



HAL
open science

L'étude du développement et de la réponse des plantes à des stress environnementaux, à l'aide d'approches de protéomique membranaire

Veronique Santoni

► **To cite this version:**

Veronique Santoni. L'étude du développement et de la réponse des plantes à des stress environnementaux, à l'aide d'approches de protéomique membranaire. *Vegetal Biology*. 2006. tel-02812452

HAL Id: tel-02812452

<https://hal.inrae.fr/tel-02812452>

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

Curriculum vitae

Véronique KERVELLA épouse SANTONI

née le : 18/04/63

nationalité: Française

statut actuel: CR1 INRA

Adresse professionnelle

Laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes tel : 04 99 61 20 20

INRA/ENSA-M/CNRS UMR 5004

Fax: 04 67 52 57 37

Place Viala 34060 Montpellier cedex 1

email : santoniv@ensam.inra.fr

Etudes

1983 Université de Rennes D.E.U.G. Sciences de la nature et de la vie (mention B)

1984 Université de Paris VI Licence de Biologie Cellulaire et Physiologie (mention AB)

1986 Université de Paris VI Maîtrise de Biologie Cellulaire, option Génétique (mention AB)

1986-87 Université de Paris VI D.E.A. Biologie et Physiologie Végétale, option mécanismes du développement et productivité. Travail de recherche effectué aux laboratoires de Physiologie cellulaire végétale à Paris VI et Physiologie cellulaire végétale au C.N.R.S (Gif / Yvette) (mention TB)

1987-91 INRA de Dijon Thèse de Doctorat de l'Université de Paris VI "Evolution de la sensibilité à l'auxine de la H⁺-ATPase plasmique pendant le développement du tabac" (mention Très Honorable)
Directeur de Recherche : M. Rossignol. Directeur de Thèse : J.-C. Kader.
Laboratoire d'accueil : laboratoire de Physiopathologie Végétale, I.N.R.A., Dijon

Stages

1987 Laboratoire de C. Larsson, Department of Biochemistry, University of Lund, Suède

1992-93 Post-doctorat au Laboratoire de Biologie Cellulaire, INRA Versailles (1 an)

Carrière administrative

1987- 1991 ASC à la station de Physiopathologie Végétale de Dijon

1991-1992 ASC au laboratoire de Biochimie et Physiologie Végétale de Montpellier

1992-1996 Laboratoire de Biologie Cellulaire de Versailles

- 1992 ASC

- 1993 recrutement au concours de chargé de recherches INRA 2^{ème} classe

- 1995 titularisation en tant que chargé de recherches INRA 2^{ème} classe

1996-2006 Laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaires des Plantes de Montpellier

- 1997 avancement au grade de chargé de recherches INRA 1^{ère} classe

1. Liste de publications

Articles publiés dans des revues à comité de lecture

1. Rossignol M, Kervella V et Blein J-P (1989) Octylglucoside reconstitution of plasma membrane H⁺-translocating ATPase from corn roots **Plant Physiol. Biochem.** **27**: 437-441.
2. Santoni V, Vansuyt G et Rossignol M (1990) Differential auxin sensitivity of proton translocation by plasma membrane H⁺-ATPase from tobacco leaves **Plant Sci.** **68**: 33-38.
3. Santoni V, Vansuyt G et Rossignol M (1991) The changing sensitivity to auxin of the plasma membrane H⁺-ATPase: relationship between plant development and ATPase content of membranes **Planta** **185**: 227-232
4. Santoni V, Vansuyt G et Rossignol M (1993) Indoleacetic acid pretreatment of tobacco plants *in vivo* increases the *in vitro* sensitivity to auxin of the plasma membrane H⁺-ATPase from leaves and modifies the polypeptide composition of the membrane **FEBS Lett.** **326**: 17-20
5. Santoni V, Bellini C et Caboche M (1994) Use of two-dimensional protein pattern analysis for the characterization of *Arabidopsis thaliana* mutants **Planta** **192**: 557-566
6. Feiler H, Desprez T, Santoni V, Kronenberger J, Caboche M et Traas J (1995) The higher plant *Arabidopsis thaliana* encodes a functional CDC48 homologue which is highly expressed in dividing and expanding cells **EMBO J.** **14**: 5626-5637
7. Santoni V, Delarue M, Caboche M et Bellini C (1997) A comparison of two-dimensional electrophoresis data with phenotypical traits in *Arabidopsis* leads to the identification of a mutant (*cri1*) that accumulates cytokinins **Planta** **202**: 62-69
8. Delarue M, Santoni V, Caboche M et Bellini C (1997) *crystal* mutations in *Arabidopsis* confer a genetically, heritable, recessive, hyperhydric phenotype **Planta** **202**: 51-61

9. Faure JD, Vittorioso P, Santoni V, Fraisier V, Prinsen E, Barlier I, Van Onckelen H, Caboche M et Bellini C (1998) The PASTICCINO genes of *Arabidopsis thaliana* are involved in the control of cell division and differentiation **Development** **125**: 909-918
10. Chevallet M, Santoni V, Poinas A, Rouquié D, Fuchs A, Kieffer S, Rossignol M, Lunardi J, Garin J et Rabilloud T (1998) New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis **Electrophoresis** **19**: 1901-1909
11. Santoni V, Doumas P, Rouquié D, Mansion M, Boutry M, Degand H, Dupree P, Packman L, Sherrier J, Prime T, Bauw G, Posada E, Rouzé P, Dehais P, Sahoun I, Barlier I et Rossignol M (1998) Use of a proteome strategy for tagging proteins present at the plasma membrane **Plant J.** **16**: 633-641
12. Santoni V, Doumas P, Rouquié D, Mansion M, Rabilloud T et Rossignol M (1999) Large scale characterization of plant plasma membrane proteins **Biochimie** **81**: 655-661
13. Thiellement H, Bahrman N, Damerval C, Plomion C, Rossignol M, Santoni V, de Vienne D et Zivy M (1999) Proteomics and physiological studies in plants **Electrophoresis** **20**: 2013-2025
14. Santoni V, Doumas P, Rouquié D, Mansion M, Rabilloud T, Kieffer S, Garin J, et Rossignol M (1999) Towards the recovery of hydrophobic proteins on two-dimensional electrophoresis gels **Electrophoresis** **20**: 705-711
15. Santoni V, Molloy M et Rabilloud T (2000) Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? **Electrophoresis** **21**: 1054-1070
16. Santoni V, Kieffer S, Masson F, Desclaux D et Rabilloud T (2000) Membrane proteomics: use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties **Electrophoresis** **21**: 3329-3344
17. Santoni V, Gerbeau P, Javot H, Maurel C (2000) The high diversity of aquaporins reveals novel facets of plant membrane functions **Curr. Op. Plant Biol.** **3**: 476-481

18. Maurel C, Javot H, Lauvergeat V, Gerbeau P, Tournaire C, Santoni V, Heyes J (2002) Molecular physiology of aquaporins in plants. In Molecular mechanisms of water transport across biological membranes, Editeurs T Zeuthen et WD Stein **Int. Rev. Cytol.** **215**: 106-140
19. Gerbeau P, Amodeo G, Henzler, T, Santoni V, Ripoche P, Maurel C (2002) The water permeability of *Arabidopsis* plasma membrane is regulated by divalent cations and pH **Plant J.** **30** : 71-81
20. Javot H, Lauvergeat V, Santoni V, Martin F, Güclü J, Vinh J, Heyes J, Franck K I, Schäffner A R, Bouchez D et Maurel C (2003) Role for a single aquaporin isoform in root water uptake 2003 **Plant Cell** **15**: 509-522
21. Luche S, Santoni V et Rabilloud T (2003) Evaluation of non-ionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis **Proteomics** **3**: 249-253
22. Santoni V, Vinh J, Pflieger D, Sommerer N et Maurel C (2003) A proteomic study reveals novel insights into the diversity of aquaporin forms expressed in the plasma membrane of plant roots **Biochem J.** **373**: 289-296
23. Santoni V (2006) Plant plasma membrane protein extraction and solubilization for proteomic analysis, à paraitre dans “Plant Proteomics: Methods and Protocols”, Methods in Molecular Biology, Humana press, USA - sous presse
24. Rabilloud T, Luche S, Santoni V, Chevallet M (2006) Detergent and chaotropes for protein solubilization before two-dimensional electrophoresis, à paraitre dans “Plant Proteomics: Methods and Protocols”, Methods in Molecular Biology, Humana press, USA - sous presse

Manuscrits soumis pour publication

25. Santoni V, Verdoucq L, Sorieul M, Luu D-T, Viennois G, Sommerer N, Vinh J, Pflieger D, Maurel C (2006) Methylation, a new post-translational modification of plant aquaporins-
soumis

Tableau récapitulatif des facteurs d'impact des revues

<i>Journal</i>	<i>Facteur d'impact</i>	<i>Nombre de publications</i>
Biochem J.	4.3	1
Biochimie	3.8	1
Curr. Op. Plant Biol.	9.0	1
Development	7.1	1
Electrophoresis	3.7	5
EMBO J.	10.5	1
FEBS Lett.	3.8	1
Int. Rev. Cytol.	4.7	1
Planta	3.1	4
Plant Cell	11.3	1
Plant Physiol. Biochem.	1.4	1
Plant J.	6.4	2
Plant Sci.	1.4	1
Proteomics	5.5	1

Articles publiés dans des revues sans comité de lecture

1. Rakotomavo M, Bourdil I, Santoni V, Blein J-P et Rossignol M (1989) Lysophosphatidylcholine effects on plasma membrane ATPase activity, dans "Plant Membrane Transport : the current position" éditeurs Dainty J, De Michelis M I, Marrè E, Rasi-Caldogno F, publié par Elsevier Science, pp 109-110

2. Rossignol M, Bourdil I, Santoni V et Blein J-P (1989) Interaction between plasma membrane H⁺-ATPase and phytotoxins: use of reconstituted system, dans "Plant Membrane Transport: the current position", éditeurs Dainty J, De Michelis M I, Marrè E, Rasi-Caldogno F, publié par Elsevier Science, pp 379-384

3. Rossignol M, Santoni V, Szponarski W et Vansuyt G (1990) Differential sensitivity to auxin at the plasma membrane level, dans "Progress in Plant Cellular and Molecular Biology" éditeurs Nijkamp H J J, Van Der Plas L H W et Van Aartrijk J, publié par Kluwer Academic, pp 498-503

4. Rossignol M, Santoni V, François J-M and Vansuyt G (1992) Changing membrane sensitivity to auxin during plant development, dans "Progress in Plant Growth Regulation" éditeurs Karssen C M, VanLoon L C, Vreugdenhil D, publié par Kluwer Academic, pp 202-220

Conférences invitées

- Santoni V, Doumas P, Rossignol M (1998) Proteome approach on *Arabidopsis*. The *Arabidopsis* genome: a model for crop plants, Cold Spring Harbor, USA

- Santoni V, Tournaire-Roux C, Verdoucq L, Luu D-T, Sorieul M, Prak S, Sommerer N et Maurel C (2005) Mechanisms of post-translational regulation of plant aquaporins. International conference on aquaporins, Bruxelles, Belgique

Communications orales sur sélection

- Santoni V, Vansuyt G, Szponarski W et Rossignol M (1990) Régulation de l'ATPase plasmique par l'auxine et la fusicoccine. Colloque de la Société Française de Physiologie Végétale sur les ATPases membranaires, Dijon

- Santoni V, Rouquié D, Rabilloud T, Rossignol M, Doumas P (1998) Two-dimensional analysis of hydrophobic proteins from plant plasma membrane 3rd Siena 2D Electrophoresis Meeting

- Santoni V, Rossignol M, Garin J, Kieffer S, Rabilloud T (1999) Proteome approach on plasma membrane of *Arabidopsis*. Journées thématiques: protéomique. Toulouse

- Santoni V, Vinh J, Pflieger D, Boursiac Y, Maurel C (2002) Expression and regulation of aquaporins in the *Arabidopsis* plasma membrane. COMBIO, Sydney, Australie
- Santoni V, Verdoucq L, Prak S, Vinh J, Pflieger D, Boursiac Y, Maurel C (2003) The use of proteomics to study the regulation of aquaporins, a multigenic family of membrane intrinsic proteins. Proteomic Forum München 2003, Allemagne
- Santoni V, Prak S, Verdoucq L, Vinh J, Sommerer N, Boursiac Y, Maurel C (2004) Use of proteomics to study the regulation of aquaporins, a multigenic family of intrinsic membrane proteins. 10^{ème} journées de Gerland. Proteomics: new insights and prospects, Lyon, France
- Santoni V, Verdoucq L, Sorieul M, Luu D-T, Viennois G, Sommerer N, Vinh J, Pflieger D, Maurel C (2005) Proteomics reveals a role for Lys and Glu methylation in regulating the subcellular expression of aquaporins. 1^{er} Symposium de Chimie et Biologie Analytiques, “de la Molécule au Protéome”, Montpellier, France

Séminaires

- Santoni V (1999) Notion de protéomique, Campus de Baillargué, Montpellier
- Santoni V, Sormani R, Gerbeau P, Vinh J, Sommerer N, Rabilloud T, Maurel C (2002) A proteomic study reveals novel insights into plant plasma membrane aquaporins”, Université de Darmstadt, Allemagne
- Santoni V, Verdoucq L, Boursiac Y, Prak, S, Vinh J, Sommerer N, Rabilloud T, Maurel C (2003) Expression et régulation des aquaporines dans la membrane plasmique d'*Arabidopsis*, Ecole doctorale de Lyon
- Santoni V, Tournaire-Roux C, Verdoucq L, Luu D-T, Sorieul M, Prak S, Sommerer N et Maurel C (2005) Régulations post-traductionnelles des aquaporines de plantes, CNRS Toulouse

2. Animation de la recherche

2.1. Encadrement

Stagiaires L et M

- R. Tamani (1997), stagiaire de niveau L3 - Caractérisation d'une fraction membranaire d'*Arabidopsis thaliana* enrichie en plasmalemme.
- M. Tosto (1998), stagiaire de niveau M1 - Efficacité de différents détergents à solubiliser les protéines membranaires de la membrane plasmique d'*Arabidopsis*.
- S. Chevally (1999), stagiaire COTOREP de 3 mois – Participation à la caractérisation de protéines hydrophobes de la membrane plasmique d'*Arabidopsis*.

DEA

- E. Gendreau (1993) – Etude du rôle du cytosquelette dans l'élongation de l'hypocotyle chez *Arabidopsis thaliana*, DEA de biologie Moléculaire et Cellulaire Végétale, Université Paris XI. J'ai participé à la formation d'E. Gendreau sur les techniques d'extraction de protéines et de gels bidimensionnels.
- R. Sormani (2001) - Recherche d'un rôle de l'aquaporine PIP2a dans la régulation de la perméabilité hydrique de la membrane plasmique de cellules d'*Arabidopsis thaliana* en suspension, DEA Développement et Adaptation des Plantes, Université Montpellier II. R. Sormani est en thèse chez C. Robaglia (Laboratoire de Génétique et Biophysique des Plantes, UMR 6191 CNRS-CEA-Université de la Méditerranée, Luminy, Marseille).
- S. Prak (2003) - Recherche du rôle des modifications post-traductionnelles portées par les aquaporines de la membrane plasmique racinaire d'*Arabidopsis thaliana* dans la réponse à un traitement salin, DEA Développement et Adaptation des Plantes, Université Montpellier II. S. Prak est actuellement en thèse au laboratoire.

Thèse

- M. Delarue (1996) Approche génétique et physiologique du développement: caractérisation des mutants cristal et super-root d'*Arabidopsis thaliana*, Université Paris VI. J'ai participé à l'encadrement de M. Delarue, co-auteur des publications 7 et 8, pour la caractérisation biochimique des mutants *sur1* et *cristal*. M. Delarue est Maître de conférence à Paris.
- D. Rouquié (1998) Analyse protéomique de la membrane plasmique chez *Nicotiana tabacum* et *Arabidopsis thaliana*, Université Montpellier II. J'ai participé à l'encadrement de D. Rouquié, co-auteur des publications 10, 11, 12 et 14. D. Rouquié a intégré Biogemma puis se trouve actuellement en poste à Bayer CropScience (Antibes).
- M. Sorieul (2004-2007) Régulation de la localisation et de la dynamique subcellulaire des aquaporines, Université Montpellier II. M. Sorieul est principalement encadré par D.T Luu et C. Maurel et je participe à son encadrement dans le cadre de l'analyse de mutants de méthylation.
- S. Prak (2003-2006) Analyse des modifications post-traductionnelles portées par les aquaporines PIP chez *Arabidopsis thaliana*, Université Montpellier II.

Post-doctorat

- F. Masson (1999). Caractérisation de protéomes membranaires d'*Arabidopsis*. Co-auteur de la publication 16.
- T. Henzler (2001-2003). Caractérisation fonctionnelle d'aquaporines PIP surexprimées en suspension cellulaire végétale, co-auteur de la publication 19. T. Henzler a été recruté par la société Biologic (Grenoble).
- L. Verdoucq (2003-2004) Mécanismes de régulation des aquaporines de plantes- Etude de la signification fonctionnelle de la méthylation des aquaporines chez *Arabidopsis thaliana*, co-auteur de l'article 25 soumis pour publication. L. Verdoucq est maintenant recruté CR1-CNRS au laboratoire.
- T. Sahr (2005-2007): Caractérisation de méthyltransférases d'aquaporines PIP chez *Arabidopsis thaliana*.

2.2. Collaborations scientifiques

- Pr J. Dénarié (CNRS-INRA, Castanet-Tolosan, France) (1994) Influence de facteurs de nodulation, en tant que signal spécifique de différenciation sur le profil en électrophorèse 2D de protéines totales de jeunes plantules d'*Arabidopsis*. Cette étude a révélé l'induction de 3 polypeptides majeurs et a été poursuivie par l'équipe de J. Dénarié.
- Dr F. Corke (laboratoire de K Roberts, John Innes Centre, Norwich, Grande Bretagne) (1995) Isolement de paroi d'*Arabidopsis*.
- Dr D. Falconnet (Université Joseph Fourier, Grenoble, France) (1995) Etude des intégrines d'*Arabidopsis*.
- Dr M. Zivy (INRA, plate forme protéomique du Moulon, Gif sur Yvette, France) Analyse statistique des profils de gels d'électrophorèse bidimensionnelle. Co-auteur de la publication 13.
- Dr T. Rabilloud (CEA Grenoble, France) (1998-2002) Collaboration sur l'optimisation de méthodes d'extraction et solubilisation de protéines membrabaires. Co-auteur des publications 10, 12, 14, 15, 16, 21 et 24.
- Dr D. Desclaux (INRA de Maugio, France) (1999-2000). Analyse statistique des protéomes hydrophobes de la membrane plasmiques. Co-auteur de la publication 16.
- Dr J. Vinh (CNRS, Paris, France) (2001-2004) Caractérisation post-traductionnelle des aquaporines par spectrométrie de masse. Co-auteur des publications 20, 22 et 25.
- Dr N. Sommerer (INRA, UR protéomique, Montpellier, France) (2001-2005) Analyse des aquaporines par spectrométrie de masse. Co-auteur des publications 22 et 25.
- Dr G. Amodeo (programme ECOS-Sud, CONICET, Université de Buenos-Aires, Argentine). Caractérisation post-traductionnelle des aquaporines du tonoplaste d'*Arabidopsis*.

2.3. Contrats sur appel d'offres

- Plant Plasma Membrane Database, projet financé par la commission européenne (DGXII) pendant 3 ans (1999-2001)
- Protéome subcellulaire végétal, projet financé par le CNRS - programme Physique et Chimie du Vivant, pendant 1 an (1999-2000)

- Programme AF2001093 GABI-Génoplande - Functional genomics of membrane transporters, financé sur 2 ans (2002-2003)

2.4. Participation à des comités et jurys de thèse

- Comité de thèse de J. Wirth (2003-2006), équipe A. Gojon (laboratoire BPMP) Etude de la régulation de transporteurs de nitrate par la photosynthèse et les sucres
- Examineur de la thèse de B. Valot (Université de Bourgogne, Dijon, 2005). Etude des protéines membranaires de racines de *Medicago truncatula* colonisées par le champignon mycorhizogène *Glomus intraradices*. Développement et application d'approches de protéomique subcellulaire

2.5. Activité d'expertise

- Revues scientifiques: Proteomics et Plant Physiology
- Projets : National Science Foundation et Binational Agricultural Research and Development Fund

2.6. Autres activités

- Membre du comité technique du laboratoire BPMP (2002-2004)
- Membre du conseil de service du laboratoire BPMP depuis 2002
- Membre du comité d'administration de la SFEAP (Société Française d'Electrophorèse et d'Applications Protéomiques) depuis 2002
- Membre du comité d'organisation et du comité scientifique du « 1^{er} Symposium de Chimie et Biologie Analytiques - de la molécule au protéome » septembre 2005 Montpellier

3. Premiers travaux de recherches

(1986-1992)

3.1. DEA de Physiologie Végétale (purification de membrane plasmique)

Le stage de DEA a été réalisé aux laboratoires de Physiologie Cellulaire (Université Pierre et Marie Curie) dans l'équipe de Jean-Claude Kader et de Physiologie Cellulaire Végétale (Gif sur Yvette) dirigé par le Pr. Jean Guern. Il a été précédé d'un séjour dans le laboratoire de Christer Larsson (Lund, Suède) au cours duquel j'ai acquis la technique de partage de phases pour purifier des fractions membranaires enrichies en membrane plasmique (MP). Au cours du stage de DEA, j'ai adapté cette méthode à la purification de la MP de feuilles de tabac. La caractérisation enzymatique de cette fraction membranaire a permis de montrer un fort enrichissement en MP. Des analyses complémentaires ont montré une différence dans la composition lipidique de la MP par rapport à celle d'autres membranes cellulaires.

3.2 Thèse: étude de la sensibilité de l'ATPase à l'auxine

3.2.1. Contexte

J'ai réalisé ma thèse à la Station de Physiopathologie Végétale de l'INRA de Dijon sous la direction de Michel Rossignol. Le projet général de la station était d'améliorer la connaissance et la maîtrise des processus de différenciation et d'organogenèse chez les plantes. Ces phénomènes étant très largement sous contrôle hormonal, notre groupe avait choisi d'étudier les mécanismes biochimiques d'action des hormones, et plus particulièrement de l'auxine qui intervient dans le contrôle de l'élongation et de la division cellulaire.

La réponse de la cellule à une hormone est déterminée à la fois par la concentration de l'hormone et la sensibilité de la cellule, facteurs qui traduisent la présence fonctionnelle des entités impliquées dans le mode d'action de l'hormone. Au cours de ma thèse, j'ai mené une approche comparative des étapes membranaires de réception et de transduction du signal auxine au cours du développement du tabac. Cette approche a été menée *in vitro*, sur des fractions de MP, et la réponse à l'auxine a été appréciée par l'effet de l'hormone sur l'activité vectorielle de l'ATPase. L'ensemble des résultats a donné lieu à quatre publications (notées 1 à 4).

3.2.2. Résultats

Mode d'action de l'auxine : l'auxine exerce plusieurs types d'effets selon sa concentration (Santoni et al. 1990):

- à faible concentration, le transport de protons est stimulé et cet effet met en jeu la chaîne de réception/transduction.
- A des concentrations intermédiaires, la stimulation disparaît. Un point remarquable est que ceci s'observe quelle que soit la sensibilité du système étudié et semble ainsi indissociable de l'effet stimulateur qui le précède à plus faible concentration.
- A des concentrations supérieures à 100 μM , l'auxine inhibe le transport de protons en perturbant la perméabilité membranaire.

Les seuls éléments bien caractérisés de la chaîne de réception/transduction du signal auxine étaient l'ABP (Auxin Binding Protein) et la H^+ -ATPase. Après purification de l'ATPase ainsi que d'une protéine (p2) sans homologie de séquence avec l'ABP mais présentant une activité de fixation d'auxine, nous avons obtenu des sérums polyclonaux contre ces protéines. Des dosages immunologiques ont montré que l'abondance de ces protéines varie au cours du développement de la plante (Santoni et al. 1991) mais qu'aucune des deux protéines ne contrôle entièrement la sensibilité à l'auxine. Par contre la variation du rapport de l'abondance de ces protéines rappelle celle de la sensibilité suggérant que ces deux éléments sont liés de façon fonctionnelle dans la variation de sensibilité de l'ATPase à l'auxine au cours du développement.

La disposition de différentiels de sensibilité autorise une approche biochimique comparative tant descriptive que fonctionnelle. Par cartographie en gel d'électrophorèse bidimensionnelle (EBD) de protéines de MP extraite de tabacs aux principaux stades physiologiques (végétatif, induit à la floraison, floral), nous avons identifié des polypeptides spécifiques de stades de développement de la plante. Ces résultats montrent que des caractéristiques biochimiques distinguent des systèmes de sensibilité différente.

Biologie du développement : nous avons démontré qu'il existe des gradients temporels de la sensibilité à l'auxine (Santoni et al. 1990; Rossignol et al. 1992). En effet, l'auxine exerce les différents types d'effets (stimulateur/inhibiteur) quel que soit l'âge de la plante mais la stimulation du transport de protons requiert des concentrations d'auxine différentes selon le stade de développement de la plante. Ainsi, la sensibilité à l'auxine de l'ATPase est

1000 fois plus élevée à la fin de la période d'induction florale qu'aux stades végétatif ou floral. Des résultats obtenus par la suite au laboratoire ont montré qu'il existe aussi des gradients de sensibilité le long de la plante (F. Masson, non publié). A côté de l'analyse de ces gradients de sensibilité spatio-temporels, un bilan hormonal et notamment des dosages en auxine (réalisés en collaboration avec le Pr. E. Miginiac, Paris) ont montré une augmentation transitoire de la concentration en auxine au cours de la période d'induction florale.

Ce travail de thèse posait la question du contrôle de la mise en place de la sensibilité à l'auxine notamment par l'histoire hormonale de la cellule. Dans les systèmes de régénération, la mise en place par les hormones d'une compétence à un programme organogénétique donné constitue un processus à long terme. Comme les changements de sensibilité que nous observions étaient eux aussi étalés sur plusieurs semaines, les outils élaborés durant ma thèse pouvaient *a priori* être appliqués aux situations d'organogenèse. Cependant il était utile de disposer de systèmes où des changements de sensibilité pouvaient être induits par un traitement hormonal à court ou moyen terme. Nous avons alors testé l'apport *in vivo* d'auxine sur la sensibilité *in vitro* de l'ATPase à cette hormone et montré qu'au stade préfloral cet apport augmente la sensibilité de l'ATPase d'un facteur 100 (Santoni et al. 1993). Sur cette base, une approche d'analyse de profils protéiques bidimensionnels a été engagée au laboratoire pour identifier des protéines associées à la sensibilité à l'auxine.

Au final, ces travaux ont permis de caractériser des différentiels de sensibilité au cours du développement qui constituent d'une part, des outils d'étude du mode d'action de l'auxine et d'autre part, un complément ou une alternative à la démarche génétique de recherche de mutants de sensibilité.

Par la suite, ces travaux ont été poursuivis par des collègues de l'équipe, au travers de l'identification d'une nouvelle famille de protéines spécifiquement associées à la MP nommées DREPP pour « Developmentally REgulated Plasma membrane Polypeptides » (Gantet et al. 1996; Logan et al. 1997) dont l'expression varie au cours du développement de la plante. Ces protéines constituaient des protéines potentiellement impliquées dans la variation de sensibilité à l'auxine au cours du développement de la plante.

4. Travaux de recherche en protéomique (1992-2000)

4.1. Etude protéomique du développement d'*Arabidopsis*

4.1.1. Contexte

J'ai effectué un stage post-doctoral de 1992 à 1993 dans le laboratoire de Biologie Cellulaire de l'INRA de Versailles dans l'équipe de Michel Caboche. Le projet du groupe consistait à caractériser des déficiences provoquées par des mutations affectant le développement des plantes. Les mutants les plus représentatifs étaient caractérisés par mes collègues d'un point de vue physiologique, génétique, moléculaire et ultrastructural. De mon côté j'ai proposé de mettre en place en tant qu'outil biochimique d'analyse des mutants, une analyse comparative de leur profil de protéines totales par électrophorèse bidimensionnelle (EBD). Ceci m'a conduit à mettre en place au laboratoire l'EBD de protéines, à développer des outils adéquats d'analyse statistique et m'a permis de contribuer à interpréter plusieurs phénotypes mutants.

4.1.2. La classification biochimique: un nouvel outil d'analyse de phénotypes mutants

Objectifs

L'approche que j'ai engagée était basée sur l'étude comparative des profils d'EBD des protéines totales de mutants de développement. Cette technique sépare les protéines en fonction de leur point isoélectrique dans une première dimension et selon leur masse moléculaire en deuxième dimension. L'intérêt de cette technique est la possibilité de visualiser plusieurs centaines de produits de gènes simultanément, ce qui permet de rechercher efficacement des changements dans l'expression du génome en fonction de mutations. De plus, à l'époque, de nouvelles molécules, les immobilines, permettaient de générer des gradients de pH reproductibles et des systèmes d'analyse d'image performants commençaient à être commercialisés. Mon objectif était de classer biochimiquement les mutants de développement en introduisant dans cette classification des contrôles correspondant à des plantes de type sauvage (WT) cultivées en présence de différentes hormones. L'ensemble des résultats a donné lieu à 5 publications (notées 5 à 9).

Résultats

L'EBD de protéines totales de jeunes plantules d'*Arabidopsis* permet de visualiser environ 700 polypeptides (Santoni et al. 1994). Des variations qualitatives et quantitatives des polypeptides ont systématiquement été observées lors de la comparaison des mutants avec le type WT. L'étude statistique basée sur une analyse de variance (programme développé sous SAS, en collaboration avec M. Zivy, INRA, Gif/Yvette) a permis de juger de la reproductibilité des variations quantitatives.

Les profils d'EBD des écotypes WT Col-0 et Ws étant différents, les dendogrammes de distances biochimiques doivent représenter des mutants issus du même écotype.

Des corrélations entre la classification biochimique d'une part et phénotypique d'autre part m'ont permis de valider la méthode (Santoni et al. 1997). Ainsi, les mutants surproducteurs d'auxine *sur1* ont, non seulement un phénotype similaire à celui du type sauvage cultivé sur piclorame (PC) (un analogue d'auxine) mais sont aussi biochimiquement liés à ce dernier. De plus, sur un dendogramme de distances biochimiques, ces mutants sont très éloignés du type WT cultivé sur une cytokinine, la benzyladénine (BA).

L'exploitation de cette approche a permis de contribuer à interpréter le phénotype des mutants *pasticcino* et *crystal*. Les mutants *pas1*, *pas2* et *pas3* (Feiler et al. 1995) ne sont pas alléliques mais montrent cependant une partie aérienne anormale similaire suggérant qu'ils sont impliqués dans une fonction physiologique semblable. La classification biochimique, montrant que ces mutants sont réunis dans le même cluster, a confirmé cette interprétation. D'un point de vue physiologique, les mutants *pas* répondent fortement aux cytokinines et d'un point de vue biochimique, ces mutants sont plus proches du type WT cultivé sur BA que sur PC. Cette relation s'est avérée être dû à une hypersensibilité des mutants aux cytokinines plutôt qu'à une surproduction de cytokinines car leur teneur en cette hormone n'est pas modifiée. Le gène PAS1, cloné par P. Vittorioso au laboratoire, code une immunophiline dont le rôle serait de réguler négativement la prolifération cellulaire induite par les cytokinines.

Comme dans le cas des mutants *pas*, le profil biochimique du mutant *cri1* (mutant cristal) est davantage relié à celui du type WT cultivé sur BA que sur PC. Des dosages d'hormones ont montré que ce mutant accumule environ six fois plus de cytokinines que le type WT (Delarue et al. 1997; Santoni et al. 1997) alors que les teneurs en auxine et en acide abscissique sont identiques. Le mutant *cri1*, qui montre des symptômes de vitrification, accumulerait des cytokinines à la suite d'un défaut de signalisation de cette hormone.

En résumé, ces deux études illustrent la pertinence d'une approche protéomique comparative pour l'étude de mutants de développement.

4.2. Protéome de la membrane plasmique d'*Arabidopsis*

L'émergence d'un thème nouveau dans l'équipe de M. Caboche – la caractérisation du continuum paroi/MP/cytosquelette – m'a conduit par la suite à développer l'approche de cartographie bidimensionnelle au niveau des protéines de la MP et de la paroi. Ce projet a été soutenu par un programme européen débuté au 01/12/95.

4.2.1. Plant Plasma membrane database : un protéome de protéines extrinsèques

Objectifs

Le programme européen « Plant Plasma Membrane database, PPMdb » avait pour objectif de réaliser un répertoire des protéines exprimées au niveau de la MP d'*Arabidopsis* et d'organiser ces résultats en une base de données disponible sur Internet. Le choix de cette membrane résidait dans son rôle majeur dans la transduction d'informations de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule et dans le peu de connaissances de cette membrane (seuls 5 % des protéines de la MP étaient représentés à l'époque dans les banques de données). J'ai débuté ce projet au laboratoire de Biologie Cellulaire à Versailles et je l'ai poursuivi à Montpellier, au laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes (BPMP) dans l'équipe de M. Rossignol.

L'ensemble des résultats a donné lieu à 3 publications (notées 11 à 13).

Résultats

L'étude protéomique de la MP nécessite d'évaluer la pureté de la fraction purifiée. L'utilisation de marqueurs enzymatiques spécifiques de membranes cellulaires a montré que les membranes plasmique, mitochondriale, tonoplastique et golgienne représentent respectivement 83 %, moins de 1 %, 13 % et 4 % de la fraction membranaire purifiée (Santoni et al. 1998). Ces résultats, similaires à ceux obtenus sur des fractions membranaires de MP purifiées par partage de phase (Larsson et al. 1990), montraient un net enrichissement en MP de la fraction purifiée.

L'analyse comparative par EBD des MPs de feuille et de racine m'a permis de mettre en évidence deux populations distinctes de protéines: l'une est spécifique de chacun des tissus et l'autre (60 % des protéines de chaque carte) représente des protéines présentes à la fois dans les deux types de MP. Cette deuxième catégorie constitue ainsi une population de protéines constitutives de la MP (Santoni et al. 1999). De plus, l'analyse comparative des gels d'EBD des fractions solubles et plasmalemmiques montre que des protéines peuvent avoir plusieurs localisations subcellulaires et que leur association avec la MP dépend du type d'organe (Santoni et al. 1998; Santoni et al. 1999). Par ailleurs j'ai aussi montré que le protéome de MP foliaire est modifié au cours de la journée. L'ensemble de ces résultats mettait ainsi en évidence une dynamique de la MP.

Dans le cadre du projet PPMdb, une analyse transcriptomique d'ARNm correspondant à des protéines de la MP avait été engagée par l'équipe de J. Hoheisel (Heidelberg, Allemagne). La comparaison de l'évolution au cours de la journée, des niveaux d'expression de 73 protéines de la MP et des transcrits correspondants a montré l'absence de corrélation entre l'abondance des protéines et celle des transcrits correspondants. Ce résultat confirmait les résultats obtenus à l'époque sur deux autres études (la levure et le rat), où une corrélation d'à peine 0.4 était mesurée entre ces deux paramètres.

L'identification des protéines de ce protéome a été réalisée à l'aide de gels préparatifs d'EBD utilisant les composants classiques de solubilisation des protéines *ie* CHAPS et urée, compatibles avec la focalisation des protéines. Le séquençage de 104 protéines (Santoni et al. 1998; Santoni et al. 1999) par chimie d'Edman et spectrométrie de masse a montré que 52 protéines avaient une fonction connue, 64 % d'entre elles ayant déjà été décrites, par d'autres approches, comme étant plasmalemmiques. Les autres protéines étaient inconnues en banque, montrant ainsi la pertinence de cette approche en tant que ressource de nouveaux produits de gènes. En complément de cette étude, une approche de biologie cellulaire utilisant la protéine GFP fusionnée à ces protéines nouvelles aurait contribué à valider leur localisation subcellulaire.

4.2.2 Protéome hydrophobe de la membrane plasmique d'*Arabidopsis*

Objectif

La nature extrinsèque des protéines identifiées dans le projet PPMdb révélait que cette approche sous-estime largement l'ensemble des protéines transmembranaires (TM). Or l'analyse des génomes entièrement séquencés montre que cette population de protéines représente 1/3 des protéines codées par le génome. L'absence de ces protéines sur les cartes d'EBD était attribuable à des problèmes techniques liés à la faible performance du mélange classique CHAPS/urée pour extraire ces protéines et les maintenir en solution pendant la focalisation. En collaboration avec T. Rabilloud (CEA, Grenoble), j'ai montré qu'il est possible d'améliorer la solubilisation de ces protéines et leur présence sur gel d'EBD à l'aide de nouveaux détergents et de mélanges chaotropiques appropriés à l'isoélectrofocalisation. Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un projet financé par le CNRS (Physique et Chimie du Vivant).

L'ensemble des résultats a donné lieu à 5 publications (notées 10, 14, 15, 16 et 21).

Résultats

La solubilisation des protéines par un nouveau détergent dérivé d'amidosulfobétaine (détergent C8, synthétisé par T. Rabilloud) et de thiourée a permis de visualiser pour la première fois sur EBD, deux protéines de la MP d'*Arabidopsis* possédant plusieurs hélices TM (une H⁺-ATPase à 10 hélices et une aquaporine qui en possède 6) (Chevallet et al. 1998). Cependant, étant donné le pourcentage élevé de protéines solubles dans la fraction de MP (jusqu'à 80 %), les protéines les plus hydrophobes restent minoritaires sur gel d'EBD. Une étape d'enrichissement en protéines TM est donc absolument nécessaire préalablement à leur séparation par EBD (Fig. 1).

J'ai comparé l'efficacité du Triton X-114, du Triton X-100, d'un traitement alcalin et des solvants (chloroforme/méthanol) à extraire les protéines TM. J'ai ensuite comparé l'efficacité de cinq nouveaux détergents (*fC5*, *fC6*, *fC7*, C8, ASB14) et du CHAPS à solubiliser ces protéines et à les maintenir solubilisées pendant tout le processus d'EBD (Santoni et al. 2000b).

Cette étude a permis de dégager des règles générales d'utilisation de ces détergents. En particulier, nous avons montré que la délipidation préalable de la MP améliore l'efficacité de solubilisation des détergents. De plus, les détergents possédant un noyau aromatique ne délipident pas efficacement la MP mais déstabilisent efficacement les agrégats protéiques et

inversement pour les détergents linéaires. Cette étude a conduit à la commercialisation du détergent ASB14 par la société Calbiochem.

Un résultat remarquable est que chaque type d'extraction identifie un protéome membranaire spécifique. La comparaison de ces protéomes par le modèle statistique AMMI (Additive Main effect with Multiplicative Interaction) a permis de regrouper les protéines en fonction de leur solubilité et de leurs propriétés électrophorétiques. Ce travail a été mené en collaboration avec D. Desclaux (station de Génétique et Amélioration des Plantes, INRA, Mauguio). Plusieurs familles, regroupant des protéines sur la base de caractéristiques structurales communes ou d'interactions biochimiques fortes, ont émergé de cette analyse. L'identification par SM de quelques protéines a permis d'attribuer des spécificités à chaque groupe. Ainsi, deux d'entre eux regroupent les protéines les plus hydrophobes, un autre groupe renferme les sous-unités de la V-ATPase, un quatrième regroupe des protéines à une hélice TM ainsi que des protéines décrites pour interagir avec des protéines membranaires (Santoni et al. 2000b).

Au final, cette étude montre que l'EBD de protéines de membranes biologiques, dont la composition lipidique diffère, nécessite une étude préliminaire pour optimiser les conditions de solubilisation. Cette approche constitue surtout une nouvelle stratégie pour appréhender les relations fonctionnelles entre protéines membranaires. En cela, elle est complémentaire d'autres stratégies et devrait contribuer à la compréhension des interactions entre les protéines de la MP.

Malgré le relatif succès de la démarche précédente, un grand nombre de protéines hydrophobes ne sont pas résolues par l'EBD car elles combinent généralement plusieurs des désavantages suivants: protéines faiblement abondantes et/ou basiques et/ou faiblement solubles dans les tampons de focalisation. Nous avons défini un index, égal au rapport entre le nombre d'hélices TM et le poids moléculaire de la protéine, qui permet de définir un seuil de détection des protéines TM à hélices α sur gel d'EBD (Santoni et al. 2000c). Au delà de ce seuil, égal à 0.25, la protéomique des protéines membranaires ressemble à un « amour impossible » (Santoni et al. 2000c) et d'autres technologies doivent alors être développées pour étudier ces protéines. Néanmoins, dans ce cas, on perd l'avantage que présente l'EBD de visualiser les modifications post-traductionnelles (MPT) révélées par des décalages de points isoélectriques et/ou de masse induits par la présence de ces modifications.

**5. Travaux récents et en cours: régulation des aquaporines par modifications post-traductionnelles
(2000-2006)**

En 2000 j'ai rejoint le groupe de Christophe Maurel qui créait alors une ATIPE au laboratoire de Biologie et Physiologie Moléculaire des Plantes (BPMP, directeur Claude Grignon). Les enjeux de son groupe sont de développer de nouvelles approches moléculaires permettant d'appréhender la fonction intégrée des aquaporines (AQPs) dans la plante. Plus largement, il s'agit de comprendre les mécanismes qui contrôlent les flux d'eau, au cours du développement de la plante ou en réponse à des contraintes environnementales.

Etant donnée l'expérience acquise dans le domaine de la biochimie des protéines membranaires, j'ai développé un projet basé sur l'étude biochimique de la régulation des AQPs d'*Arabidopsis* par une approche de type protéomique. A terme, mon objectif est d'introduire les retombées de cette approche dans les thématiques physiologiques du groupe.

5.1. Problématique

Le maintien du statut hydrique est une contrainte majeure pour la croissance et le développement des plantes terrestres. Ces organismes peuvent en particulier être soumis à des conditions environnementales sévères. La découverte des AQPs a démontré le rôle crucial que jouent les membranes cellulaires dans le maintien du statut hydrique des plantes (Maurel and Chrispeels 2001). Ces protéines forment des canaux qui facilitent la diffusion de l'eau ou de petits solutés neutres au travers des membranes biologiques.

Des travaux menés sur diverses espèces végétales montrent que la conductivité hydraulique racinaire (L_{pr}) est modulée par le contexte physiologique ou en réponse à des stimuli de l'environnement: cycles jour-nuit, stress hydrique et salin, anoxie, exposition au froid, traitement par l'acide abscissique, carence et levée de carence nutritionnelle (voir (Javot et Maurel 2002) pour revue). L'implication des AQPs dans ces processus a été proposée sur la base des effets du mercure, un inhibiteur général mais non spécifique des AQPs (Javot et Maurel 2002). Le transport d'eau dans la racine offre ainsi un contexte physiologique clair pour appréhender la fonction intégrée des AQPs de plantes et analyser les mécanismes moléculaires et cellulaires des régulations qui affectent ces protéines.

Les plantes possèdent un nombre important de gènes d'AQPs. Ainsi, le génome d'*Arabidopsis thaliana* code 35 isoformes d'AQP qui se subdivisent en 4 familles selon leur degré d'homologie de séquences: les PIP (Plasma membrane Intrinsic protein), TIP (Tonoplast Intrinsic protein), NIP (Nodulin-26-like Intrinsic Protein) et SIP (Small Intrinsic basic Proteins). Ce nombre important peut s'expliquer par des localisations subcellulaires

spécifiques, des profils d'expression tissulaire variés ou encore le fait que ces protéines soient la cible privilégiée de divers stimuli hormonaux ou environnementaux (Santoni et al. 2000a).

Les AQPs sont des protéines transmembranaires de 25-34 kDa assemblées en tétramères. Chaque monomère présente une organisation typique avec 6 hélices transmembranaires α , 5 boucles extramembranaires (*A – E*), les extrémités N- et C-terminales étant localisées dans le cytoplasme. La résolution à l'échelle atomique de la structure d'AQPs présentant des spécificités de transport différentes permet maintenant d'expliquer les mécanismes moléculaires de perméation à l'eau et aux petits solutés ainsi que l'absence de perméation aux protons (Fu et al. 2000; Murata et al. 2000).

Pour appréhender la fonction des AQPs de plantes, une approche du groupe consiste à analyser les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la régulation des AQPs. Outre la régulation des AQPs par la modulation de l'expression de leurs gènes, l'activité de ces protéines peut être régulée au niveau post-traductionnel. Des données issues de la littérature révèlent que les parties extramembranaires (extrémités N- et C-terminales et boucles) des AQPs jouent un rôle critique dans leur fonction en contrôlant soit leur localisation, soit le degré d'ouverture/fermeture du canal (gating). Le gating de certaines AQPs est modulé par le degré de protonation de résidus His situés sur des parties extracytoplasmiques de plusieurs AQPs animales (Zelenina et al. 2003; Németh-Cahalan et al. 2004). Notre groupe a montré que c'est l'acidification cytosolique, par le biais de la protonation d'une His de la boucle D qui inhibe l'activité des AQPs PIP (Tournaire-Roux et al. 2003). Le gating peut aussi être modulé par le degré de phosphorylation comme cela est décrit chez l'AQP NOD26 de la membrane péribactéroïdienne de nodules de soja (Guenther et al. 2003) et chez PM28A de la MP d'épinard (Johansson et al. 1998). Par contre, le degré de phosphorylation des AQPs animales module plutôt leur localisation subcellulaire (Marinelli et al. 1999; Madrid et al. 2001; Huebert et al. 2002; Ishikawa et al. 2002; Brown 2003) en interagissant avec des séquences d'adressage localisées en N- et C-terminal de l'AQP (van Balkom et al. 2004). Ainsi, dans les cellules rénales, le trafic de l'AQP AQP2 de vésicules intracellulaires vers la MP est finement régulée par la phosphorylation du résidu Ser286 par une protéine kinase (Kamsteeg et al. 2000; van Balkom et al. 2002). De plus, à l'intérieur d'un tétramère, la stoechiométrie relative de monomères d'AQP2 phosphorylés ou non phosphohorylés détermine précisément la localisation de l'AQP2 (Kamsteeg et al. 2000).

D'autres modifications post-traductionnelles récemment décrites sont des déterminants importants de la régulation de l'expression des AQPs et de leur fonction. Ainsi, la

glycosylation de la boucle C d'AQP2 régule son expression à la surface de la cellule (Hendricks et al. 2004). Chez les plantes, la redistribution intracellulaire d'une TIP (McTIP1;1) en réponse à un choc osmotique dépend aussi de la glycosylation de la protéine (Vera-Estrella et al. 2004). Dans les fibroblastes humains, un stress hyperosmotique réduit l'ubiquitination de l'AQP AQP1 augmentant ainsi sa stabilité (Leitch et al. 2001).

Ces données suggèrent l'existence de régulations post-traductionnelles multiples agissant tant au niveau du gating que de celui de la localisation des AQPs. Dans ce contexte, je me suis intéressée aux processus moléculaires qui pourraient rendre compte de la modulation du transport racinaire d'eau par des stress environnementaux.

L'ensemble de ces travaux a conduit à cinq publications (17-20, 22) et un article soumis (25).

5.2. Résultats et travaux en cours

5.2.1. Inventaire des différentes formes d'aquaporines de la membrane plasmique de racine par une approche protéomique

Les flux cellulaires d'eau dans la racine étant largement contrôlés par la MP, nous avons entrepris une caractérisation systématique des AQPs de cette membrane. Treize des AQPs codées par le génome d'*Arabidopsis* appartiennent à la famille des PIPs (Plasma membrane Intrinsic Proteins). Une approche protéomique couplant enrichissement en protéines hydrophobes de la MP, séparation de ces protéines par électrophorèse et identification par spectrométrie de masse (SM) MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight) et en tandem [ESI-(Electrospray Ionization)/SM-SM et MALDI-TOF/TOF] montre qu'au moins 5 isoformes PIP sont exprimées dans la MP de racine. Les études de SM ont été menées sur les plate formes protéomiques de la génopole Languedoc-Roussillon (M. Rossignol et P. Jouin) ainsi qu'en collaboration avec J. Vinh (ESPCI, Paris) et ont conduit à un article publié dans *Biochem J.* (Santoni et al. 2003) (Tab. 1).

L'application des techniques que j'avais préalablement développées pour l'étude des protéines membranaires par EBD (§ 4), a permis de montrer qu'une seule AQP PIP peut se présenter sous de multiples formes, de points isoélectriques différents, suggérant l'existence de modifications post-traductionnelles (MPTs) (Santoni et al. 2003). L'identification de MPTs nécessite de couvrir efficacement l'ensemble des parties extramembranaires de la protéine. La

trypsine, a permis d'inventorier les MPTs portées par les extrémités ainsi que les boucles C et E. L'utilisation d'autres enzymes (chymotrypsine, endo-Lysine C) et d'agents chimiques (CNBr) a nécessité une mise au point prise en partie en charge par S. Prak au cours de sa thèse. Actuellement, 65% des parties extramembranaires d'une des AQP's les plus abondantes de la racine, PIP2;1, sont couverts par l'ensemble de ces stratégies.

La présence de MPTs sur des peptides du spectre de masse, a été prédite à l'aide du logiciel FINDMOD (<http://au.expasy.org/tools/findmod/>) et les peptides d'intérêt ont été séquencés par SM en tandem. Cette stratégie a permis de démontrer que la méthionine initiatrice (Met1) est acétylée chez les isoformes PIP1 et clivée chez les isoformes PIP2 (Tab.1). La maturation de la méthionine initiatrice est un processus co-translationnel qui dépend essentiellement de la séquence en acides aminés au voisinage de Met1 (Poledova and Sherman 2003; Giglione et al. 2004). Sa signification fonctionnelle est encore peu claire. Nos résultats indiquent cependant que les AQP's PIP1 et PIP2 qui sont des isoformes très proches, sont différemment maturées, ce qui en retour pourraient affecter leur activité de façon différente.

Un résultat plus original est la méthylation de l'extrémité N-terminale de PIP2;1: les résidus Lys3 et Glu6 peuvent être respectivement diméthylé et mono-méthylé (Tab. 1). La méthylation de protéines membranaires végétales n'a jamais été décrite et est très peu documentée chez les protéines membranaires animales: une étude protéomique du cerveau de rat décrit 15 protéines portant des résidus lysine mono-, di- ou tri-méthylés mais aucune signification fonctionnelle ne leur a été attribuée (Kluck et al. 2000; Wu and Yates 2003; Chen et al. 2004). La méthylation de la lysine est par contre très étudiée chez les histones où elle interagit avec d'autres MPTs pour moduler le fonctionnement de ces protéines et donc la transcription de gènes.

La méthylation du glutamate est encore plus originale car cette modification n'a jamais été décrite chez les eucaryotes. Par contre, chez des chémorécepteurs bactériens, la méthylation réversible de résidus Glu contrôle leur activité (Simms and Subbaramaiah 1991; Djordjevic et al. 1998). D'autres méthylations sont prédites sur l'extrémité N-terminale des AQP's PIP1 et sont en cours de localisation précise.

En complément de cette étude, une analyse spécifique des phosphopeptides a été conduite par une stratégie IMAC (Immobilized Metal ion Affinity Chromatography) en collaboration avec S. Laugesen (en stage post-doctoral dans l'Unité de Recherche

Protéomique de M. Rossignol). Cette approche a révélé la présence, sur l'extrémité C-terminale, de deux sites de phosphorylation sur l'isoforme PIP2;1 (Ser280, Ser283) et de trois sites chez PIP2;4 (Ser280ou283, Ser286 et Ser289).

En résumé, cette approche descriptive a permis de dégager un ensemble de nouveaux mécanismes potentiellement régulateurs des AQPs de la MP de racine. Nous nous sommes par la suite attachés à étudier ces MPTs dans le cadre de la régulation des AQPs racinaires en réponse à un traitement salin. Par ailleurs, étant donnée l'originalité de la méthylation, nous avons porté un intérêt particulier à l'étude de sa signification fonctionnelle. Enfin, nous tentons actuellement d'étendre notre stratégie d'étude protéomique aux AQPs d'autres membranes cellulaires que la MP.

5.2.2. Bases moléculaires de la régulation de l'activité des aquaporines par un traitement salin (DEA S. Prak).

Notre groupe a montré que la conductivité hydraulique racinaire d'*Arabidopsis* baisse de 70% après deux heures de traitement salin des plantes (Boursiac et al. 2005). Cette diminution est attribuable à l'inhibition de l'activité des AQPs mais ne s'explique pas par une baisse de l'expression des gènes d'AQPs (Boursiac et al. 2005). Nous avons donc testé l'hypothèse d'une régulation au niveau des protéines, travail mené par S. Prak au cours de son DEA. En accord avec la réponse au niveau de la racine entière, la perméabilité hydrique osmotique (Pf) de vésicules de MP diminue de 60% après deux heures de traitement. Par contre, l'abondance des AQPs PIPs, mesurée par western-blot et ELISA ne change pas ce qui suggère que des MPTs pourraient réguler l'activité des PIPs.

Une analyse semi-quantitative basée sur la comparaison des spectres de masse montre que les méthylations identifiées ne peuvent pas rendre compte de la modulation de l'activité des AQPs PIP en réponse au traitement salin. Par contre, des résultats préliminaires suggèrent une déphosphorylation partielle des isoformes PIP2;1 et PIP2;4 en réponse au traitement salin. D'après les analyses protéomiques, PIP2;4 ne fait pas partie des AQPs les plus abondantes de la MP de la racine. Il faut donc envisager que PIP2;4 soit particulièrement perméable pour rendre compte d'une activité prépondérante dans la MP ou que sa déphosphorylation ne contribue que partiellement à la baisse de Pf observée. Nous envisageons de tester la contribution de PIP2;4 et de son état de phosphorylation à la Pf globale de la MP en

surexprimant de façon stable cette isoforme en suspension cellulaire d'*Arabidopsis thaliana*, technique bien maîtrisée au laboratoire (voir § suivant). Cette approche fonctionnelle sera couplée à la quantification par protéomique de la phosphorylation C-terminale de la protéine PIP2;4. La déphosphorylation *in vitro* de la protéine permettra de juger du rôle de cette modification dans le gating de PIP2;4. A terme, si l'activité de PIP2;4 s'avère être essentielle dans la réponse au traitement salin, des plantes mutées dans ce gène seront étudiées quant à leur réponse globale au traitement salin et à d'autres stress environnementaux.

L'aquaporine PIP2;1 est par contre, une isoforme abondante dans la MP de racine et sa déphosphorylation pourrait rendre compte de la baisse de Pf. Nous avons donc engagé une étude sur le rôle de la phosphorylation par le biais de mutants ponctuels des sites de phosphorylation (travail mené par S. Prak pendant sa thèse). L'effet des phosphorylations sur l'activité de transport d'eau de PIP2;1 sera étudié par stopped-flow sur vésicules de MP issues de suspensions cellulaires sur-exprimant les AQPs mutées. Nous évaluerons aussi le rôle des phosphorylations C-terminales dans la localisation sub-cellulaire de PIP2;1, par le biais de fusion des mutants PIP2;1 avec la GFP, exprimés en plantes après transformation par *Agrobacterium*, ainsi qu'en suspensions cellulaires après transformation par biolistique.

5.2.3. Signification fonctionnelle de la méthylation des aquaporines PIP

Nous étudions la signification fonctionnelle de la méthylation N-terminale de PIP2;1 en surexprimant, de façon stable, l'AQP PIP2;1 sauvage (WT) ou mutée sur ses sites de méthylation dans des cellules en suspension d'*Arabidopsis*. Notons que l'isoforme PIP2;1 est un modèle intéressant car, outre le fait qu'elle soit méthylée, cette AQP est parmi les plus abondantes de la racine et est la cible d'autres MPTs (phosphorylation) et effecteurs (pH et calcium). La surexpression stable en suspension cellulaire a nécessité la mise au point de conditions de transformation. Ces mises au point ont débuté au cours du stage de DEA de R. Sormani et ont été optimisées par L. Verdoucq au cours de son stage post-doctoral.

L'AQP PIP2;1-WT ainsi que des mutants ponctuels des résidus Lys3 (mutants PIP2;1-K3A et -K3R) et Glu6 (PIP2;1-E6A) ont été produits et surexprimés en cellules par L. Verdoucq au cours de son post-doctorat. Un mutant supplémentaire (PIP2;1-EVS) a été produit, visant à augmenter la distance entre Lys3 et Glu6 et à reproduire la partie N-terminale de l'isoforme PIP2;7 qui n'a jamais été détectée comme étant méthylée. L'analyse

par SM, après purification de la MP, de l'AQP sauvage PIP2;1 surexprimée en cellules a montré que le profil de méthylation de l'AQP est similaire à celui de PIP2;1 exprimée dans les racines (la Lys3 est partiellement diméthylée et Glu6 est partiellement mono-méthylé). Ce résultat démontre que les cellules en suspension constituent un système d'expression favorable pour analyser la méthylation de PIP2;1.

La diméthyl-Lys3 est un marqueur de localisation de PIP2;1 à la MP

Dans un premier temps, nous avons étudié la localisation sub-cellulaire du processus de méthylation en comparant le profil de méthylation de l'AQP PIP2;1 issue de fractions microsomales et plasmalemmiques. Pour cela, j'ai mis au point une technique d'immunopurification de l'AQP à partir de microsomes, fraction protéique essentiellement constituée de membranes intracellulaires. De façon surprenante, la forme diméthylée de Lys3 est seulement détectée dans la MP, ce qui suggère que la diméthylation de Lys3 constitue un marqueur d'expression de PIP2;1 à la MP.

La mutation des sites de méthylation modifie profondément l'extrémité N-terminale

L'analyse, par SM, des AQPs mutées sur les sites de méthylation montre que les mutations induisent de nouveaux profils de modifications: notamment, les mutations E6A et EVS induisent l'apparition d'une modification sur l'extrémité N-terminale de la protéine correspondant soit à une acétylation soit à une triméthylation du 1^{er} (Ala) ou du 2^{ème} acide aminé (Lys). Ces ambiguïtés devraient être levée en utilisant un spectromètre de masse plus sensible de type FT-ICR (en collaboration avec J. Vinh, ESPCI, Paris). La mutation K3A induit l'apparition d'une acétylation sur Ala1 ainsi que d'une méthylation sur Ala2.

Les formes modifiées s'accumulent dans un compartiment intracellulaire

Les données de SM des protéines mutantes E6A et EVS montrent que les nouvelles formes modifiées sont spécifiquement localisée dans les membranes intracellulaires (où elles constituent en moyenne 40 % du pool microsomal d'AQPs) et absentes de la membrane plasmique. Des mesures de stopped-flow, réalisées par L. Verdoucq sur des vésicules de MP isolées des cellules transformées montrent qu'aucune des mutations (K3A, K3R, E6A et EVS) n'affecte l'activité des AQPs mutées. Par contre, l'ensemble de ces mutants présentent une suraccumulation cellulaire d'un facteur 3 à 6 par rapport à l'AQP sauvage PIP2;1.

Des expériences d'immunofluorescence en microscopie confocale ont permis de confirmer ce résultat et de préciser l'accumulation de la protéine mutante E6A dans le

réticulum endoplasmique (RE) (Fig. 2). Ce résultat a été confirmé par l'observation en microscopie confocale de ces mêmes protéines fusionnées à la Green Fluorescent Protein, travail réalisé par M. Sorieul au cours de son stage de DEA et de thèse au laboratoire. L'ensemble de ces résultats suggère que la localisation subcellulaire pourrait être reliée au statut de modification de l'extrémité N-terminale.

Rôle de l'extrémité N-terminale de PIP2 ;1 dans sa localisation subcellulaire

Un fait remarquable est l'existence d'une interférence entre le résidu Glu6 et l'extrémité N-terminale: sa mutation en Ala (mutant E6A) ou son décalage d'une position dans la séquence (mutant EVS) provoque l'apparition d'une nouvelle modification sur l'un des 2 premiers résidus, strictement présente dans un compartiment intracellulaire (identifié comme le RE dans le cas d'E6A) et non dans la MP. Il faut noter que l'extrémité N-terminale comporte un motif de type diacide (AKDVEA) dont le Glu6 fait partie. De récents travaux ont montré que ce type de motif peut aussi moduler la sortie de protéines membranaires du RE chez les plantes en combinaison avec d'autres facteurs restant à élucider (Hanton et al. 2005). On peut donc envisager que, si ce motif est fonctionnel chez PIP2;1, sa mutation contribue au phénotype de rétention de la protéine dans le RE. Il reste cependant à évaluer l'influence de la méthylation du glutamate sur le rôle joué par cet éventuel motif diacide.

Par contre, l'adressage modifié des PIP2;1 mutés sur la Lys3 ne peut pas être expliqué par l'intervention de ce motif diacide. Parce que les résidus Lys sont des sites préférentiels d'ubiquitination, une mutation ponctuelle à cette position pourrait empêcher la dégradation de la protéine par la voie du protéasome, provoquant ainsi une suraccumulation cellulaire. Le mutant K3R se caractérise par un phénotype cellulaire supplémentaire: son accumulation dans la MP est 3 fois supérieure à celle des autres mutants. Ce résultat suggère que l'arginine en position 3 favoriserait l'adressage à la MP en mimant l'effet d'une lysine diméthylée naturellement présente dans un contexte de protéine PIP2;1 sauvage.

Il reste maintenant à découvrir les conditions physiologiques modulant l'état de méthylation des AQPs. L'étude en parallèle de leur localisation subcellulaire devrait permettre d'évaluer plus précisément le rôle de la méthylation N-terminale dans l'adressage subcellulaire. De plus, la caractérisation des Glu- et Lys-methyl transférases agissant sur PIP2;1 ainsi que l'identification des partenaires en interaction avec les différentes formes méthylées contribueront à la compréhension des mécanismes d'adressage des protéines membranaires.

5.2.4. Caractérisation des modifications post-traductionnelles d'AQP de la membrane vacuolaire ainsi que celles d'autres protéines membranaires

L'ensemble des résultats obtenus jusqu'à présent a montré qu'une approche protéomique combinée à des approches fonctionnelles et de biologie cellulaire permet de révéler de nouveaux mécanismes de régulation des protéines membranaires. Cette stratégie peut donc être étendue à d'autres protéines membranaires pour résoudre de nouveaux mécanismes de régulation ou au contraire révéler des mécanismes communs de régulation.

Nous allons rechercher si la méthylation concerne aussi d'autres AQPs majeures que sont les TIPs (Tonoplast Intrinsic Proteins). Ce projet, débuté dans le cadre d'une collaboration avec G. Amodéo au cours d'un stage de trois mois (2005) dans notre laboratoire a déjà permis de purifier des fractions membranaires enrichies en tonoplaste et de dresser un premier inventaire par SM des TIPs exprimées dans les cellules en suspension d'*Arabidopsis*. Des stratégies de digestion enzymatique, utilisant d'autres enzymes que la trypsine, sont en cours de développement pour couvrir le maximum de séquence et identifier d'éventuelles modifications comme la méthylation. Des résultats préliminaires montrent que dans les suspensions cellulaires, TIP2;1 et TIP1;2 sont les isoformes les plus exprimées. La méthionine initiatrice est maturée (clivée) comme dans le cas des isoformes PIP2 et environ 10 % de TIP2;1 est acétylé en Ala2.

D'autres résultats récents suggèrent que la méthylation serait une modification commune à des protéines transmembranaires végétales autres que les AQPs. La caractérisation des enzymes impliquées dans la méthylation des protéines membranaires (voir § 6) constituera un point d'entrée dans l'identification systématique des cibles membranaires méthylées.

6. Projet de recherche

Etant donnée l'originalité des observations concernant la méthylation des AQP_s PIP_s, le projet de recherche que je compte développer s'appuiera en grande partie sur ces résultats. Il s'articulera principalement autour de deux axes que sont la caractérisation des activités de type méthyltransférase modifiant PIP₂;1 ainsi que la caractérisation des protéines interagissant avec PIP₂;1 en fonction du degré de modification (notamment de méthylation) de l'extrémité N-terminale. De plus, l'analyse des profils de MPTs des AQP_s en fonction de conditions environnementales modulant l'activité de ces protéines, sera poursuivi.

6.1. Caractérisation de méthyltransférases de protéines membranaires

6.1.1. Purification de méthyltransférases

Dans ce projet, qui sera mené par un stagiaire post-doctoral (2005-2007), l'AQP PIP₂;1 sera utilisée comme modèle pour disséquer des aspects moléculaires et fonctionnels originaux de la méthylation des protéines membranaires végétales. Deux types approches seront engagés pour identifier et caractériser les méthyltransférases d'AQP_s de la racine d'*Arabidopsis* : d'une part, un clonage par homologie de séquences de méthyltransférases potentielles et d'autre part, une purification biochimique des enzymes modifiant PIP₂;1.

Clonage de Lys- méthyltransférases à domaine SET

A part une exception, toutes les méthyltransférases de Lys connues à ce jour possèdent un motif consensus de 130 acides aminés définissant un domaine SET (S(var) 3-9, Enhancer-of-zeste, TriThorax) (Zhang and Reinberg 2001). Environ soixante protéines codées par le génome d'*Arabidopsis* présentent ce domaine mais la plupart d'entre elles possèdent un signal peptidique d'adressage chloroplastique ou nucléaire. Celles qui sont potentiellement localisées dans le cytoplasme seront prioritairement clonées puis produites en bactérie, en fusion avec une étiquette de type 6-His pour permettre leur purification.

La capacité de ces enzymes à méthyler la Lys3 de la partie N-terminale de PIP₂;1 sera testée *in vitro* par un test radioactif d'incorporation de ³H-S-adenosylméthionine dans un peptide N-terminal de PIP₂;1. Le peptide modifié sera analysé par spectrométrie de masse pour identifier le nombre de groupements méthyl incorporés dans le peptide. Ce nombre correspond à un incrément de masse de 14 Da par groupement. On étudiera différents types de

séquences N-terminales en plus de la version non modifiée. On évaluera notamment si la présence d'un méthyl sur le glutamate en position 6 affecte la méthylation de Lys3.

Purification de méthyltransférases

L'approche précédente ne donne accès qu'à des méthyltransférases de Lys et pourrait même s'avérer infructueuse puisque certaines méthyltransférases ne possèdent pas de domaine SET. On mettra donc en place en parallèle une approche biochimique alternative pour la purification de méthyltransférases, modifiant soit Lys3 soit Glu6, à partir d'extraits protéiques de racines et de cellules. La priorité sera donnée à l'étude des cellules pour lesquelles nous disposons déjà d'un grand nombre de données biochimiques et fonctionnelles.

Des fractions membranaires brutes seront utilisées comme une source potentielle d'activité. La présence d'activité méthyltransférase sera évaluée de la même façon que précédemment par marquage *in vitro* d'un peptide N-terminal en présence de ³H-S- adénosylméthionine. Par la suite, la SM permettra de déterminer précisément la spécificité de l'enzyme étudiée (nombre de groupements méthyl incorporés et type du résidu méthylé).

Les enzymes seront ensuite purifiées par fractionnement séquentiel et/ou chromatographie, séquencées par SM et les gènes correspondants seront clonés. Des versions fusionnées à une étiquette 6-His seront ensuite produites en bactérie et leurs propriétés enzymatiques seront caractérisées en détail (voir § suivant).

6.1.2. Paramètres cinétiques et spécificité des méthyltransférases

Les paramètres cinétiques (K_m , V_m) des activités méthyltransférases identifiées seront finement évalués selon un test basé sur la quantification de l'homocystéine (Hcy), produit de la réaction d'hydrolyse de la S- adénosylméthionine. La concentration en Hcy est déterminée par la conjugaison spécifique de son groupement SH à une sonde fluorescente. Cette technique a déjà permis de déterminer les paramètres cinétiques de deux méthyltransférases d'histones (Collazo et al. 2005).

Par la suite on s'intéressera à la capacité de ces enzymes à méthyler une ou plusieurs AQP et d'une façon plus générale à la spécificité de substrat de ces enzymes (voir § 5.2.4.).

6.1.3. Fonction des méthyltransférases

Plusieurs stratégies seront menées pour comprendre la fonction des méthyltransférases, notamment l'étude de leur localisation subcellulaire et de leur profil d'expression *in planta*. La localisation subcellulaire sera déterminée par immunocytochimie et par le biais de fusions avec la protéine GFP. L'expression dans les tissus des gènes clonés sera étudiée en utilisant un gène rapporteur comportant le promoteur du gène de méthyltransférase fusionné à la séquence codante du gène de la β -glucuronidase. La co-expression de ces fusions avec certaines AQPs sera particulièrement étudiée.

Les méthyltransférases seront surexprimées dans des suspensions cellulaires d'*Arabidopsis*, et on étudiera leur impact sur l'état de MPTs et la localisation subcellulaire de PIP2;1. Par ailleurs, des mutants d'*Arabidopsis* dont ces gènes de méthyltransférases auront été inactivés seront analysés en détail. Une analyse protéomique comparative de plantes sauvages et mutantes permettra d'évaluer les substrats de ces enzymes. Ce type d'approche viendra ainsi compléter l'approche déjà en cours (§ 5.2.4.) et permettra d'identifier des groupes de protéines membranaires susceptibles d'être co-régulées sous l'effet de leur méthylation.

6.2. Interactions aquaporines-protéines

6.2.1. Problématique

- rôle de la méthylation et de l'acétylation dans les interactions entre protéines
- protéines en interaction avec les aquaporines

On suppose que les groupements méthyl créent un environnement local hydrophobe, favorisant ainsi l'interaction avec des protéines partenaires, comme cela est décrit dans le cas des histones où la diméthylation et la triméthylation d'une même lysine provoquent le recrutement de protéines différentes sur la chromatine (Lusser 2002). De plus, quelques exemples de la littérature montrent que l'acétylation N-terminale d'une protéine peut provoquer son interaction avec des partenaires protéiques spécifiques, modulant ainsi son adressage subcellulaire (Graham 2004).

En interagissant avec des protéines, certaines AQPs animales ont leur adressage modifié (Madrid et al. 2001, Noda et al. 2004b, van Balkom et al. 2004). Dans une approche

systematique de recherche de partenaires en interaction avec AQP2, un complexe multiprotéique a été isolé comportant un ensemble de protéines supposées constituer la machinerie du trafic d'AQP2 dans la cellule (Barile et al. 2005; Noda et al. 2005).

Dans ce contexte, l'identification des partenaires en interaction avec la partie N-terminale de PIP2;1 devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes qui modulent la localisation subcellulaire des AQPs PIP.

6.2.2. Purification des complexes protéiques

Dans l'étude décrite en 5.2.3. visant à immunopurifier PIP2;1 à partir des cellules surexprimant cette protéine, les protéines immunopurifiées ont été séparées par SDS-PAGE et analysées par SM. Parmi celles-ci les isoformes PIP2;4 et PIP2;7 ont été identifiées, ce qui suggère une interaction entre PIP2;1 et ces deux protéines. Rappelons que l'anticorps utilisé dirigé contre l'extrémité C-terminale de PIP2;1 ne peut pas *a priori* reconnaître ces deux dernières protéines. Chez les plantes, l'existence d'hétérotétramères d'aquaporines a récemment été démontrée dans les travaux de Fetter *et al.* (Fetter et al. 2004). Les protéines que nous avons identifiées dans cette étude préliminaire constituent ainsi une source d'informations sur la composition d'hétérotétramères contenant l'isoforme PIP2;1.

Deux approches seront comparées quant à leur efficacité à isoler les protéines en interaction, en particulier avec l'extrémité N-terminale de PIP2;1: le pull-down et la chromatographie d'affinité. Nous rechercherons, à partir de différents extraits protéiques de suspensions cellulaires et de racines, des protéines en interaction avec le peptide N-terminal de PIP2;1 portant divers degrés de méthylation (non méthylé, _{2me}Lys3, _{1me}Glu6, _{2me}Lys3 et _{1me}Glu6) ainsi qu'une substitution de Lys3 par une arginine. Une fois les modifications (acétylation, triméthylation) induites par les mutations E6A et EVS clairement identifiées, celles ci seront prises en compte dans cette étude.

Pull-down

Nous envisageons, dans un premier temps, de trier plusieurs types de fractions protéiques (totale, microsomale, soluble) quant à la présence de protéines en interaction, par la technique du BIACORE (Biomolecular interaction analysis). La fixation entre la molécule en solution et le ligand immobilisé (ici, un peptide PIP2 ;1) provoque un changement de l'index de réfraction (Malmqvist and Karlsson 1997) indicatif de la présence d'une interaction. Le couplage du BIACORE avec un spectromètre de masse permettrait d'identifier

les protéines en interaction (Lopez et al. 2003). Il est à noter que deux appareillages BIACORE sont disponibles sur la génopole Languedoc-Roussillon.

Dans le pull-down, les peptides immobilisés seront incubés avec les extraits protéiques d'intérêt. Les protéines en interaction seront ensuite décrochées, séparées par électrophorèse SDS-PAGE et identifiées par SM. On dressera ainsi un inventaire des protéines en interaction avec la partie N-terminale de PIP2;1 selon le degré de méthylation de cette extrémité. Ce type de stratégie s'est avéré efficace pour étudier les régulations liées à la méthylation de la Lys4 de l'histone H3 et a permis d'élucider le rôle de la protéine WDR5 dans la méthylation de Lys4 et ses conséquences fonctionnelles sur la transcription de certains gènes (Wysocka et al. 2005).

L'avantage de cette approche est la possibilité de tester un grand nombre de peptides modifiés. Par contre sa limitation réside dans le fait que les protéines sont extraites et donc sorties de leur contexte cellulaire pour être incubées en présence des peptides appâts. Ceci pourrait conduire à identifier des protéines qui n'interagissent pas avec PIP2;1 *in vivo* mais qui se retrouvent en contact artefactuel lors du pull-down du fait de l'homogénéisation des extraits.

Chromatographie d'affinité

L'utilisation d'anticorps génériques reconnaissant une étiquette fusionnée à la protéine d'intérêt permet de limiter les problèmes de spécificité d'anticorps. Il existe de nombreux types d'étiquettes difficiles à comparer entre elles faute d'études à ce sujet. Dans le cas du TAP-tag (Tandem Affinity Purification) (Rigaut et al. 1999), l'étiquette, fusionnée à la protéine d'intérêt, contient une séquence de protéine A, un site de clivage protéasique (TEV) et une séquence peptidique à forte affinité pour la calmoduline (Dziembowski and Séraphin 2004). Cette technique a été peu utilisée chez les plantes (Rivas et al. 2002; Rohila et al. 2004; Witte et al. 2004; Rubio et al. 2005) mais a récemment été améliorée (Rohila et al. 2004; Rubio et al. 2005)

Les problèmes liés à l'utilisation du TAP-tag sont sa grande taille qui peut interférer avec la fonction de la protéine étiquetée et la durée de la purification (>1 jour) qui peut affecter l'intégrité des protéines, et diminuer le rendement des protéines en interaction faible. Une méthode récente, basée sur l'utilisation d'une plus petite étiquette unique (de 8 acides aminés), le Strep-II tag, permettant la purification en seulement quelques heures (Witte et al. 2004) semble être un bon compromis entre rendement et qualité (Lichty et al. 2005).

La purification de protéines en interaction avec une protéine transmembranaire est peu documentée. Ceci tient à l'incompatibilité à simultanément solubiliser les protéines transmembranaires et maintenir le complexe de protéines en interaction. On utilisera donc plutôt comme appât, la séquence correspondant à la partie N-terminale de PIP2;1 fusionnée avec une étiquette. Ces constructions seront surexprimées de façon stable dans des suspensions cellulaires d'*Arabidopsis*. A ce stade, le profil de MPTs des peptides sera évalué par SM. Les protéines en interactions seront purifiées, séparées et identifiées par SM.

L'avantage de cette approche est la possibilité d'isoler les complexes protéiques à partir d'un contexte *in vivo*. Le rendement de purification de ces complexes peut être amélioré en utilisant *in vivo* des ponteurs chimiques tels que la formaldéhyde (Rohila et al. 2004). Par contre, un problème majeur sera l'absence de localisation membranaire du peptide. De plus, il faudra évaluer la stabilité cellulaire du peptide et envisager, si nécessaire, de le coupler à une protéine permettant de le stabiliser *in vivo*. D'autre part, seul un pourcentage du peptide sera modifié *in vivo*, ce qui risque d'entraîner l'isolement de protéines en interaction à la fois avec le peptide modifié et non modifié.

6.2.3. Validation des complexes protéiques

Ces approches peuvent conduire à identifier un grand nombre de protéines qu'il est nécessaire de valider de façon biochimique et fonctionnelle. D'autre part, elles sont basées sur l'interaction entre un peptide N-terminal de PIP2;1 et une ou plusieurs autres protéines. Il sera donc nécessaire de valider aussi l'interaction avec l'AQP PIP2;1 entière.

Validation in vitro

Plusieurs types de stratégies seront menées pour valider les interactions. L'utilisation de peptides portant divers degrés de méthylation constitue en soi un contrôle de spécificité d'interaction. Cependant on peut anticiper qu'une protéine puisse interagir avec différents types de peptides mais dans des proportions variées. La quantification de ces proportions constituera donc un critère essentiel de spécificité.

Dans la technique du western-ligand blot, les protéines séparées par électrophorèse et transférées sur membrane, sont incubées en présence de peptides radioactifs. Ces profils autoradiographiques seront comparés quant à la nature du peptide utilisé ainsi qu'aux profils

électrophorétiques issus du pull down et de la chromatographie d'affinité. La technique du BIACORE sera aussi largement utilisée pour valider l'interaction entre peptides et protéines.

Des anticorps pourront être produits contre les protéines d'intérêt. Ces anticorps seront utilisés dans des expériences de co-immunoprécipitation des AQPs sauvage et mutantes surexprimées en suspension cellulaire. L'ensemble de ces opérations sera effectué de façon réciproque.

Dans la technique du Blue Native-PAGE, les protéines solubilisées sont séparées lors d'une première dimension sous forme native puis dans une seconde dimension sous forme dénaturée. Cette technique, récemment utilisée pour l'étude de la MP d'épinard (Kjell et al. 2004), a permis de séparer un complexe protéique majeur de 230 kDa contenant des AQPs. Cette technique sera utilisée à partir d'extraits de cellules surexprimant les PIP2;1-WT ou mutantes. On testera par western-blot la présence des protéines en interaction dans les complexes d'AQP.

Validation in vivo

A plus long terme les interactions protéiques seront validées *in vivo* par des approches de biologie cellulaire. Après étiquetage de l'AQP et des protéines en interaction avec respectivement les protéines CFP et YFP, puis co-expression de ces protéines en cellules, la technique du FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) devrait permettre de valider *in vivo* l'interaction protéique. Cependant, cette technique est encore difficile à mettre en oeuvre et peu de données sont disponibles dans la littérature à ce sujet. On pourra donc aussi utiliser le « bimolecular fluorescence complementation » (Walter et al. 2004) qui repose sur la reconstitution d'un complexe fluorescent par l'association de protéines en interaction. Ces deux types d'études permettront d'aborder la dynamique cellulaire de l'interaction.

6.2.4. Fonction des protéines en interaction

On peut anticiper que cette approche conduise à identifier en premier lieu d'autres AQPs que PIP2;1. Un tel résultat serait informatif sur la composition des tétramères d'AQPs PIP mais aussi sur le rôle éventuel joué par l'extrémité N-terminale de PIP2;1, notamment la méthylation, dans la composition des tétramères. Ceci reste cependant très hypothétique.

La nature des autres protéines en interaction orientera sur leur fonction et donc sur les études ultérieures. Compte tenu des résultats obtenus chez les AQPs animales, on identifiera probablement des protéines impliquées dans la signalisation et le trafic cellulaire. Ainsi, l'AQP AQP2 interagit directement avec une isoforme d'actine (Noda et al. 2004b) et SPA1, une protéine contenant un domaine PDZ (Noda et al. 2004a). Dans une étude plus globale basée sur l'immunopurification d'AQP2, un complexe de 11 protéines incluant les deux protéines précédentes ainsi que des protéines du cytosquelette a été isolé (Noda et al. 2005). La plupart des protéines identifiées ayant une affinité pour l'actine, leur interaction avec AQP2 est supposée être indirecte, *via* l'actine. Par ailleurs, l'extrémité C-terminale de l'AQP AQP4 interagit directement, par un motif tyrosine, avec une protéine de la machinerie d'internalisation des protéines de la MP (AP2) provoquant ainsi l'endocytose d'AQP4 (Madrid et al. 2001). On peut aussi imaginer caractériser des enzymes modifiantes telles que des phosphatases, des kinases ou des méthyltransférases.

Dans tous les cas, la fonction des partenaires de PIP2;1 sera étudiée par le biais de l'étude de leur localisation subcellulaire et de leur expression tissulaire, déterminées par des stratégies similaires à celles décrites pour les méthyltransférases (§ 6.1.2). Des mutants d'*Arabidopsis* inactivés pour ces gènes seront recherchés et analysés quant à leurs profils de localisation subcellulaire de PIP2;1.

6.3. Intégration des données dans un contexte physiologique

Notre groupe a montré que diverses conditions environnementales telles que le traitement salin des plantes module l'activité des AQPs. L'étude des MPTs suggère que ce traitement induirait une déphosphorylation des AQPs PIP, conduisant ainsi à une baisse d'activité de ces protéines. Ce type d'étude sera mené avec d'autres conditions environnementales connues dans notre groupe pour moduler l'activité des AQPs, telles que l'exposition des plantes à des espèces réactives d'oxygène (ROS) ou à l'acide salicylique. Ces études permettront d'évaluer le rôle de la phosphorylation mais aussi des autres MPTs comme la méthylation dans la régulation des AQPs PIP.

On se servira aussi des données biochimiques issues de la caractérisation des méthyltransférases et des protéines en interaction avec PIP2;1, pour identifier des contextes physiologiques dans lesquels la méthylation est impliquée. On étudiera, en particulier comment ces processus moléculaires peuvent rendre compte de la modulation du transport

racinaire d'eau par les stress environnementaux décrits précédemment. L'étude de leur profil d'expression tant au niveau ARNm que protéine devrait être informatif quant à leur implication dans la réponse à l'environnement. On disposera aussi de plusieurs mutants, de méthyltransférases et de protéines interagissant avec PIP2;1 qu'il s'agira alors de caractériser du point de vue de leur capacité de transport d'eau en conditions environnementales normales et stressantes.

6.4. Conclusion – Perspectives

D'un point de vue de la *biochimie des AQPs*, l'ensemble des études que j'ai menées ont mis en évidence de nouveaux mécanismes de régulation, dont certains impliquent la méthylation N-terminale. Cette MPT ne module pas l'activité de transport de l'AQP mais semble plutôt interférer avec son adressage vers la MP, voire même sa stabilité. Ces hypothèses seront examinées en détail dans le cadre d'un projet mené au laboratoire par D.-T. Luu sur la régulation de la biogenèse des AQPs et de leur relocalisation en fonction de divers stimuli. En complément de ces études, le projet que je compte développer sur les méthyltransférases et les protéines en interaction avec les AQPs, devrait fournir des hypothèses et des outils originaux pour appréhender la régulation de l'adressage des AQPs.

La phosphorylation est une autre MPT identifiée chez les AQPs qui est certes moins originale que la méthylation. L'originalité de notre approche réside dans la description d'une diphosphorylation de l'isoforme PIP2;1 et d'une triphosphorylation de PIP2;4, et de leur déphosphorylation partielle par un traitement salin des plantes. De nombreux efforts restent cependant à fournir pour élucider la signification fonctionnelle de ces phosphorylations. Des résultats préliminaires suggèrent que la phosphorylation de PIP2 ;1 pourrait aussi moduler l'adressage de l'AQP à la MP ce qui constitue un rôle nouveau pour la phosphorylation C-terminale d'AQPs chez les plantes.

Une question soulevée par cet inventaire de MPTs concerne les interactions mutuelles entre ces modifications, comme cela est documenté chez les histones. Dans ce cas, phosphorylation, méthylation et acétylation sont interdépendantes et induisent des niveaux distincts d'organisation de la chromatine. Par ailleurs il reste à déterminer comment les MPTs des PIPs interfèrent avec la régulation de ces AQPs par le calcium et les protons, deux types d'effecteurs qui provoquent la fermeture du canal. En particulier, le calcium pourrait, au delà de ses effets directs, moduler certaines MPTs comme la phosphorylation.

D'un point de vue de la *physiologie de la plante*, il est établi que les conditions environnementales et hormonales modulent de manière très fine l'activité des AQPs racinaires (Javot and Maurel 2002). Le traitement salin et l'anoxie ont été largement étudié au laboratoire mais d'autres effecteurs comme les ROS (travail de thèse de Y. Boursiac) et les éliciteurs (collaboration avec Biotech Marines) sont déjà identifiés dans notre groupe comme des modulateurs de l'activité des AQPs. Toutefois, dans les deux derniers cas, les bases moléculaires de ces régulations restent inconnues. Les stratégies développées dans le cadre du traitement salin seront adaptées en priorité à ces nouveaux traitements dans le but de fournir des données sur le couplage entre la fonction des AQPs et les processus de signalisation activés en réponse aux stimuli environnementaux. De façon plus ciblée, on évaluera aussi comment la manipulation des facteurs moléculaires identifiés (méthyltransférase, protéines en interaction) peut moduler le développement de la plante dans ces conditions environnementales.

7. Conclusion

Une approche protéomique membranaire classique vise à faire l'inventaire exhaustif des protéines exprimées dans une membrane. Le séquençage par spectrométrie de masse en tandem permet maintenant d'identifier une protéine même peu abondante à partir d'un nombre limité de peptides. Plus précisément, ceci signifie qu'une protéine peut être identifiée, malgré une faible couverture de sa séquence. En conséquence, ce type d'approche à haut débit peut passer à côté de nombreuses MPTs. En ce sens, l'étude menée sur les AQPs d'*Arabidopsis* constitue une étude protéomique originale: parce qu'elle a été focalisée sur un ensemble de protéines aux propriétés biochimiques spécifiques, cette étude a permis de combiner l'inventaire des AQPs de la MP à celui de leurs MPTs. Les résultats obtenus démontrent l'intérêt d'une telle approche puisqu'elle a permis de mettre en évidence de nouveaux mécanismes régulateurs des protéines. Cette étude s'est heurtée cependant aux difficultés inhérentes au manque de solubilité des protéines transmembranaires et nécessite encore des optimisations de façon à augmenter la couverture de séquence.

Notons toutefois que l'inventaire systématique des MPTs n'est envisageable que pour un nombre limité de produits de gènes et à ce jour, sa généralisation à l'étude d'un protéome membranaire apparaît techniquement difficile. De fait, dans la plupart des études protéomiques à haut débit actuelles, les principales MPTs étudiées sont la phosphorylation et la glycosylation. Nos résultats suggèrent que la méthylation pourrait contribuer à moduler la localisation subcellulaire des AQPs. Dans la mesure où ce rôle de la méthylation pourra être généralisé à d'autres protéines membranaires, il serait intéressant de la prendre en considération dans les approches protéomiques à haut débit. Dans le cas de la phosphorylation, de récents développements techniques en spectrométrie de masse (perte de neutre, balayage sur ion d'intérêt) permettent de dresser un inventaire des peptides phosphorylés. Nous pensons qu'il est envisageable d'adapter ces technologies à l'étude de la méthylation. Si plus de données peuvent être obtenues, l'analyse *in silico* des protéines méthylées permettra peut-être par la suite de dégager des motifs caractéristiques de sites de méthylation comme le motif RGG qui constitue la cible d'arginine méthyltransférases (McBride and Silver 2001).

La signification des approches protéomiques membranaires à haut débit est souvent limitée par l'absence de la localisation subcellulaire des protéines identifiées. Il est pourtant important de considérer ce problème puisque des protéines membranaires peuvent être adressées à différents compartiments subcellulaires (Silva-Filho 2003; Marmagne et al. 2004). De plus, nos résultats suggèrent que le degré de modification d'une protéine transmembranaire peut moduler sa localisation subcellulaire. Il existe donc une dynamique

des pools de protéines membranaires qu'il est difficile d'appréhender par une simple analyse protéomique. Il nous apparaît donc nécessaire de compléter ces analyses par des études de biologie cellulaire à l'aide de fusions des protéines à la GFP par exemple. Ces études devront aussi s'appuyer sur des analyses fonctionnelles, comme la recherche de facteurs modulant la localisation subcellulaire. Ce constat démontre qu'il est essentiel de trouver un juste équilibre entre approches biochimiques et fonctionnelles au risque de mal interpréter la localisation et donc la fonction d'une protéine membranaire.

Ce point est d'autant plus critique que le développement des techniques de spectrométrie de masse permet d'identifier de plus en plus de MPTs. Dans l'avenir il faudra intégrer pour une même protéine, le rôle de plusieurs MPTs pouvant potentiellement interagir entre elles. Parce que la mutagenèse des sites modifiés ne permet pas d'évaluer de manière simple le rôle respectif de chaque MPT, il devient important de quantifier de manière précise chacune de ces MPTs dans différents compartiments cellulaires ou dans différents contextes physiologiques. Cet objectif constitue maintenant un enjeu majeur dans les approches de protéomique fonctionnelle. En ce sens, le projet « méthylation » requiert l'ensemble de ces composantes que sont une analyse protéomique des MPTs, la quantification des MPTs en réponse aux stress, la dynamique cellulaire par le biais de fusions GFP et l'étude de mutants de sites modifiés. Ce type de programme permet d'offrir de façon originale une formation scientifique par la recherche.

8. Références bibliographiques

- Barile, M., T. Pisitkun, M.J. Yu, C.L. Chou, M.J. Verbalis, R.F. Shen, and M.A. Knepper. 2005. Large Scale Protein Identification in Intracellular Aquaporin-2 Vesicles from Renal Inner Medullary Collecting Duct. *Mol. Cell. Proteomics* **4**: 1095-1106.
- Boursiac, Y., S. Chen, D.-T. Luu, M. Sorieul, N. van den Dries, and C. Maurel. 2005. Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiol.* **139**: 790-805.
- Brown, D. 2003. The ins and outs of aquaporin-2 trafficking. *Am. J. Physiol. (Renal Physiol.)* **284**: F893-F901.
- Chen, R., I.M. Fearnley, D.N. Palmer, and J.E. Walker. 2004. Lysine 43 is trimethylated in subunit c from bovine mitochondrial ATP synthase and in storage bodies associated with batten disease. *J. Biol. Chem.* **279**: 21883-21887.
- Chevallet, M., V. Santoni, A. Poinas, D. Rouquié, A. Fuchs, S. Kieffer, M. Rossignol, J. Lunardi, J. Garin, and T. Rabilloud. 1998. New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **19**: 1901-1909.
- Collazo, E., J.F. Couture, S. Bulfer, and R.C. Trievel. 2005. A coupled fluorescent assay for histone methyltransferases. *Anal. Biochem.* **342**: 86-92.
- Delarue, M., V. Santoni, M. Caboche, and C. Bellini. 1997. Cristal mutations in *Arabidopsis* confer a genetically heritable, recessive, hyperhydric phenotype. *Planta* **202**: 51-61.
- Djordjevic, S., P.N. Goudreau, Q. Xu, A.M. Stock, and A.H. West. 1998. Structural basis for methylesterase CheB regulation by a phosphorylation-activated domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 1381-1386.
- Dziembowski, A. and B. Séraphin. 2004. Recent developments in the analysis of protein complexes. *FEBS Let.* **556**: 1-6.
- Feiler, H., T. Desprez, V. Santoni, J. Kronenberger, M. Caboche, and J. Traas. 1995. The higher plant *Arabidopsis thaliana* encodes a functional CDC48 homologue which is highly expressed in dividing and expanding cells. *EMBO J.* **14**: 5626-5637.
- Fetter, K., V. Van Wilder, M. Moshelion, and F. Chaumont. 2004. Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. *The Plant Cell* **16**: 215-228.
- Fu, D., A. Libson, L.J.W. Miercke, C. Weitzman, P. Nollert, J. Krucinski, and R.M. Stroud. 2000. Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science* **290**: 481-486.
- Gantet, P., F. Masson, O. Domergue, M. Marquis-Mention, G. Bauw, D. Inze, M. Rossignol, and B.T. de la Serve. 1996. Cloning of a cDNA encoding a developmentally regulated 22 kDa polypeptide from tobacco leaf plasma membrane. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **40**: 469-477.

- Giglione, C., A. Boularot, and T. Meinnel. 2004. Protein N-terminal methionine excision. *Cell Mol. Life Sci.* **61**: 1455-1474.
- Graham, T. R. 2004. Membrane targeting: getting Arl to the Golgi. *Curr. Biol.* **14**: R483-R485
- Guenther, J.F., N. Chanmanivone, M.P. Galetovic, I.S. Wallace, J.A. Cobb, and D.M. Roberts. 2003. Phosphorylation of soybean nodulin 26 on serine 262 enhances water permeability and is regulated developmentally and by osmotic signals. *Plant Cell* **15**: 981-991.
- Hanton, S.L., L. Renna, L.E. Bortolotti, L. Chatre, G. Stefano, and F. Brandizzi. 2005. Diacidic motifs influence the export of transmembrane proteins from the endoplasmic reticulum in plant cells. *Plant Cell* **17**: 3081-3093.
- Hendricks, G., M. Koudijs, B.W.M. van Balkom, V. Oorschot, J. Klumperman, P.M.T. Deen, and P. van der Sluijs. 2004. Glycosylation is important for cell surface expression of the water channel aquaporin-2 but is not essential for tetramerization in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **279**: 2975-2983.
- Huebert, R.C., P.L. Splinter, F. Garcia, R.A. Marinelli, and N.F. LaRusso. 2002. Expression and localization of aquaporin water channels in rat hepatocytes. Evidence for a role in canalicular bile secretion. *J. Biol. Chem.* **277**: 22710-22717.
- Ishikawa, Y., H. Lida, and H. Ishida. 2002. The muscarinic acetylcholine receptor-stimulated increase in aquaporin-5 levels in the apical plasma membrane in rat parotid acinar cells is coupled with activation of nitric oxide/cGMP signal transduction. *Mol. Pharmacol.* **61**: 1423-1434.
- Javot, H. and C. Maurel. 2002. The role of aquaporins in root water uptake. *Annals of botany* **90**: 301-313.
- Johansson, I., M. Karlsson, V.K. Shukla, M.J. Chrispeels, C. Larsson, and P. Kjellbom. 1998. Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell* **10**: 451-459.
- Kamsteeg, E.-J., I. Heijnen, C.H. van Os, and P.M.T. Deen. 2000. The subcellular localization of an aquaporin-2 tetramer depends on the stoichiometry of phosphorylated and non phosphorylated monomers. *J. Cell. Biol.* **151**: 919-929.
- Kjell, J., A.G. Rasmusson, H. Larsson, and S. Widell. 2004. Protein complexes of the plant plasma membrane resolved by blue native page. *Physiol. Plantarum* **121**: 546-555.
- Kluck, R.M., L.M. Ellerby, H.M. Ellerby, S. Naiem, M.P. Yaffe, E. Margoliash, D. Bredesen, A.G. Mauk, F. Sherman, and D.D. Newmeyer. 2000. Determinants of cytochrome *c* pro-apoptotic activity. The role of lysine 72 trimethylation. *J. Biol. Chem.* **275**: 16127-16133.
- Larsson, C., I.M. Moller, and S. Widell. 1990. *An introduction to the plant plasma membrane - its molecular composition and organization*. Springer-Verlag, Berlin.
- Leitch, V., P. Agre, and L.S. King. 2001. Altered ubiquitination and stability of aquaporin-1 in hypertonic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 2894-2898.

- Lichty, J.J., J.L. Malecki, H.D. Agnew, D.J. Michelson-Horowitz, and S. Tan. 2005. Comparison of affinity tags for protein purification. *Prot. Expr. Purif.* **41**: 98-105.
- Logan, D.C., O. Domergue, B. Teyssendier de la Serve, and M. Rossignol. 1997. A new family of plasma membrane polypeptides differentially regulated during plant development. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **43**: 1051-1062.
- Lopez, F., C. Pichereaux, O. Burler-Schiltz, L. Pradayrol, B. Monsarrat, and J.-P. Estève. 2003. Improved sensitivity of biomolecular interaction analysis mass spectrometry for the identification of interacting molecules. *Proteomics* **3**: 402-412.
- Lusser, A. 2002. Acetylated, methylated, remodeled: chromatin states for gene regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 437-443.
- Madrid, R., S. Le Maout, M.-B. Barrault, K. Janvier, S. Benichou, and J. Mérot. 2001. Polarized trafficking and surface expression of the AQP4 water channel are coordinated by serial and regulated interactions with different clathrin-adaptator complexes. *EMBO J.* **20**: 7008-7021.
- Malmqvist, M. and M. Karlsson. 1997. Biomolecular interaction analysis: affinity biosensor technologies for functional analysis of proteins. *Curr. Op. Chem. Biol.* **1**: 378-383.
- Marinelli, R.A., P.S. Tietz, L.D. Pham, L. Rueckert, P. Agre, and N.F. LaRusso. 1999. Secretin induces the apical insertion of aquaporin-1 water channels in rat cholangiocytes. *Am. J. Physiol. (Gastroint. Liver Physiol.)* **276**: G280-G286.
- Marmagne, A., M.A. Rouet, M. Ferro, N. Rolland, C. Alcon, J. Joyard, J. Garin, H. Barbier-Brygoo, and G. Ephritikhine. 2004. Identification of new intrinsic proteins in *Arabidopsis* plasma membrane proteome. *Mol. Cell. Proteomics* **3**: 675-691.
- Maurel, C. and M.J. Chrispeels. 2001. Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. *Plant Physiol.* **125**: 135-138.
- McBride, A.E. and P.A. Silver. 2001. State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell* **106**: 5-8.
- Murata, K., K. Mitsuoka, T. Hirai, T. Walz, P. Agre, J.B. Heymann, A. Engel, and Y. Fujiyoshi. 2000. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* **407**: 599-605.
- Németh-Cahalan, K.L., K. Kalman, and J.E. Hall. 2004. Molecular basis of pH and Ca²⁺ regulation of aquaporin water permeability. *J. Gen. Physiol.* **121**: 573-580.
- Noda, Y., S. Horikawa, T. Furukawa, K. Hirai, Y. Katayama, T. Asai, M. Kuwahara, K. Katagiri, T. Kinashi, M. Hattori, N. Minato, and S. Sasaki. 2004a. Aquaporin-2 trafficking is regulated by PDZ-domain containing protein SPA-1. *Febbs Let.* **568**: 139-145.
- Noda, Y., S. Horikawa, Y. Katayama, and S. Sasaki. 2004b. Water channel aquaporin-2 directly binds to actin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**: 740-745.
- . 2005. Identification of a multiprotein "motor" complex binding to water channel aquaporin-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**: 1041-1047.

- Poledova, B. and F. Sherman. 2003. N-terminal acetyltransferases and sequence requirements for N-terminal acetylation of eukaryotic proteins. *J. Mol. Biol.* **325**: 595-622.
- Rigaut, G., A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann, and B. Seraphin. 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotech.* **17**: 1030-1032.
- Rivas, S., T. Romeis, and J.D. Jones. 2002. The Cf-9 disease resistance protein is present in an approximately 420-kilodalton heteromultimeric membrane-associated complex at one molecule per complex. *Plant Cell* **14**: 689-702.
- Rohila, J.S., M. Chen, R. Cerny, and M.E. Fromm. 2004. Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. *Plant J.* **38**: 172-181.
- Rossignol, M., V. Santoni, J.M. François, and G. Vansuyt. 1992. Changing membrane sensitivity to auxin during plant development. In *Progress Plant Growth Regul.* (ed. C.M. Karszen, L.C. VanLood, and D. Vreugdenhil). Kluwer Academic.
- Rubio, V., Y. Shen, Y. Saijo, Y. Liu, G. Gusmaroli, S.P. Dinesh-Kumar, and X.W. Deng. 2005. An alternative tandem affinity purification strategy applied to *Arabidopsis* protein complex isolation. *Plant J.* **41**: 767-778.
- Santoni, V., C. Bellini, and M. Caboche. 1994. Use of two-dimensional protein-pattern analysis for the characterization of *Arabidopsis thaliana* mutants. *Planta* **192**: 557-566.
- Santoni, V., M. Delarue, M. Caboche, and C. Bellini. 1997. A comparison of two-dimensional electrophoresis data with phenotypical traits in *Arabidopsis* leads to the identification of a mutant (*cri1*) that accumulates cytokinins. *Planta* **202**: 62-69.
- Santoni, V., P. Gerbeau, H. Javot, and C. Maurel. 2000a. The high diversity of aquaporins reveals novel facets of plant membrane functions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**: 476-481.
- Santoni, V., S. Kieffer, F. Masson, D. Desclaux, and T. Rabilloud. 2000b. Membrane proteomics: use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties. *Electrophoresis* **21**: 3329-3344.
- Santoni, V., M. Molloy, and T. Rabilloud. 2000c. Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis* **21**: 1054-70.
- Santoni, V., P. Dumas, D. Rouquié, M. Mansion, T. Rabilloud, and M. Rossignol. 1999. Large scale characterization of plant plasma membrane proteins. *Biochimie* **81**: 655-661.
- Santoni, V., D. Rouquié, P. Dumas, M. Mansion, M. Boutry, H. Degand, P. Dupree, L. Packman, J. Sherrier, T. Prime, G. Bauw, E. Posada, P. Rouzé, Dehais P, I. Sahnoun, I. Barlier, and M. Rossignol. 1998. Use of a proteome strategy for tagging proteins present at the plasma membrane. *Plant J.* **16**: 633-641.
- Santoni, V., G. Vansuyt, and M. Rossignol. 1990. Differential auxin sensitivity of proton translocation by plasma membrane H⁺-ATPase from tobacco leaves. *Plant Sci.* **68**: 33-38.

- . 1991. The changing sensitivity to auxin of the plasma membrane H⁺-ATPase: relationship between plant development and ATPase content of membranes. *Planta* **185**: 227-232.
- . 1993. Indoleacetic acid pretreatment of tobacco plants *in vivo* increases the *in vitro* sensitivity to auxin of the plasma membrane H⁺-ATPase from leaves and modifies the polypeptide composition of the membrane. *FEBS Lett.* **326**: 17-20.
- Santoni, V., J. Vinh, D. Pflieger, N. Sommerer, and C. Maurel. 2003. A proteomic study reveals novel insights into the diversity of aquaporin forms expressed in the plasma membrane of plant roots. *Biochem. J.* **373**: 289-296.
- Silva-Filho, M.C. 2003. One ticket for multiple destinations: dual targeting of proteins to distinct subcellular locations. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **6**: 589-595.
- Simms, S.A. and K. Subbaramaiah. 1991. The kinetic mechanism of S-adenosyl-L-methionine: glutamylmethyltransferase from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **266**: 12741-12746.
- Tournaire-Roux, C., M. Sutka, H. Javot, E. Gout, P. Gerbeau, D.-T. Luu, R. Bligny, and C. Maurel. 2003. Gating of aquaporins by cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress. *Nature* **425**: 393-397.
- van Balkom, B.W.M., M.P.J. Graat, M. van Raak, E. Hofman, P. van der Sluijs, and P.M.T. Deen. 2004. Role of cytoplasmic termini in sorting and shuttling of the aquaporin-2 water channel. *Am. J. Physiol. (Cell. Physiol.)* **286**: C372-C379.
- van Balkom, B.W.M., P.J. Savelkoul, D. Markovich, E. Hofman, S. Nielsen, P. van der Sluijs, D. Brown, and P.M.T. Deen. 2002. The role of putative phosphorylation sites in the targeting and shuttling of the aquaporin-2 water channel. *J. Biol. Chem.* **277**: 41473-41479.
- Vera-Estrella, R., B.J. Barkla, H.J. Bonhert, and O. Pantoja. 2004. Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. *Plant Physiol.* **135**: 2318-2329.
- Walter, M., C. Chaban, K. Schutze, O. Batistic, K. Weckermann, C. Nake, D. Blazevic, C. Grefen, K. Schumacher, C. Oecking, K. Harter, J. Kudla, J. 2004. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J.* **40**: 428-438
- Witte, C.P., L.D. Noel, J. Gielbert, J.E. Parker, and T. Romeis. 2004. Rapid one-step protein purification from plant material using the eight-amino acid StrepII epitope. *Plant Mol. Biol.* **55**: 135-147.
- Wu, C.C. and J.R. Yates. 2003. The application of mass spectrometry to membrane proteomics. *Nature Biotech.* **21**: 262-267.
- Wysocka, J., T. Swigut, T.A. Milne, Y. Dou, X. Zhang, A.L. Burlingame, R.G. Roeder, A.H. Brivanlou, and C.D. Allis. 2005. WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell* **121**: 859-872.
- Zelenina, M., A.A. Bondar, S. Zelenin, and A. Aperia. 2003. Nickel and extracellular acidification inhibit the water permeability of human aquaporin-3 in lung epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **278**: 30037-30043.

Zhang, Y. and D. Reinberg. 2001. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* **15**: 2343-2360.

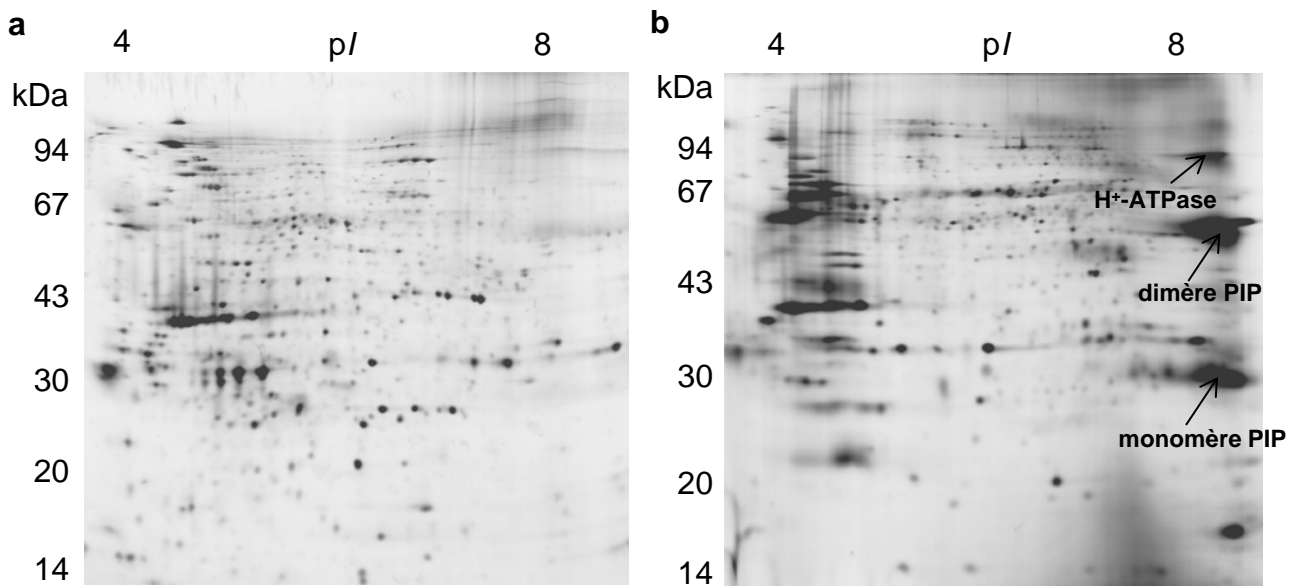


Fig. 1 Protéome de la membrane plasmique de feuille d'*Arabidopsis* avant (a) et après (b) un traitement chaotrope (4 M urée) et alcalin (20 mM NaOH) de la fraction membranaire.

Les protéines sont solubilisées en présence de 7 M urée, 2 M thiourée et 2% du détergent ASB14. L'électrophorèse bidimensionnelle est réalisée sur un gel portant un gradient de pH immobilisé (IPG) non linéaire (3-10). Les gels sont colorés au Bleu G colloïdal.

Les flèches indiquent un fort enrichissement en protéines hydrophobes que sont les aquaporins PIP (monomère et dimère) et la H⁺-ATPase, après traitement de la MP par l'urée et la soude. Ces protéines ont été identifiées sur la base d'une détection immunologique et d'une analyse en spectrométrie de masse.

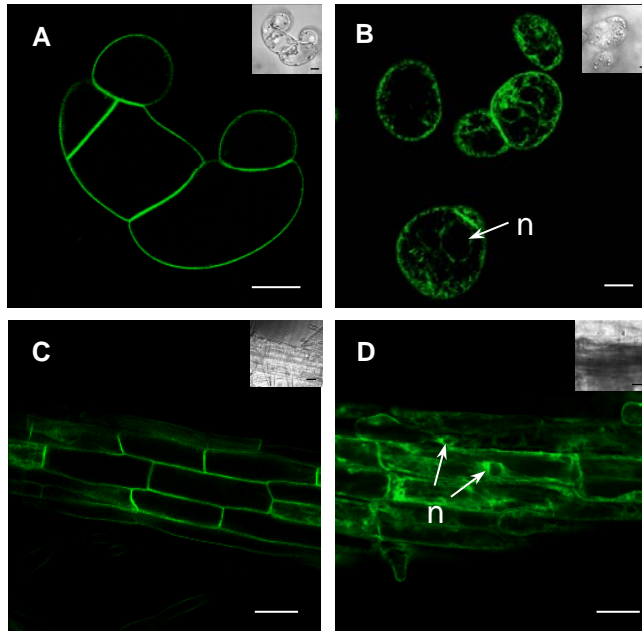


Fig. 2 Localisation subcellulaire de la protéine sauvage PIP2;1::GFP (A, C) et mutante PIP2;1-E6A::GFP (B, D) exprimée dans des suspensions cellulaires (A, B) ainsi qu'en plante (C, D).

Les images obtenues par microscopie confocale montrent que la protéine mutante PIP2;1-E6A s'accumule dans le réticulum endoplasmique alors que la protéine sauvage s'accumule dans la MP (Santoni *et al.* soumis).

n: noyau.

Echelle: 20 μm (racine) et 50 μm (suspension cellulaire).

Tableau 1. Caractérisation par MALDI-TOF MS et ESI-MS/MS d'AQPs de la membrane plasmique de racine

Masses mesurées (Da)	Séquence peptidique prédite	Sequence peptidique déterminée	Modification	Isoforme	Position dans la séquence
886.5	KWSFYR			PIP2;1 / PIP2;6	34-39 / 33-38
1069.5	SFGAAVIYNK	SFGAAVI/LYNK		PIP2;1 / PIP2;2	232-241
1017.5	VGANKFPER			PIP1;1/PIP1;2/ PIP1;3/PIP1;4	10-18
1122.5	AFQSSYYTR	AFQSSYYTR		PIP2;1 / PIP2;4	145-153
1134.6	MEGKEEDVR + 42 Da	MEGKEEDVR	acM1	PIP1;1/PIP1;2/ PIP1;3/PIP1;4	1-9
1136.5	AFQSSYYDR	AFQSSYYDR		PIP2;2	143-151
1232.6	ALGSFSGSFGSFR			PIP2;4	277-288
1234.6	QPIG TSAQSTDK			PIP1;4	19-30
1234.6	DVEGPEGFQTR			PIP2;2	4-14
1292.7	SLGAAIHNKDK			PIP2;5	231-242
1340.6	DLDVNESGPPAAR			PIP2;4	4-16
1404.7	DVEAVPGEFQTR	DVEAVPGEFQTR		PIP2;1	4-16
1418.7	DVEAVPGEFQTR + 14 Da		1me	PIP2;1	4-16
1433.7	AKDVEGPEGFQTR	tag PEGFQTR	M1 clivée	PIP2;2	2-14
1447.7	AKDVEGPEGFQTR +14 Da		M1 clivée + 1me	PIP2 ;2	2-14
1461.7	AKDVEGPEGFQTR +28 Da		M1 clivée + 2me	PIP2 ;2	2-14
1475.7	AKDVEGPEGFQTR + 42 Da	AKDVEGPEGFQTR	M1 clivée + _{2me} K3 + 1me	PIP2;2	2-14
1537.8	QPIG TSAQSDKDYK			PIP1;1/PIP1;2	19-32
1539.8	AKDL DVNESGPPAAR		M1 clivée	PIP2;4	2-16
1603.8	AKDVEAVPGEFQTR	AKDVEGPEGFQTR	M1 clivée	PIP2;1	2-16
1617.8	AKDVEAVPGEFQTR + 14 Da		M1 clivée + 1me	PIP2;1	2-16
1631.8	AKDVEAVPGEFQTR + 28 Da	AKDVEAVPGEFQTR	M1 clivée + _{2me} K3	PIP2;1	2-16
1638.8	QPIG TSAQSTDKDYK			PIP1;4	19-33
1645.8	AKDVEAVPGEFQTR + 42 Da	AKDVEAVPGEFQTR	M1 clivée + _{2me} K3 + _{1me} E6	PIP2;1	2-16
1660.8	FPERQPIG TSAQSDK			PIP1;1/PIP1;2	15-29
1869.9	DYVDPPPAPLLDMGELK			PIP2;7	16-32
1885.9	TPYNTLGGGANTVADGYSK	tag YNTLGG		PIP2;7	142-160
1872.9	DYQDPPPAPFIDGAELK	DYQDPPPAPFI/LDGAELK		PIP2;1	17-33
1960.9	DYKEPPPAPFFEPGELK	tag APFFE		PIP1;5	31-47
1980.0	NIAIGGVQEEVYHPNALR	tag I/LAI/LGGV		TIP1;2	5-22
2000.9	DYQDPPPAPFIDGAELKK	DYQDPPPAPFI/LDGAEL/IKK		PIP2;1	17-34
2067.0	DYKDPPPAPFFDMEELR			PIP2;4	17-33
2096.9	DYEDPPPTPFFDADELTK	DYEDPPPTPFFDADEL/ITK		PIP2;2	15-32
2313.2	EPPPAPLFEPGELASWSFWR			PIP1;2	33-52
2363.1	EPPPAPFFEPGELSSWSFWR	EPPPAPFFEPGELSSWSFWR		PIP1;1	33-52
2378.1	GFQPNPYQTLGGGANTVAHGYTK			PIP1;3	152-174

Ce tableau représente les peptides identifiés après digestion trypsique de la bande à 28 kDa d'une fraction de MP de racine (Santoni et al. 2003, Santoni et al. soumis). Les masses $[M+H]^+$ des peptides sont indiquées dans la 1^{ère} colonne. La séquence prédite, déterminée par SM en tandem, le type de modification, le nom de l'isoforme, et la position dans la séquence sont indiqués dans les colonnes suivantes.

acM1: acetyl Met1; 1me: monomethyl; 2me: dimethyl; _{1me}E6: monomethyl Glu6; _{2me}K3: dimethyl Lys3.