>-regulated kinases. *EMBO J*, 2001, 20, 1051–1063.
- Bernard S.M., Habash D.Z., The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytol*, 2009, 182, 608–620.
- Bloom A.J., Nitrogen as a limiting factor: Crop acquisition of ammonium and nitrate, in Ecology in Agriculture. In L.E. Jackson (Ed.), *Agricultural Ecology*, 1997, Academic Press, San Diego, pp. 145–172.
- Bothe H., Metabolism in inorganic nitrogen compounds. *Progr Botany*, 1987, 52, 122–137.
- Brenner W.G., Romanov G.A., Köllmer I., Bürkle L., Schmölling, T., Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *Plant J*, 2005, 44, 314–333.
- Camargo A., Llamas A., Schnell R.A., Higuera J.J., González-Ballester, D., Lefebvre P.A., Fernandez E., Galvan A., Nitrate signaling by the regulatory gene NIT2 in *Chlamydomonas*. *Plant Cell*, 2007, 19, 3491–3503.
- Casimiro I., Marchant A., Bhalerao R.P., Beekman T., Dhooge S., Swarup R., Graham N., Inzé D., Sandberg G., Casero P.J., Bennett M., Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell*, 2001, 13, 843–852.
- Castaings L., Camargo A., Pocholle D., Gaudon V., Texier Y., Boutet-Mercey S., Tacconat L., Renou J.P., Daniel-Vedele F., Fernandez E., Meyer C., Krapp A., The nodule inception-like protein 7 modulates nitrate sensing and metabolism in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2009, 57, 426–435.
- Cerezo M., Tillard P., Filleur S., Muñoz S., Daniel-Vedele, F., Gojon A., Major alterations of the regulation of root NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake are associated with the mutation of Nrt2.1 and Nrt2.2 genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2001, 127, 262–271.

- Chia D.W., Yoder T.J., Reiter W.D., Gibson S.I., Fumaric acid: an overlooked form of fixed carbon in *Arabidopsis* and other plant species. *Planta*, 2000, 211, 743–751.
- Chopin F., Wirth J., Dorbe M., Lejay L., Krapp A., Gojon A., Daniel-Vedele F., The *Arabidopsis* nitrate transporter AtNRT2.1 is targeted to the root plasma membrane. *Plant Physiol Biochem*, 2007, 45, 630–635.
- Clarkson D.T., Regulation of the absorption and release of nitrate by plant cells: a review of current ideas and methodology. In H. Lambers, J. Neeteson, I. Stulens (Eds.), *Fundamental, Ecological and Agricultural Aspects of Nitrogen Metabolism in Higher Plants*, 1986, F. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrech, pp. 2–27.
- Cookson S.J., Williams L.E., Miller A.J., Light-dark changes in cytosolic nitrate pools depend on nitrate reductase activity in *Arabidopsis* leaf cells. *Plant Physiol*, 2005, 138, 1097–1105.
- Coruzzi G.M., Bush D., Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants. *Plant Physiol*, 2001, 125, 61–46.
- Coruzzi G.M., Zhou L., Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging « matrix effects ». *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4, 247–253.
- Crawford N.M., Forde B.G., Molecular and developmental Biology of Inorganic Nitrogen. In C.R. Somerville, E.M Meyerowitz (Eds.), *The Arabidopsis Book*, 2002, Rockville M.D. American Society of Plant Biologists, pp. 1–25.
- De Angeli A., Monachello D., Ephritikhine G., Frachisse J.M., Thomine S., Gambale F., Barbier-Brygoo H., The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature*, 2006, 442, 939–942.
- Diaz C., Saliba-Colombani V., Loudet O., Belluomo P., Moreau L., Daniel-Vedele F., Morot-Gaudry J.F., Masclaux-Daubresse C., Leaf yellowing and anthocyanin accumulation are two genetically independent strategies in response to nitrogen limitation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47, 74–83.
- Dubois F., Tercé-Laforgue T., Gonzalez-Moro M.B., Estavillo M.B., Sangwan R., Gallais A., Hirel B., Glutamate dehydrogenase in plants; is there a new story for an old enzyme? *Plant Physiol Biochem*, 2003, 41, 565–576.
- Drew M.C., Comparison of the effects of a localised supply of phosphate, nitrate, ammonium and potassium on the growth of the seminal root system, and the shoot, in barley. *New Phytol*, 1975, 75, 479–490.
- Filleur S., Dorbe M.F., Cerezo M., Orsel M., Granier F., Gojon A., Daniel-Vedele F., An *Arabidopsis* T-DNA mutant affected in Nrt2 genes is impaired in nitrate uptake. *FEBS Letters*, 2001, 489, 220–224.
- Fontaine J.X., Saladino F., Agrimonti C., Bedu M., Tercé-Laforgue T., Tétu T., Hirel B., Restivo F.M., Dubois F., Control of the synthesis and subcellular targeting of the two GDH genes products in leaves and stems of *Nicotiana plumbaginifolia* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47, 410–418.
- Forde B.G., The role of long-distance signalling in plant responses to nitrate and other nutrients. *J Exp Bot*, 2002, 53, 39–43.
- Foyer C.H., Parry M., Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. *J Exp Bot*, 2003, 54, 585–593.
- Geelen D., Lurin C., Bouchez D., Frachisse J.M., Lelièvre F., Courtial B., Barbier-Brygoo H., Disruption of putative anion channel gene AtCLC-a in *Arabidopsis* suggests a role in the regulation of nitrate content. *Plant J*, 2000, 21, 259–267.
- Gifford M.L., Dean A., Gutierrez R.A., Coruzzi G.M., Birnbaum K.D., Cell-specific nitrogen responses mediate developmental plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105, 803–808.
- Glass A.D.M., Shaff J.E., Kochian, L.V., Studies of the Uptake of Nitrate in Barley: IV. Electrophysiology. *Plant Physiol*, 1992, 99, 456–463.
- Glynn C., Herms D.A., Orians C.M., Hansen R.C., Larsson S., Testing the growth-differentiation balance hypothesis: dynamic responses of willows to nutrient availability. *New Phytol*, 2007, 176, 623–634.
- Herdel K., Schmidt P., Feil R., Mohr A., Schurr U., Dynamics of concentrations and nutrient fluxes in the xylem of *Ricinus communis*-diurnal course, impact of nutrient availability and nutrient uptake. *Plant Cell Environ*, 2001, 24, 41–52.
- Herrmann K.M., Weaver L.M., The shikimate pathway. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, 50, 473–503.
- Ho C.H., Lin S.H., Hu H.C., Tsay Y.F., CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell*, 2009, 138, 1184–1194.
- Hoai N.T.T., Shim I.S., Kobayashi K., Usui K., Accumulation of some nitrogen compounds in response to salt stress and their relationships with salt tolerance in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Plant Growth Regul*, 2003, 41, 159–164.
- Hsieh M.H., Lam H.M., van de Loo F.J., Coruzzi G., A PII-like protein in *Arabidopsis*: Putative role in nitrogen sensing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95, 13965–13970.
- Hu H.C., Wang Y.Y., Tsay Y.F., AtCIPK8, a CBL-interacting protein kinase, regulates the low-affinity phase of the primary nitrate response. *Plant J*, 2009, 57, 264–278.
- Huang N.C., Liu K.H., Lo H.J., Tsay, Y.F., Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *Plant Cell*, 1999, 11, 1381–1392.
- Huppe H.C., Farr T.J., Turpin D.H., Coordination of chloroplastic metabolism in N-limited *Chlamydomonas reinhardtii* by redox modulation. 2. Redox modulation activates the oxidative pentose phosphate pathway during photosynthetic nitrate assimilation. *Plant Physiol*, 1994, 105, 1043–1048.
- IPCC, Intergovernmental Panel on Climate Change Report 2007. [http://www.ipcc.ch/publications\\_and\\_data/publications\\_and\\_data\\_reports.shtml](http://www.ipcc.ch/publications_and_data/publications_and_data_reports.shtml)

- Ikram S., Bedu M., Daniel-Vedele F., Chaillou S., Chardon F., Natural variation of *Arabidopsis* response to nitrogen availability. *J Exp Bot*, 2012, 63, 91–105.
- Johnson P.T., Chase J.M., Dosch K.L., Hartson R.B., Gross J.A., Larson D.J., Sutherland D.R., Carpenter S.R., Aquatic eutrophication promotes pathogenic infection in amphibians. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104, 15781–15786.
- Kant S., Peng M., Rothstein S.J., Genetic Regulation by NLA and MicroRNA827 for Maintaining Nitrate-Dependent Phosphate Homeostasis in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*, 2011, 7, e1002021.
- Kiba T., Feria-Bourellier A.B., Lafouge F., Lezhneva L., Boutet-Mercey S., Orsel M., Bréhaut V., Miller A., Daniel-Vedele F., Sakakibara H., Krapp A., The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT2.4 plays a double role in roots and shoots of nitrogen-starved plants. *Plant Cell*, 2012, 24, 245–258.
- Kleinhofs A., Warner R.L., Advances in nitrate assimilation. In B. Mifflin, P. Lea (Eds.), *The biochemistry of plants*, 1990, Academic press, 16, pp. 89–120.
- Köhler B., Wegner L.H., Osipov V., Raschke K., Loading of nitrate into the xylem: apoplastic nitrate controls the voltage dependence of X-QUAC, the main anion conductance in xylem-parenchyma cells of barley roots. *Plant J*, 2002, 30, 133–142.
- Koprivova A., Suter M., den Camp R.O., Brunold C., Kopriva S., Regulation of sulfate assimilation by nitrogen in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2000, 122, 737–746.
- Krapp A., Truong H.N., Regulation of C/N interaction in model plant species. *J Crop Improv*, 2006, 15, 127–173.
- Krapp A., Berthomé R., Orsel M., Mercey-Boutet S., Yu A., Castaings L., Elftieh S., Major H., Renou J.-P., Daniel-Vedele F., *Arabidopsis* roots and shoots show distinct temporal adaptation patterns toward nitrogen starvation. *Plant Physiol*, 157, 2011, 1255–1282.
- Krouk G., Lacombe B., Bielach A., Perrine-Walker F., Malinska K., Mounier E., Hoyerova K., Tillard P., Leon S., Ljung K., Zazimalova E., Benkova E., Nacry P., Gojon A., Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Develop Cell*, 2010a, 18, 927–937.
- Krouk G., Mirowski P., LeCun Y., Shasha D.E., Coruzzi G.M., Predictive network modeling of the high-resolution dynamic plant transcriptome in response to nitrate. *Genome Biol*, 2010b, 11, R123.
- Lawlor D.W., Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: Mechanisms are the key to understanding production systems. *J Exp Bot*, 2002, 53, 773–787.
- Lawlor D.W., Konturri M., Young A.T., Photosynthesis by flag leaves of wheat in relation to protein, ribulose biphosphate carboxylase activity and nitrogen supply. *J Exp Bot*, 1989, 40, 43–52.
- Lea U.S., Slimestad R., Smedvig P., Lillo C., Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. *Planta*, 2007, 225, 1245–1253.
- Little D.Y., Rao H., Oliva S., Daniel-Vedele F., Krapp A., Malamy J.E., The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102, 13693–13698.
- Liu K.H., Huang C.Y., Tsay Y.F., CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of *Arabidopsis* involved in multiple phases of nitrate. *Plant Cell*, 1999, 11, 865–874.
- Liu K.H., Tsay Y.F., Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *EMBO J*, 2003, 22, 1005–1013.
- Loomis W.E., Growth-differentiation balance vs. carbohydrate-nitrogen ratio. *Am Soc Hortic Sci Proc*, 1932, 29, 240–245.
- Loudet O., Chaillou S., Merigout P., Talbotec J., Daniel-Vedele F., Quantitative trait loci analysis of nitrogen use efficiency in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2003, 131, 345–358.
- Loulakakis K.A., Primikiri N.I., Nikolantonakis M.A., Roubelakis-Angelakis K.A., Immunocharacterization of *Vitis vinifera* L. Ferredoxin-dependent glutamate synthase and its spatial and temporal changes during leaf development. *Planta*, 2002, 215, 630–638.
- Lutts S., Majerus V., Kinet J.M., NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiol Plant*, 1999, 105, 450–458.
- Martin T., Oswald O., Graham I.A., *Arabidopsis* seedling growth, storage lipid mobilization, and photosynthetic gene expression are regulated by carbon:nitrogen availability. *Plant Physiol*, 2002, 128, 472–481.
- Masclaux C., Valadier M.H., Brugière N., Morot-Gaudry J.F., Hirel B., Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta*, 2000, 211, 510–518.
- Masclaux-Daubresse C., Reisdorf-Cren M., Pageau K., Lelandais M., Grandjean O., Kronenberger J., Valadier M.-H., Feraud M., Jouglet T., Suzuki A., Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. *Plant Physiol*, 2006, 140, 444–456.
- Mifflin B.J., Habash D.Z., The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *J Exp Bot*, 2002, 53, 979–987.
- Matros A., Amme S., Kettig B., Buck-Sorlin G.H., Sonnwald U., Mock H.P., Growth at elevated CO<sub>2</sub> concentrations leads to modified profiles of secondary metabolites in tobacco cv. SamsunNN and to increased resistance against infection with potato virus Y. *Plant Cell Environ*, 2006, 29, 126–137.
- Muñoz S., Cazettes C., Fizames C., Gaymard F., Tillard P., Lepetit M., Gojon A., Transcript profiling in the chl1–5 mutant of *Arabidopsis* reveals a role of the nitrate transporter NRT1.1 in the regulation of another nitrate transporter, NRT2.1. *Plant Cell*, 2004, 16, 2433–2447.
- Nishizawa A., Yabuta Y., Shigeoka S., Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol*, 2008, 147, 1251–1263.

- Okamoto M., Vidmar J.J., Glass A.D.M., Regulation of NRT1 gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44, 304–317.
- Okamoto M., Kumar A., Li W., Wang Y., Siddiqi M.Y., Crawford N.M., Glass A.D., High-affinity nitrate transport in roots of *Arabidopsis* depends on expression of the NAR2-like gene AtNRT3.1. *Plant Physiol*, 2006, 140, 1036–1046.
- Orsel M., Filleur S., Fraiser V., Daniel-Vedele F., Nitrate transport in plants: which gene and which control? *J Exp Bot*, 2002, 53, 825–33.
- Orsel M., Eulenbug K., Krapp A., Daniel-Vedele F., Disruption of the nitrate transporter genes AtNRT2.1 and AtNRT2.2 restricts growth at low external nitrate concentration. *Planta*, 2004, 219, 714–721.
- Orsel M., Chopin F., Leleu O., Smith S., Krapp A., Daniel-Vedele F., Miller A., Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis*. Physiology and protein-protein interaction. *Plant Physiol*, 2006, 142, 1304–1317.
- Peng M., Hannam C., Gu H., Bi Y., Rothstein, S.J., A mutation in NLA, which encodes a RING-type ubiquitin ligase, disrupts the adaptability of *Arabidopsis* to nitrogen limitation. *Plant J*, 2007, 50, 320–337.
- Peoples M.B., Freney J.R., Mosier, A.R., Minimizing gaseous losses of nitrogen. In P.E. Bacon (Ed.), *Nitrogen fertilization and the environment*, 1995, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 565–602.
- Pracharoenwattana I., Zhou W., Keech O., Francisco P.B., Udomchalothorn T., Tschoep H., Stitt M., Gibon Y., Smith S.M., *Arabidopsis* has a cytosolic fumarase required for the massive allocation of photosynthate into fumaric acid and for rapid plant growth on high nitrogen. *Plant J*, 2010, 62, 785–795.
- Remans T., Nacry P., Pervent M., Filleur S., Diatloff E., Mounier E., Gojon A., The *Arabidopsis* NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103, 19206–19211.
- Rouached H., Secco D., Arpat B., Poirier Y., 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*, 2011, 11, 19.
- Rouzé P., Caboche M., Nitrate reductase in higher plants: molecular approaches to function and regulations. In J. Wray (Ed.), *Inducible Plant Proteins*, 1992, Cambridge University Press, pp. 45–77.
- Rubin G., Tohge T., Matsuda F., Saito K., Scheible W.-R., Members of the LBD family of transcription factors repress anthocyanin synthesis and affect additional nitrogen responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2009, 21, 3567–3584.
- Sakakibara H., Takei K., Hirose N., Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development. *Trends Plant Sci*, 2006, 11, 440–448.
- Schauser L., Roussis A., Stiller J., Stougaard J., A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature*, 1999, 401, 191–195.
- Scheible W., Lauerer M., Schulze E., Caboche M., Stitt M., Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *Plant J*, 1997, 11, 671–691.
- Scheible W., Morcuende R., Czechowski T., Fritz C., Osuna D., Palacios-Rojas N., Stitt M., Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiol*, 2004, 136, 2483–2499.
- Segonzac C., Boyer J., Ipotesi E., Szponarski W., Tillard P., Touraine B., Sommerer N., Rossignol M., Gibrat R., Nitrate efflux at the root plasma membrane: identification of an *Arabidopsis* excretion transporter. *Plant Cell*, 2007, 19, 3760–3777.
- Shin R., Berg R.H., Schachtman D.P., Reactive oxygen species and root hairs in *Arabidopsis* root response to nitrogen, phosphorus and potassium deficiency. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46, 1350–1357.
- Signora L., De Smet I., Foyer C.H., Zhang H., ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2001, 28, 655–662.
- Skopelitis D.S., Paranychianakis N.V., Paschalidis K.A., Pliakonis E.D., Delis I.D., Yakoumakis D.I., Kouvarakis A., Papadakis A.K., Stephanou E.G., Roubelakis-Angelakis K.A., Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. *Plant Cell*, 2006, 18, 2767–2781.
- Sugiura M., Georgescu M.N., Takahashi M., A nitrite transporter associated with nitrite uptake by higher plant chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48, 1022–1035.
- Sulpice R., Pyl E.-T., Ishihara H., Trenkamp S., Steinfath M., Witucka-Wall H., Gibon Y., Usadel B., Poree F., Piques M.C., Von Korff M., Steinhauser M.C., Keurentjes J.J., Guenther M., Hoehne M., Selbig J., Fernie A.R., Altmann T., Stitt M., Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106, 10348–10353.
- Taji T., Ohsumi C., Iuchi S., Seki M., Kasuga M., Kobayashi M., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2002, 29, 417–426.
- Takei K., Sakakibara H., Taniguchi M., Sugiyama T., Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42, 85–93.
- Takei K., Takahashi T., Sugiyama T., Yamaya T., Sakakibara H., Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal transduction pathway mediated by cytokinin. *J Exp Bot*, 2002, 53, 971–977.
- Takei K., Ueda N., Aoki K., Kuromori T., Hirayama T., Shinozaki K., Yamaya T., Sakakibara H., AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45, 1053–1062.



- Taniguchi M., Kiba T., Sakakibara H., Ueguchi C., Mizuno T., Sugiyama T., Expression of *Arabidopsis* response regulator homologs is induced by cytokinins and nitrate. *FEBS Lett*, 1998, 429, 259–262.
- Tercé-Laforgue T., Dubois F., Ferrario-Méry S., Pou de Crezenzo M.-A., Sangwan R., Hirel B., Glutamate dehydrogenase of tobacco is mainly induced in the cytosol of phloem companion cells when ammonia is provided either externally or released during photorespiration. *Plant Physiol*, 2004, 136, 4308–4317.
- Tilman D., Reich P.B., Knops J., Wedin D., Mielke T., Lehman C., Diversity and productivity in a long-term grassland experiment. *Science*, 2001, 294, 843–845.
- Tsay Y.F., Schroeder J.I., Feldmann K.A., Crawford, N.M., The herbicide sensitivity gene CHL1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell*, 1993, 72, 705–713.
- Tschoep H., Gibon Y., Carillo P., Armengaud P., Szecowka M., Nunes-Nesi A., Fernie A.R., Koehl K., Stitt M., Adjustment of growth and central metabolism to a mild but sustained nitrogen-limitation in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ*, 2009, 32, 300–318.
- Turpin D.H., Weger H.G., Huppe H.C., Interactions between photosynthesis, respiration and nitrogen assimilation. In D.T. Dennis, D.H. Turpin, D.B. Layzell (Eds.), *Plant Metabolism*, 1997, Longman, Singapore.
- Van der Leij M., Smith S., Miller A., Simultaneous influx of ammonium and potassium into maize roots: kinetics and interactions. *Planta*, 1998, 205, 64–72.
- Vidal E.A., Araus V., Lu C., Parry G., Green P.J., Coruzzi G.M., Gutiérrez R.A., Nitrate-responsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107, 4477–4482.
- Von der Fecht-Bartenbach J., Bogner M., Dynowski M., Ludewig U., CLC-b-mediated  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$  exchange across the tonoplast of *Arabidopsis* vacuoles. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51, 960–968.
- Walch-Liu P., Neumann G., Bangerth F., Engels C., Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco. *J Exp Bot*, 2000, 51, 227–237.
- Walch-Liu P., Ivanov I.I., Filleur S., Gan Y., Remans T., Forde, B.G., Nitrogen regulation of root branching. *Ann Bot*, 2006, 97, 875–881.
- Wang R., Liu D., Crawford N.M., The *Arabidopsis* CHL1 protein plays a major role in high-affinity nitrate uptake. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95, 15134–1539.
- Wang R., Tischner R., Gutiérrez R.A., Hoffman M., Xing X., Chen M., Crawford N.M., Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2004, 136, 2512–2522.
- Wang R., Xing X., Wang Y., Tran A., Crawford N.M., A Genetic Screen for Nitrate-Regulatory mutants captures the nitrate transporter gene NRT1.1. *Plant Physiol*, 2009, 151, 472–478.
- Wang Y.Y., Hsu P.K., Tsay Y.F., Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends Plant Sci*, 2012, 17, 458–467.
- Widiez T., El Kafafi el S., Girin T., Berr A., Ruffel S., Krouk G., Vayssières A., Shen W.H., Coruzzi G.M., Gojon A., Lepetit M., High nitrogen insensitive 9 (HNI9)-mediated systemic repression of root  $\text{NO}_3^-$  uptake is associated with changes in histone methylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108, 13329–13334.
- Yanagisawa S., Akiyama A., Kisaka H., Uchimiya H., Miwa T., Metabolic engineering with Dof1 transcription factor in plants: Improved nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101, 7833–7838.
- Yong Z., Kotur Z., Glass A.D., Characterization of an intact two-component high-affinity nitrate transporter from *Arabidopsis* roots. *Plant J*, 2010, 63, 739–748.
- Zhang H., Forde B.G., An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science*, 1998, 279, 407–409.
- Zhang H., Jennings A., Barlow P.W., Forde, B.G., Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96, 6529–6534.
- Zhang H., Rong H., Pilbeam D., Signalling mechanisms underlying the morphological responses of the root system to nitrogen in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, 2007, 58, 2329–2338.
- Zuther E., Büchel K., Hundertmark M., Stitt M., Hinch D.K., Heyer A.G., The role of raffinose in the cold acclimation response of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*, 2004, 576, 169–173.