



**HAL**  
open science

# Les Canaux Ioniques - Fascination & Complexité

Sabine Zimmermann

► **To cite this version:**

Sabine Zimmermann. Les Canaux Ioniques - Fascination & Complexité. Biologie végétale. 2010. tel-02815208

**HAL Id: tel-02815208**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02815208>**

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

***Les Canaux Ioniques –  
Fascination & Complexité***

**Dossier présenté à l'Université Montpellier II**

**En vue de l'obtention du diplôme  
d'habilitation à diriger des recherches  
2009**

**Discipline: Physiologie Moléculaire des Plantes**

**Par**

***Sabine ZIMMERMANN***

**Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes  
UMR 5004  
CNRS - INRA - SupAgro - Université Montpellier II**



## Sommaire

<i>Curriculum vitae</i> .....	5
<b>PUBLICATIONS &amp; COMMUNICATIONS</b> .....	7
<b>ENCADREMENT &amp; Animations scientifiques</b> .....	16
<b>A TRAVAUX EFFECTUES</b> .....	21
<b>Les canaux ioniques végétaux – caractérisation <i>in vivo</i> &amp; moléculaire &amp; Analyse de systèmes de transport au sein de la symbiose</b>	
Résumé .....	21
<b>I Biophysiques, électrophysiologie, patch-clamp (Berlin)</b> .....	22
I.1. Biophysiques & caractérisation de surface de biomatériaux.....	22
I.2. Les canaux ioniques et leur caractérisation par la méthode du patch-clamp.....	22
I.3. Thèse: <i>Etude en patch-clamp de différents types cellulaires et des effets de la 4-aminopyridine et de solvants organiques sur la membrane</i> .....	23
<b>II Canaux ioniques dans les cellules de la plante &amp; leur caractérisation <i>in vivo</i> (Göttingen &amp; Gif)</b> .....	25
II.1. Identification et caractérisation d'un canal cationique perméable à Ca <sup>2+</sup> impliqué dans un processus d'élicitation – la signalisation.....	25
II.2. Caractérisation de canaux potassiques et anioniques sur protoplastes de tabac.....	27
II.2.1. Identification d'un canal K <sup>+</sup> rectifiant sortant chez les protoplastes de tabac en culture.....	27
II.2.2. Caractérisation du canal anionique TSAC des cellules de tabac en culture.....	28
II.3. Caractérisation d'un canal anionique exprimé dans les cellules épidermiques de l'hypocotyle d' <i>Arabidopsis</i> .....	29
<b>III Identification moléculaire de canaux végétaux &amp; leur caractérisation dans les systèmes d'expression hétérologue (Golm &amp; Montpellier)</b> .....	32
III.1. Les canaux potassiques végétaux de type <i>Shaker</i> .....	32
III.1.1. Identification de canaux de type <i>Shaker</i> chez la pomme de terre et la tomate.....	35
III.1.1.1. Les canaux KST1 et SKT1, 2 & 3 identifiés chez la pomme de terre	35
III.1.1.2. Le canal LKT1 identifié chez la tomate.....	37
III.1.2. Révélation des propriétés fonctionnelles du dernier canal de type <i>Shaker</i> , AKT5, chez <i>Arabidopsis thaliana</i> (Montpellier) .....	38
III.1.2.1. Caractérisation fonctionnelle du canal AKT5 par expression dans les protoplastes du tabac .....	39
III.1.2.2. Caractérisation du mutant ko <i>akt5</i> .....	39
III.2. Relation structure-fonction des canaux de type <i>Shaker</i> : rôle du domaine C-terminal.....	42
III.3. Identification de nouvelles familles de canaux potassiques chez <i>Arabidopsis</i> .....	45
III.3.1. Deux nouvelles familles de canaux K <sup>+</sup> identifiées chez <i>Arabidopsis</i> ...	45
III.3.2. Le canal KCO1 (TPK1) et son expression dans les cellules d'insecte...	45

III.4. Recherche de nouvelles familles de canaux de pomme de terre par expression fonctionnelle dans les ovocytes de <i>Xenopus laevis</i> .....	47
<b>IV Transport &amp; Symbiose (Montpellier)</b> .....	<b>48</b>
IV.1. Contexte du programme sur la symbiose ectomycorhizienne .....	48
IV.2. La banque d'ADNc et d'ESTs du champignon <i>Hebeloma cylindrosporum</i> comme ressource pour identifier des transporteurs membranaires.....	49
IV.3. Identification des systèmes de transport potassique.....	51
IV.3.1. Identification et analyse d'un transporteur de type Trk.....	51
IV.3.2. Identification et analyse d'une famille de canaux de type <i>Shaker</i> .....	54
<b>B PROJET DE RECHERCHE</b> .....	<b>57</b>
<b>V Symbiose ectomycorhizienne - mécanismes des échanges entre champignon et plante hôte</b> .....	<b>57</b>
Résumé du projet.....	57
V.1. La symbiose ectomycorhizienne & le contexte du projet.....	58
V.2. Objectifs du projet sur la symbiose ectomycorhizienne .....	60
V.3. Analyse du transport de K <sup>+</sup> .....	62
V.4. Analyse du transport de sucre .....	63
V.5. Localisation de systèmes de transport au sein de la symbiose.....	64
V.5.1. Approches utilisant la transgénèse .....	65
V.5.2. Hybridisation <i>in situ</i> .....	65
V.6. Analyse du rôle de gènes candidats au sein de la symbiose par génétique inverse .....	66
V.7. Conclusions & Perspectives .....	67
<b>Annexe 1</b>	
<b>VI En continuité : Caractérisation moléculaire des canaux végétaux, AKT5 le dernier canal de type <i>Shaker</i> chez <i>Arabidopsis</i></b> .....	<b>68</b>
<b>Annexe 2</b>	
<b>VII Retour à l'ancien rêve: Identification d'une conductance anionique à la membrane plasmique</b> .....	<b>70</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>72</b>
<b>Acknowledgements</b> .....	<b>83</b>

## *Curriculum vitae*

---



### **Sabine Zimmermann**

Nationalité allemande

Née Lauckner, le 24 novembre 1962, à Berlin, Allemagne

Divorcée en 1988

1 enfant (Josephine, née le 27 avril 1988)

**Adresse personnelle:** 137 rue Louis Martin Berthoud  
Les Jardins de la Palmeraie  
34080 Montpellier

**Adresse du Laboratoire :** Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes  
UMR 5004 CNRS/INRA/SupAgro/UMII  
Place Viala, Campus SupAgro-INRA, Bât. 7  
34060 Montpellier Cedex 1

### **1 Etudes / Thèse**

Formation en biologie, physique et biophysique

1991 Doctorat d'Université : *Doctor rerum naturalium*  
Spécialité Biophysique, Université Humboldt de Berlin

1987-1990 Thèse en Biophysique: "Etude en patch-clamp de différents types cellulaires et des effets de la 4-aminopyridine et de solvants organiques sur la membrane", Université Humboldt de Berlin, Département de Biologie-Biophysique, Directeur de Thèse : Dr. E. Donath

1987 Diplôme de Biophysique, Université Humboldt de Berlin

1982-1987 Etudes en Biophysique / Université Humboldt de Berlin

1981-1982 Contrat dans une équipe de recherche en biophysique sur les biomatériaux, "Charité", Université Humboldt de Berlin

1981 Baccalauréat, Berlin, Allemagne

## 2 Contrats post-doctoraux & Statut actuel

- Depuis 2000 CR1, CNRS, UMR 5004, "Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes", Montpellier, groupe "Canaux Ioniques" (Dr. Hervé Sentenac)  
Projets : "Analyse du répertoire des canaux potassiques et d'un transporteur potassique exprimés chez un champignon ectomycorhizien et des rôles de ces protéines dans la symbiose" & "Le canal potassique AKT6 d'*Arabidopsis thaliana* : Caractérisation fonctionnelle et rôle dans la graine".
- 1995-2000 Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm, Allemagne. Directeur de l'Institut : Pr. Lothar Willmitzer. Contrat de chercheur post-doctoral dans le "Junior Research Group" dirigé par Dr. Bernd Müller-Röber. Sujet : "Identification de canaux potassiques: caractérisation fonctionnelle et relation structure - fonction".
- 1991-1995 CNRS, ISV, Gif-sur-Yvette, groupe du Pr. Jean Guern et du Dr. Hélène Barbier-Brygoo. Sujet : "Caractérisation de canaux anioniques de la membrane plasmique végétale et étude de leurs rôles dans les processus de signalisation cellulaire".
- 1990-1991 Université de Göttingen, Institut de Physiologie de la Plante, groupe du Pr. Rainer Hedrich. Sujet : "Caractérisation d'un canal cationique perméable à  $Ca^{2+}$  impliqué dans l'élicitation chez le couple modèle *Phytophthora sojae* / cellules en culture de *Petroselinum crispum* (persil)".

## PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS

### 1 Publications dans des revues à comité de lecture

#### 1.1. Publications dans le domaine végétal

- (1) M.-V. Tatry, E. El Kassis, R. Lambilliotte, C. Corratgé, I. van Aarle, L.K. Amenc, R. Alary, **S. Zimmermann**, H. Sentenac & C. Plassard (2009) Two differentially regulated phosphate transporters from the symbiotic fungus *Hebeloma cylindrosporum* and phosphorus acquisition by ectomycorrhizal *Pinus pinaster*. *Plant J.* **57**, 1092-1102.
- (2) C. Corratgé, **S. Zimmermann**, R. Lambilliotte, C. Plassard, R. Marmeisse, J.-B. Thibaud, B. Lacombe & H. Sentenac (2007) Molecular and functional characterization of a Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> transporter from the Trk family in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *J. Biol. Chem.* **282**, 26057-26066.
- (3) M. Benjdia, E. Rikirsch, T. Müller, M. Morel, C. Corratgé, **S. Zimmermann**, M. Chalot, W.B. Frommer & D. Wipf (2006) Peptide uptake in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*: Characterization of two di- and tripeptide transporters (HcPTR2A and B). *New Phytol.* **170**, 401-410.
- (4) R. Lambilliotte, R. Cooke, D. Samson, C. Fizames, F. Gaymard, C. Plassard, M.-V. Tatry, C. Berger, M. Laudi, F. Legeai, E. Karsenty, M. Delseny, **S. Zimmermann** & H. Sentenac (2004) Large scale identification of genes in the fungus *Hebeloma cylindrosporum* paves the way to molecular analyses of ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* **164**, 505-513.
- (5) D. Wipf, M. Benjdia, E. Rikirsch, **S. Zimmermann**, M. Tegeder & W.B. Frommer (2003) An expression cDNA library for suppression cloning in yeast mutants, complementation of a yeast his4 mutant and EST analysis from the symbiotic basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum*. *Genome* **46**, 177-181.
- (6) **S. Zimmermann**, S. Hartje, T. Ehrhardt, G. Plesch & B. Müller-Röber (2001) The K<sup>+</sup> channel SKT1 is co-expressed with KST1 in potato guard cells – both channels can co-assemble via their conserved K<sub>T</sub> domaine. *Plant J.* **28**, 517-528.
- (7) S. Hartje, **S. Zimmermann**, D. Klonus & B. Müller-Röber (2000) Functional characterisation of LKT1, a K<sup>+</sup> uptake channel from tomato root hairs, and comparison with the closely related potato inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel SKT1 after expression in *Xenopus* oocytes. *Planta* **210**, 723-731.
- (8) **S. Zimmermann**, T. Ehrhardt, G. Plesch & B. Müller-Röber (1999) Ion channels in plant signalling. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 183-203.
- (9) **S. Zimmermann** & H. Sentenac (1999) Plant ion channels : from molecular structures to physiological functions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 477-482.
- (10) K. Czempinski, N. Gaedeke, **S. Zimmermann** & B. Müller-Röber (1999) Molecular mechanisms and regulation of plant ion channels. *J. Exp. Bot.* **50**, 955-966.

- (11) I. Dreyer, C. Horeau, G. Lemaillet, **S. Zimmermann**, D.R. Bush, A. Rodriguez-Navarro, D. P. Schachtman, E.P. Spalding, H. Sentenac & R.F. Gaber (1999) Identification and characterization of plant transporters using heterologous expression systems. *J. Exp. Bot.* **50**, 1073-1087.
- (12) **S. Zimmermann**, I. Talke, T. Ehrhardt, G. Nast & B. Müller-Röber (1998) Characterization of SKT1, an inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel from potato, by heterologous expression in insect cells. *Plant Physiol.* **116**, 879-890.
- (13) **S. Zimmermann**, J.-M. Frachisse, S. Thomine, H. Barbier-Brygoo & J. Guern (1998) Elicitor-induced chloride efflux and anion channels in tobacco cell suspensions. *Plant Physiol. Biochem.* **36**, 665-674.
- (14) **S. Zimmermann**, T. Nürnberger, J.-M. Frachisse, W. Wirtz, J. Guern, R. Hedrich & D. Scheel (1997) Receptor-mediated activation of a plant Ca<sup>2+</sup>-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2751-2755.
- (15) K. Czempinski, **S. Zimmermann**, T. Ehrhardt & B. Müller-Röber (1997) New structure and function in plant K<sup>+</sup> channels: KCO1, an outward rectifier with a steep Ca<sup>2+</sup>-dependency. *EMBO J.* **16**, 2565-2575.
- (16) T. Ehrhardt, **S. Zimmermann** & B. Müller-Röber (1997) Association of plant K<sub>in</sub><sup>+</sup> channels is mediated by conserved C-termini and does not affect subunit assembly. *FEBS Lett.* **409**, 166-170.
- (17) T. Nürnberger, W. Wirtz, D. Nennstiel, K. Hahlbrock, T. Jabs, **S. Zimmermann** & D. Scheel (1997) Signal perception and intracellular signal transduction in plant pathogen defense. *J. Recept. Sign. Transd. Res.* **17**, 127-136.
- (18) H. Barbier-Brygoo, **S. Zimmermann**, S. Thomine, I.R. White, P. Millner & J. Guern (1996) Elementary auxin response chains at the plasma membrane involve external abp1 and multiple electrogenic ion transport proteins. *Plant Growth Regulation* **18**, 23-28.
- (19) S. Thomine, **S. Zimmermann**, J. Guern & H. Barbier Brygoo (1995) ATP-dependent regulation of an anion channel at the plasma membrane of protoplasts from epidermal cells of *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Cell* **7**, 2091-2100.
- (20) **S. Zimmermann**, S. Thomine, J. Guern & H. Barbier-Brygoo (1994) An anion current at the plasma membrane of tobacco protoplasts shows ATP-dependent voltage regulation and is modulated by auxin. *Plant J.* **6**, 707-716.
- (21) S. Thomine, **S. Zimmermann**, B. Van Duijn, H. Barbier-Brygoo and J. Guern. (1994) Calcium channel antagonists induce direct inhibition of the outward rectifying potassium channel in tobacco protoplasts. *FEBS Lett.* **340**, 45-50.

## ***1.2. Publications issues de la formation en biophysique dans le domaine animal***

- (22) A. Voigt, H. Wolf, **S. Lauckner**, G. Neumann, R. Becker & L. Richter (1983) Electrokinetic properties of polymer and glass surfaces in aqueous solutions: Experimental evidence for swollen surface layers. *Biomaterials* **4**, 299-304.
- (23) A. Voigt, E. Donath, L. Richter, **S. Lauckner**, R. Becker & G. Neumann (1982) Blood components - surface interactions. Conclusions for surface design. *Artificial organs* **6**, 488-492.

## **2 Ouvrages**

- (24) **S. Zimmermann** & I. Chérel (2005) 2. Potassium. In: "Plant Nutritional Genomics" (M.R. Broadley and P.J. White, eds.), pp. 26-65, Biological Sciences Series, Blackwell Publishing, Oxford, Royaume-Uni.
- (25) W. Wirtz, D. Nennstiel, T. Jabs, **S. Zimmermann**, D. Scheel & T. Nürnberger (1997) Signal perception and intracellular signal transduction in plant pathogen defense. In: "Biology of Plant-Microbe Interactions" Vol.1 (G. Stacey, B. Mullin and P.M. Gresshoff, eds.), International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, APS Press, The American Phytopathological Society.

## **3 Conférences et communications orales**

### ***3.1 Invitation personnelle dans des congrès internationaux***

- S. Zimmermann**. Green proteins in insect cells: promising features and possible limitations. 11<sup>th</sup> International Workshop on Plant Membrane Biology Août 1998, Cambridge, Royaume-Uni.
- S. Zimmermann**, K. Czempinski, B. Müller-Röber. Structure and function of plant K<sup>+</sup> channels. 9<sup>ème</sup> Colloque Canaux Ioniques, Septembre 1998, La Londe les Maures, France.
- S. Zimmermann**. Functional genomics of ectomycorrhizal symbiosis and analysis of fungal transporters using *Hebeloma cylindrosporum* as a model fungus. First Meeting of the International Ectomycorrhiza Genome Consortium (IEGC) Avril 2003, Tübingen, Allemagne.
- S. Zimmermann**. Genomics of cation nutrition in plants. VIII. International School of Pure and Applied Biophysics, Janvier 2004, Venise, Italie.

### ***3.2 Autres conférences et communications orales***

*(le nom souligné est celui de la personne ayant effectivement fait la communication)*

- H. Barbier-Brygoo, C. Maurel, G. Ephritikhine, C. Rechenmann, **S. Zimmermann**, M. Bouvier Durand, J. Guern. Perception of the auxin signal at the plasma membrane of tobacco mesophyll protoplasts. 9. International Workshop on Plant Membrane Biology, Juillet 1992, Monterey/California, Etats-Unis.

- S. Zimmermann**, S. Thomine, J. Guern, H. Barbier-Brygoo. Auxin affects ATP-regulated anion channels at the plasma membrane. 2. General Meeting of Members of the T-Programme "Regeneration", Novembre 1992, Copenhagen, Danemark.
- S. Zimmermann**. Auxin-regulated Ion channels. DFG-Rundgespräch "Membrantransport in Pflanzen", Février 1993, Wennigsen, Allemagne.
- S. Zimmermann**, **S. Thomine**, J. Guern, **H. Barbier-Brygoo**. Canaux ioniques de la membrane plasmique des protoplastes de suspensions cellulaires de tabac. Réunion de la Société Française de Physiologie Végétale, Février 1993, CNRS, Gif-sur-Yvette, France.
- H. Barbier-Brygoo**, G. Ephritikhine, M. Fellner, N. Leblanc, C. Maurel, J.-M. Pradier, C. Rechenmann, F. Sitbon, S. Thomine, **S. Zimmermann**, J. Guern. La perception du signal hormonal auxine par les cellules végétales: quels récepteurs pour quelles réponses? XXIVe Rencontre de Méribel sur la différenciation cellulaire, Mars 1993, Les Arcs, France.
- H. Barbier-Brygoo**, C. Maurel, G. Ephritikhine, C. Rechenmann, **S. Zimmermann**, J. Guern. Réponses membranaires à l'auxine et perception du signal hormonal chez le tabac. Réunion du réseau Membranes Végétales, Avril 1993, Clermont-Ferrand, France.
- H. Barbier-Brygoo**, G. Ephritikhine, M. Fellner, N. Leblanc, C. Maurel, C. Perrot-Rechenmann, J.-M. Pradier, F. Sitbon, S. Thomine, **S. Zimmermann**, J. Guern. Auxin perception by plant cells: Which receptors for which responses? XV. International Botanical Congress, Août 1993, Yokohama, Japon.
- J.M. Frachisse**, **S. Zimmermann**, D. Scheel, R. Hedrich. Elicitation d'un canal cationique à large conductance (CCLC) chez le persil. 4ème Colloque "Canaux Ioniques", Septembre 1993, Carry le Rouet, France.
- H. Barbier-Brygoo**, N. Leblanc, C. Perrot-Rechenmann, J.-M. Pradier, S. Thomine, **S. Zimmermann**, J. Guern. Auxin signalling at the plasma membrane of tobacco cells. International Symposium "Plant hormone signal perception and transduction", Septembre 1994, Moscou, Russie.
- H. Barbier-Brygoo**, N. Leblanc, J.-M. Pradier, C. Perrot-Rechenmann, S. Thomine, **S. Zimmermann**, J. Guern. Approches fonctionnelles des récepteurs d'auxines. Colloque INA, Communication Cellulaire: Biotechnologie des récepteurs membranaires, Octobre 1994, Figeac, France.
- H. Barbier-Brygoo**, N. Leblanc, C. Perrot-Rechenmann, J.M. Pradier, S. Thomine, **S. Zimmermann**, J. Guern. Auxin signalling and action at the plasma membrane of plant cells (1995, *Experientia* 51, Abstr.). 27<sup>th</sup> Annual Meeting of the Swiss Societies for Experimental Biology, Mars 1995, Fribourg, Suisse.
- H. Barbier-Brygoo**, S. Thomine, **S. Zimmermann**, J.M. Frachisse, J. Guern. Characterization, regulation and physiological role of anion channels at the plasma membrane of plant cells. 3<sup>ème</sup> DBMS workshop, Janvier 1996, Villard de Lans, France.
- T. Ehrhardt**, **S. Zimmermann**, B. Müller-Röber. Molecular studies towards understanding guard-cell K<sup>+</sup> channel KST1 (1996, *J. Exp. Bot.* 47, Suppl., 67). SEB Meeting, Mars 1996, Lancaster, Royaume-Uni.

- K. Czempinski, **S. Zimmermann**, T. Ehrhardt, B. Müller-Röber. Cloning and functional expression of plant outward rectifying K<sup>+</sup> channels. SEB, Plant Transport Group Workshop, Septembre 1996, Plymouth/Saltash, Royaume-Uni.
- T. Ehrhardt, **S. Zimmermann**, B. Müller-Röber. *In-vivo*- und *in-vitro*-Analysen zur Interaktion pflanzlicher Kaliumkanäle. 10. Tagung "Molekularbiologie der Pflanzen" Mars 1997, Wernigerode, Allemagne.
- S. Zimmermann**, T. Ehrhardt, K. Czempinski, B. Müller-Röber. K<sup>+</sup><sub>in</sub> und K<sup>+</sup><sub>out</sub>: Neue Einsichten in pflanzliche Kaliumkanäle. DFG-Rundgespräch "Membrantransport in Pflanzen", Mars 1997. Bad Honnef, Allemagne.
- B. Müller-Röber, K. Czempinski, T. Ehrhardt, G. Plesch, **S. Zimmermann**. Cloning channels in guard cells. SEB Meeting, Avril 1997, Canterbury, Royaume-Uni.
- B. Müller-Röber, K. Czempinski, T. Ehrhardt, **S. Zimmermann**. Properties of a cloned *Arabidopsis* outward rectifying K<sup>+</sup> channel, KCO1, indicate a role in Ca<sup>2+</sup>-mediated signal transduction. 8<sup>th</sup> International Conference on *Arabidopsis* Research, Juin 1997, Madison, Wisconsin, Etats-Unis.
- K. Czempinski, **S. Zimmermann**, S. Thomine, B. Müller-Röber. Two-pore K<sup>+</sup> channels in plants: structure and function (1997, *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 434, Suppl., R98). International Potassium Channel Conference, Juillet 1997, Ulm, Allemagne.
- S. Hartje, **S. Zimmermann**, B. Müller-Röber. Funktionelle Clonierung und Charakterisierung neuer pflanzlicher Ionenkanäle in *Xenopus* Oozyten mittels Injektion von polyA<sup>+</sup> RNA aus Kartoffelblättern. 12. Tagung "Molekularbiologie der Pflanzen" Mars 1999, Wermelskirchen, Allemagne.
- S. Zimmermann**, S. Hartje, T. Ehrhardt, G. Plesch, B. Müller-Röber. Zwei K<sup>+</sup>-Kanäle in Kartoffel-Schliesszellen – Assemblierung über C-terminale Domänen. Botanikertagung Septembre 2000, Jena, Allemagne.
- R. Lambilliotte, M.-V. Tatry, **S. Zimmermann**, C. Plassard, F. Gaymard, R. Cooke, H. Sentenac. Production et analyse d'une banque d'ESTs chez le champignon ectomycorrhizien *Hebeloma cylindrosporum* et identification de systèmes de transport. Réunion du Réseau de Mycologie, Janvier 2001, Toulouse, France.
- S. Zimmermann**, H. Sentenac. Presentation of the Montpellier contribution to the european RTN program. "Kick-off Meeting of NICIP", October 2002, Golm, Allemagne.
- D. Wipf, W.B. Frommer, **S. Zimmermann**. Nutrient acquisition by plants. The benefits of the mycorrhizal association. Forum Procope Novembre 2002, Lyon, France.
- C. Koziol, **S. Zimmermann**, H. Sentenac. Cyclic Nucleotide Gated Channels in *Arabidopsis thaliana*. Annual Meeting of the European RTN project NICIP, Juin 2003, Cambridge, Royaume-Uni.
- M. Benjdia, E. Rikirsch, D. Steinmetz, **S. Zimmermann**, W.B. Frommer, D. Wipf. An expression cDNA library for suppression cloning in yeast mutants and EST analysis from the symbiotic basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum*. VAAM-Tagung: Molekularbiologie der Pilze, Septembre 2003, Göttingen, Allemagne.
- T. Nürnberger, **S. Zimmermann**, F. Brunner, J. Lee, S. Rosahl, D. Scheel. Ion

channel functions in the transduction of innate immune response in plant cells. 14<sup>ème</sup> Colloque Association "Canaux Ioniques", Septembre 2003, Presqu'île de Giens, France.

- C. Koziol, **S. Zimmermann**, H. Sentenac. AtCNGCs: Interaction between different channels? Annual Meeting of the European RTN project NICIP, Juillet 2004, Montpellier, France.
- T. Müller, M. Benjdia, E. Rikirsch, **S. Zimmermann**, D. Wipf. Peptide uptake by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* - Isolation and characterization of peptide transports by functional complementation of yeast mutants. 7th VAAM-Symposium "Molecular Biology of Fungi", Septembre 2005, Bochum, Allemagne.
- C. Koziol, **S. Zimmermann**, H. Sentenac. Functional characterisation of a *Shaker*-like channel from *Arabidopsis thaliana*. Annual Meeting of the European RTN project NICIP, Septembre 2005, Genova, Italie.
- T. Müller, M. Benjdia, E. Rikirsch, **S. Zimmermann**, D. Wipf. Isolation and characterization of organic nitrogen transporters from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. 6<sup>th</sup> Colloquium MolMyk "Molecular Basics of Mycorrhizal Symbioses", Octobre 2005, Neustadt/Weinstrasse, Allemagne.
- S. Zimmermann**. Final report of partner 4, Ion Channel Group in Montpellier, RTN NICIP 2002-2006. Final Meeting of the European RTN project NICIP, Juin 2006, Gif-sur-Yvette, France.
- T. Müller, M. Avolio, M. Olivi, **S. Zimmermann**, M. Chalot, D. Wipf. Isolation and characterization of N transporters putatively involved in the *Hebeloma cylindrosporum*-*Pinus pinaster* ectomycorrhizal association. 5<sup>th</sup> International Conference on Mycorrhiza ICOM, Juillet 2006, Granada, Espagne.
- S. Zimmermann**. Caractérisation moléculaire de transporteurs chez le champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum*. Réunion de présentations des travaux sur les mycorhizes en cours à Montpellier, Juin 2007, Montpellier.

#### 4 Posters

- S. Zimmermann**, R. Arndt, E. Donath. Patch-clamp investigations of pores and channels of biological membranes. 2. Internationale Konferenz junger Nachwuchswissenschaftler, 1987, Puschshino, Russie.
- S. Zimmermann**, R. Arndt, E. Donath. Untersuchungen von Membranporen bzw. -kanälen mit der Patch-Clamp Methode. Jahrestagung der Gesellschaft für mathematische und physikalische Biologie, 1987, Kühlungsborn, Allemagne.
- R. Arndt, **S. Zimmermann**, E. Donath. Aufbau und Möglichkeiten eines Patch-Meßplatzes. Jahrestagung der Gesellschaft für mathematische und physikalische Biologie, 1987, Kühlungsborn, Allemagne.
- G. Linsel, F. Kössler, **S. Zimmermann**. Trichlorethylene action on biophysics of membrane transport. School Proceedings, Winterschool "Biophysics of Membrane Transport", 1990, Porabka-Kozubnik, Pologne.

- S. Zimmermann**, S. Thomine, J. Guern, H. Barbier-Brygoo. Auxin modulation and ATP regulation of the voltage-dependent anion current of tobacco protoplasts. Symposium "Membrane transport in plants and fungi: Molecular mechanisms and control", Septembre 1993, Wye, Royaume-Uni.
- H. Barbier-Brygoo, A. Delbarre, G. Ephrithkine, V. Imhoff, N. Leblanc, C. Maurel, P. Muller, C. Perrot-Rechenmann, J.-M. Pradier, S. Thomine, **S. Zimmermann**, J. Guern. Functional study and molecular characterization of auxin receptors at the plasma membrane of tobacco cells. Third General Meeting of Members of the T-Programme "Regeneration", Decembre 1993, Wageningen, Pays-Bas.
- S. Zimmermann**, S. Thomine, J.-M. Frachisse-Stoilskovic, J. Guern, H. Barbier-Brygoo. Auxin modulates an anion channel at the plasma membrane of tobacco protoplasts. 4th International Congress of Plant Molecular Biology, Juin 1994, Amsterdam, Pays-Bas.
- H. Barbier-Brygoo, N. Leblanc, C. Perrot-Rechenmann, J.-M. Pradier, S. Thomine, **S. Zimmermann**, J. Guern. Auxin signalling at the plasma membrane of tobacco cells. 2ème Colloque général sur les Sciences Végétales, S.F.P.V., Octobre 1994, Saint-Malo, France.
- S. Zimmermann**, J.-M. Frachisse, H. Barbier-Brygoo, J. Guern. The voltage-dependent anion channel TSAC is involved in macroscopic chloride fluxes in tobacco cell suspension. 10<sup>th</sup> International Workshop on Plant Membrane Biology, Août 1995, Regensburg, Allemagne.
- S. Thomine, **S. Zimmermann**, J. Guern, H. Barbier-Brygoo. A voltage-dependent anion channel at the plasma membrane of protoplasts from epidermal cells of *Arabidopsis thaliana* hypocotyls shows ATP-dependent regulation. 10<sup>th</sup> International Workshop on Plant Membrane Biology, Août 1995, Regensburg, Allemagne.
- T. Ehrhardt, **S. Zimmermann**, B. Müller-Röber. Molecular studies towards understanding guard-cell K<sup>+</sup> channel KST1. (1996, J. Exp. Bot. 47, Suppl., 67). SEB Annual Meeting, Mars 1996, Lancaster, Royaume-Uni.
- J.M. Frachisse, H. Barbier-Brygoo, J.Guern, **S. Zimmermann**. Involvement of the voltage-dependent anion channel in macroscopic chloride fluxes in tobacco cell suspension (1996, J. Exp. Bot. 47, Suppl., 67). SEB Annual Meeting, Mars 1996, Lancaster, Royaume-Uni.
- S. Thomine, J. Guern, H. Barbier-Brygoo, **S. Zimmermann**. Voltage-dependent anion channel at the plasma membrane of protoplasts from epidermal cells of *Arabidopsis* hypocotyls (1996, J. Exp. Bot. 47, Suppl., 70). SEB Meeting, Mars 1996, Lancaster, Royaume-Uni.
- T. Ehrhardt, **S. Zimmermann**, B. Müller-Röber. Evidence for clustering of plant K<sup>+</sup> channel proteins mediated by a novel protein-interaction domain (1996, Plant Physiol. 111, Suppl., 169). Annual Meeting of the American Society of Plant Physiologists, Juillet 1996, San Antonio, Texas, Etats-Unis.
- S. Thomine, **S. Zimmermann**, J.M. Frachisse, J. Guern, H. Barbier-Brygoo. Voltage-dependent anion channel at the plasma membrane of protoplasts from epidermal cells of *Arabidopsis* hypocotyls. 7<sup>ème</sup> Colloque des Canaux Ioniques, Septembre 1996, La Londe les Maures, France.
- S. Zimmermann**, B. Müller-Röber. Heterologous expression and functional characterization of plant K<sup>+</sup> channels. 11<sup>th</sup> International Workshop on Plant Membrane Biology Août 1998, Cambridge, Royaume-Uni.

- S. Hartje, **S. Zimmermann**, B. Müller-Röber. Characterization of new plant ion channels in *Xenopus* oocytes injected with poly(A)<sup>+</sup> RNA from potato sink leaves. 11<sup>th</sup> International Workshop on Plant Membrane Biology, Août 1998, Cambridge, Royaume-Uni.
- S. Wiese, K. Czempinski, S. Hartje, **S. Zimmermann**, B. Müller-Röber. K<sup>+</sup> channel proteins of the KCO family: functional characterization. Botanikertagung, Septembre 1998, Bremen, Allemagne.
- K. Czempinski, S. Wiese, **S. Zimmermann**, B. Müller-Röber. K<sup>+</sup> Channels in Plants - The KCO Family. PSP, Février 1999, Etats-Unis.
- R. Lambilliotte, M.V. Tatry, **S. Zimmermann**, C. Plassard, F. Gaymard, R. Cooke, H. Sentenac. Identification and characterization of transport proteins in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium*. Plant Membrane Biology, The 12<sup>th</sup> International Workshop, Août 2001, University of Wisconsin-Madison, Etats-Unis.
- R. Lambilliotte, M.V. Tatry, **S. Zimmermann**, C. Plassard, F. Gaymard, R. Cooke, H. Sentenac. Identification and characterization of transport proteins in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium*. Association "Canaux Ioniques" 12<sup>ème</sup> Colloque, Octobre 2001, La Londe les Maures, France.
- W.B. Frommer, M. Benjdia, E. Rikirsch, **S. Zimmermann**, H. Sentenac, D. Wipf. Isolation of amino acid and peptide transporters from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium* by functional complementation of yeast. Plant Biology, ASPB, Août 2002, Denver, Colorado, Etats-Unis.
- R. Lambilliotte, F. Gaymard, **S. Zimmermann**, R. Cooke, C. Berger, D. Samson, H. Sentenac. Identification and characterization of transport proteins of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium*. SEB Annual Main Meeting, Avril 2003, Southampton, Royaume-Uni.
- E. Rikirsch, M. Benjdia, **S. Zimmermann**, H. Sentenac, W.B. Frommer, D. Wipf. Isolation of peptide transporters from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium* by functional complementation of yeast. Fourth International Conference on Mycorrhizae ICOM4, Août 2003, Montréal, Canada.
- M. Benjdia, E. Rikirsch, D. Steinmetz, **S. Zimmermann**, W.B. Frommer, D. Wipf. An expression cDNA library for suppression cloning in yeast mutants and EST analysis from the symbiotic basidiomycete *Hebeloma cylindrosporium*. Fourth International Conference on Mycorrhizae ICOM4, Août 2003, Montréal, Canada.
- M.-A. Lohse, S. Hartje, **S. Zimmermann**, A. Schneider, G. Plesch, B. Müller-Röber. Functional analysis of the CHoR protein. 15<sup>th</sup> International Conference on Arabidopsis Research, Juillet 2004, Berlin, Allemagne.
- C. Corratgé, R. Lambilliotte, H. Sentenac, **S. Zimmermann**. Potassium transporter and potassium channel of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium* as candidates for symbiotic nutrient exchange. International Workshop on Plant Membrane Biology, Juillet 2004, Montpellier, France.
- M.-V. Tatry, R. Lambilliotte, **S. Zimmermann**, H. Sentenac, C. Plassard. Identification and expression of phosphate transporters in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium*. International Workshop on Plant Membrane Biology, Juillet 2004, Montpellier, France.

- T. Mueller, M. Benjdia, E. Rikirsch, **S. Zimmermann**, D. Wipf. Isolation of peptide transporters from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* by functional complementation of yeast. International Workshop on Plant Membrane Biology, Juillet 2004, Montpellier, France.
- M. Lohse, S. Hartje, **S. Zimmermann**, A. Schneider, G. Plesch, B. Müller-Röber. Functional analysis of the CHoR protein. International Workshop on Plant Membrane Biology, Juillet 2004, Montpellier, France.
- K. Czempinski, B. Müller-Röber, J.M. Davies, M. Tester, H. Barbier-Brygoo, **S. Zimmermann**, H. Sentenac, E. Martinoia, F. Gambale. EU-Research Training Network NICIP - Novel Ion Channels in Plants. International Workshop on Plant Membrane Biology, Juillet 2004, Montpellier, France.
- C. Corratgé, R. Lambilliotte, H. Sentenac, **S. Zimmermann**. Potassium transporter and potassium channel of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* are candidates for symbiotic nutrient exchange. 5<sup>th</sup> International Conference on Mycorrhiza ICOM, Juillet 2006, Granada, Espagne.
- C. Corratgé, R. Lambilliotte, H. Sentenac, **S. Zimmermann**. Potassium transporter and potassium channel of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* are candidates for symbiotic nutrient exchange. 17<sup>ième</sup> Colloque des Canaux Ioniques. Septembre 2006, Presqu'île de Giens, France.
- C. Corratgé, **S. Zimmermann**, R. Lambilliotte, C. Plassard, R. Marmeisse, J.B. Thibaud, B. Lacombe, H. Sentenac. Molecular and functional characterization of a Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> transporter from the Trk family in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. 14th International Workshop "Plant Membrane Biology", Juin 2007, Valencia, Espagne.

## 5 Séminaires sur invitation

KFA Jülich, Institute of biological information, Allemagne, Octobre 1992.

Université de Würzburg, Institute of Botany, Allemagne, Février 1993.

Université de Leiden, Institute of Molecular Plant Sciences, Netherlands, Juin 1993.

Université de Berlin (Freie Universität), Klinikum Steglitz, Allemagne, Avril 1994.

IACR Rothamstedt, Royaume-Uni, Octobre 1997.

IPB (Institute of Plant Biochemistry), Halle, Allemagne, Avril 1999.

## ENCADREMENT & Animations scientifiques

### Etudiants en thèse

- Octobre 2008 - ... **Muhammad Zulqurnain Haider** "Analyse des mécanismes moléculaires responsables des échanges de solutés nutritifs entre le champignon et l'arbre dans la symbiose ectomycorhizienne" (co-direction, directeur de thèse Hervé Sentenac).
- 2003 – 2006 **Claire Corratgé** "Identification, caractérisation fonctionnelle et rôle d'un transporteur de K<sup>+</sup> de la famille Trk chez le champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum*" (co-direction, directeur de thèse Hervé Sentenac).  
Analyse du rôle de Trk chez *Hebeloma* par une approche de physiologie moléculaire combinant clonage et séquençage de l'ADNc et du gène, caractérisation fonctionnelle du produit du gène en système hétérologue et analyse de l'expression en réponse aux conditions de milieu et à la symbiose (publié Corratgé *et al.*, 2007, *JBC*; **Publication 2**).
- 2000 - 2004 **Raphaël Lambilliotte** "Développement d'outils et de ressources moléculaires pour l'utilisation de l'espèce *Hebeloma cylindrosporum* comme modèle d'étude de la symbiose ectomycorhizienne" (co-direction, directeur de thèse Hervé Sentenac).  
Raphaël Lambilliotte a co-signé trois articles pendant sa thèse. Sa Thèse a permis de produire une ressource d'ESTs et de démarrer la caractérisation de systèmes de transport de K<sup>+</sup> (publié Lambilliotte *et al.*, 2004, *New Phytol.*; **Publication 4**).
- 2003 Encadrement d'une partie du travail de Thèse (1 mois en 2003) de **Mariam Benjdia** (Université de Tübingen). "Characterization of organic nitrogen transport in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*." Dissertation (PhD) Universität Tübingen (Germany). Mariam Benjdia a continué la caractérisation de transporteurs de peptides (publié Benjdia *et al.*, 2006, *New Phytol.*; **Publication 3**).
- 1997 - 2000 **Stefanie Hartje**, MPI Golm, "Klonierung pflanzlicher Proteine der Kalzium-Homöostase durch funktionelle Expression in *Xenopus laevis* Oozyten." ("Clonage par expression fonctionnelle dans l'ovocyte de xénope de systèmes de transport de Ca<sup>2+</sup> à partir d'ARN messenger de feuilles de pommes de terre.")  
Encadrement pour l'ensemble de la thèse (**Publication 6 & 7**; directeur de thèse Bernd Müller-Röber).
- 1995 – 1998 **Thomas Ehrhardt**, MPI Golm, "Protein-Protein-Interaktionen und Expression einwärts gleichrichtender Kaliumkanäle aus Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.)" ("Interaction des protéines et expression des canaux rectifiants entrants de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.)"), Freie Universität Berlin, Fachbereich Chemie, 1998.

Participation (parties en électrophysiologie) à l'encadrement de la Thèse (**Publication 16**; directeur de thèse Bernd Müller-Röber).

1995 – 2000 MPI Golm: **Nicola Gaedeke, Georg Leggewie, Sonja Wiese, Ulrike Simon et al.** Contribution à l'encadrement en électrophysiologie.

1993 – 1995 **Sébastien Thomine**, ISV Gif-sur-Yvette CNRS  
Participation à l'encadrement de la Thèse: "Contribution à l'étude des canaux anioniques de l'hypocotyle chez *Arabidopsis thaliana*: Approche pharmacologique et caractérisation électrophysiologique" (directeur de thèse Pr. Jean Guern). Thèse soutenue en 1997, Université Paris Sud Orsay (Paris XI) (**Publication 19**).

### Etudiants en Master / DEA / Diplôme

2007 – 2008 **Magali DiPietro**, Université Montpellier, M2R  
Encadrement du stage de Master2 de Recherche "Biologie intégrative des plantes": "Rôle du canal potassique AKT6 dans le développement et la germination de la graine chez *Arabidopsis thaliana*".  
Poursuite en thèse dans l'équipe Aquaporines (BPMP).

2006 - 2007 **Laetitia Kroniewicz**, Université Montpellier, M2R  
Encadrement du stage de Master2 de Recherche "Biologie intégrative des plantes": "Le canal potassique AKT6 d'*Arabidopsis thaliana*: caractérisation fonctionnelle et rôle dans la graine".  
Poursuite en thèse au CEA de Cadarache chez Nathalie Leonhardt & Alain Vavasseur.

2002 - 2003 **Claire Corratgé**, Université de Montpellier, DEA  
Encadrement du stage de DEA: "Identification et caractérisation d'un transporteur de la famille TRK chez le champignon ectomycorrhizien modèle *Hebeloma cylindrosporum*".  
Poursuite en thèse au sein de l'équipe.

2002 **Enno Rikirsch**, Université de Tübingen, Allemagne (étudiant de Daniel Wipf), Diplôme  
Encadrement d'une partie du travail de Diplôme (M.S., équivalent du DEA): "Analyse de transporteurs de peptides chez *Hebeloma*. Isolierung und Charakterisierung von Peptidtransportern der PTR-Familie aus dem Ektomykorrhizapilz *Hebeloma cylindrosporum*".

1996 **Ina Nicola Talke**, MPI Golm, Allemagne, Diplôme  
Encadrement du stage de Diplôme de Biochimie (équivalent du DEA): "Elektrophysiologische Analysen zu pflanzlichen einwärts gerichteten  $K^+$  Kanälen: Charakterisierung von SKT1 aus *Solanum tuberosum* L. im Baculovirus/Insektenzell Expressionssystem" ("Analyses électrophysiologiques des canaux  $K^+$  rectifiants entrants végétaux: Caractérisation de SKT1 de *Solanum tuberosum* L. dans le système hétérologue

baculovirus/cellules d'insectes"), Freie Universität Berlin, Fachbereich Chemie (**Publication 12**).

Poursuite en thèse à York, Royaume-Uni, chez Franz Maathuis & Dale Sanders.

1992

**Sébastien Thomine**, ISV Gif-sur-Yvette CNRS, DEA  
Encadrement en électrophysiologie du stage de DEA "Biologie du Développement", Université P. & M. Curie (Paris VI), Université Paris Sud (Paris XI): "Contribution à la caractérisation des unités de transport de la membrane plasmique impliquées dans les flux de potassium et de protons induits par les oligogalacturonides chez les cellules de tabac" (**Publication 21**).

Poursuite en thèse au sein de l'équipe.

1990 – 1991

**Carsten Strübing**, Biophysique, Université Humboldt Berlin, Allemagne, Diplôme

Co-encadrement du travail de Diplôme (équivalent de DEA) "Elektrophysiologische Untersuchungen und mechanosensitive Prozesse an der Plasmamembran von *Chenopodium album* Protoplasten" ("Analyses électrophysiologiques et procès mécano-sensibles à la membrane plasmique de protoplastes de *Chenopodium album*").

### Autres étudiants

Février–Juin 2009

**Kevin Garcia**, Université de Montpellier

Encadrement du stage de Master1: "Localisation des systèmes de transport membranaire impliqués dans la symbiose entre le champignon ectomycorrhizien *Hebeloma cylindrosporum* et la plante hôte *Pinus pinaster*".

Janvier 2008

**Mathilde Colin**; Encadrement du stage "Découverte de l'entreprise" (Collège du Jeu de Mail Montpellier).

Juin – Août 2005

**Katia Bonaldi**, Université de Montpellier

Encadrement du stage de Licence: "Analyse moléculaire des mécanismes de transport  $K^+$  chez le champignon ectomycorrhizien modèle *Hebeloma cylindrosporum*".

Katia continue actuellement en thèse à l'IRD, Montpellier.

Janvier 2004

**Andréa Coscat**; Encadrement du stage "Découverte de l'entreprise" (Collège Fontcarrade Montpellier).

2002

**Claire Corratgé**, Université Montpellier

Encadrement du stage de Maîtrise: "Analyse moléculaire des mécanismes de transport  $K^+$  chez le champignon ectomycorrhizien modèle *Hebeloma cylindrosporum*".

2002

**Ludovic Ainaudi**, Université de Toulon & du Var

Stage DUT, génie biologique option Analyses Biologiques et Biochimiques "Analyse moléculaire des mécanismes modèle *Hebeloma cylindrosporum*".

1998

Participation à l'encadrement des travaux pratiques (génétiques) des étudiants de Biologie, Université Potsdam; MPI Golm, Allemagne.

1992 & 1993 Participation à l'encadrement de stages courte durée (2 semaines) d'étudiants du DEA de Biologie du Développement, Paris XI Orsay; ISV Gif-sur-Yvette CNRS.

### Chercheurs

2003 - 2006 **Christiane Koziolk** a travaillé dans l'équipe "*Canaux Ioniques*" dans le cadre d'un contrat post-doctoral entre Janvier 2003 et Mars 2006, dans le contexte du projet européen RTN ("Research Training Network"). En tant que "project leader", j'ai encadré Christiane au niveau de son intégration, de l'administration, et sur le plan de discussions scientifiques.

Christiane Koziolk continue de travailler dans l'administration nationale concernant la science biologique et son application à Berlin, Allemagne.

1995 **Thorsten Nürnberger** (MPI Cologne, Allemagne), ISV Gif-sur-Yvette; initiation & encadrement en patch-clamp (**Publication 14**).

1993 - 1995 **Jean-Marie Frachisse**, ISV Gif-sur-Yvette; initiation & encadrement en patch-clamp (**Publication 13**).

### Participation au comité de thèse

2006 - 2008 Remi Peyronnet, ISV, Gif-sur-Yvette  
"Du canal dépendant du voltage AtVDAC-1 à l'identification de deux canaux mecano-sensibles MSL9 et MSL10 sur la membrane plasmique d'*Arabidopsis thaliana*".

2009 Laetitia Kroniewicz, CEA, Cadarache.  
"Etude du rôle d'un canal chlorure impliqué dans la régulation des courants anioniques de type S de la cellule de garde chez *Arabidopsis thaliana*".

### Participation à l'évaluation de la recherche

- Evaluation des articles pour les revues à comité de lecture (entre autres *The Plant Journal*, *New Phytologist*, *Phytochemistry*, *European Journal of Plant Pathology*, *Plant Science*, *FEBS Lett*, *JBC*, ...).
- Evaluation des projets de recherche (par ex. *Recherche en Région Bourgogne*).
- Activité éditoriale: Depuis 2005, membre du comité éditorial du Journal "Plant Signaling & Behavior".

### Animation scientifique

2008 Coordinatrice pour la préparation d'un projet ANR (ANR Blanc 2009) avec trois partenaires à Montpellier et à Nancy.

2005 - 2006 Membre du comité d'organisation du colloque "*Canaux Ioniques*", Presqu'île de Giens.  
En 2005, Organisatrice & "chairman" d'une session sur les canaux végétaux "Role of trafficking in ion channel regulation".

- 2002-2006      Projet européen: participation à la préparation d'un programme européen, RTN ("Research Training Network", HPRN-CT-2002-00245) avec 5 autres laboratoires situés en France, Allemagne, Angleterre, Suisse et Italie. Ce projet intitulé "Novel ion channels *in planta*" (NICIP) a démarré en Août 2002 et a permis d'ouvrir un poste post-doctoral durant 3 ans (entre Janvier 2003 et Mars 2006) dans notre équipe. Dans ce cadre, j'ai eu la fonction du "project leader" et je me suis occupée du post-doc embauché dans notre groupe ainsi que des tâches administratives (rapports, budget, etc.).
- 2002-2004      Responsable du projet Procope (coopération bilatérale avec un laboratoire allemande), "Symbiose ectomycorhizienne & amélioration de la nutrition minérale de l'arbre: Identification de transporteurs membranaires chez le champignon *H. cylindrosporum*".  
Pour pouvoir avancer plus efficacement et pour échanger les méthodes et les matériels (*e.g.* ESTs codants pour les transporteurs à caractériser), nous avons mis en place des collaborations en France et dans le cadre du programme Procope, avec Daniel Wipf, Institut Tübingen (Laboratoire de Wolf Frommer) & Université Bonn, Allemagne. Le programme Procope a été accepté en Novembre 2002, et a été mis en place à ce moment. Dans le cadre de ce programme, un échange entre les deux groupes a été réalisé. J'ai encadré un étudiant en DEA ("Diplom"), Enno Rikirsch, pendant 3 mois et une étudiante en thèse, Mariam Benjdia, pendant un mois dans notre laboratoire en 2003. Deux articles issue de cette coopération sont publiés (Wipf *et al.*, 2003, *Genome*; Benjdia *et al.*, 2006, *New Phytol.*).
- Depuis 2002      Membre de comité d'organisation de séminaires au sein de l'institut IBIP, Montpellier.  
Au sein du laboratoire, j'ai commencé en 2002 à m'investir dans la mise en place de séminaires périodiques et réguliers s'appuyant sur des intervenants internes et invités extérieurs à l'institut. Nous avons ainsi instauré une série nommée "Séminaire de Biologie des Plantes" ouverte pour la communauté scientifique régionale ainsi que pour les étudiants.

## A TRAVAUX EFFECTUES

### Les canaux ioniques végétaux – caractérisation *in vivo* & moléculaire & Analyse de systèmes de transport au sein de la symbiose

#### Résumé

Durant une formation en biophysique, j'ai développé un grand intérêt pour les analyses et interprétations de phénomènes biologiques avec les moyens et lois de la physique. Les mouvements des ions à travers des membranes cellulaires étaient devenus quasiment visibles au niveau moléculaire par des enregistrements de petits courants de chaque protéine responsable du transport. Les progrès du développement de techniques spectaculaires comme le patch-clamp ont ouvert un domaine de la recherche complètement nouveau permettant dans une première période une description détaillée des flux ioniques à travers des membranes cellulaires chez les animaux comme chez les plantes. Dans une deuxième période, avec les progrès en biologie moléculaire, le séquençage de génomes, et analyses de mutants, l'identification de ces molécules responsables des courants observés et analysés a provoqué encore une diversification de la recherche dans ce domaine. Le challenge était et est toujours, de corréliser les gènes et protéines avec les fonctions de transport ionique déjà décrites.

Mes activités de recherche s'inscrivent dans ce contexte, après apprentissage de la technique du patch-clamp avec des moyens limités en Allemagne de l'Est (Thèse à Berlin) et ensuite, après la réunification en 1990, avec des moyens plus sophistiqués, j'ai participé à la description fonctionnelle des canaux ioniques au niveau des cellules végétales *in vivo* (initiation à Göttingen et post-doc à Gif-sur-Yvette). Ensuite, j'ai participé à l'identification des canaux au niveau moléculaire et à leur caractérisation par expression fonctionnelle dans les systèmes hétérologues comme les cellules d'insectes et les ovocytes de grenouille (post-doc à Golm). Mes présents projets sont en continuité avec ces travaux, mais concernent aussi un modèle physiologique encore plus complexe, la symbiose entre champignon et plante, spécifiquement l'analyse de mécanismes de transports ioniques entre les deux partenaires en analysant les canaux et transporteurs d'un champignon ectomycorhizien (CR à Montpellier).

## I Biophysique, électrophysiologie, patch-clamp (Berlin)

### I.1. Biophysique & caractérisation de surface de biomatériaux

En correspondance avec mes intérêts pour la biologie en combinaison avec la physique, j'ai acquis une formation en biophysique (études supérieures et Thèse) à l'Université Humboldt de Berlin (ex-Berlin-Est). En fait, l'explication de phénomènes en biologie avec des moyens de physique et mathématique m'a fascinée ainsi que l'application de principes biologiques pour les développements techniques, la bionique.

Afin d'obtenir une parmi les très rares places pour les études de biophysique, je me suis investie une année dans la recherche biophysique au sein d'un groupe appartenant à la faculté de médecine ("Charité"). Pendant cette année, j'ai participé aux expériences sur le potentiel de surfaces ("streaming potential") pour le développement de biomatériaux utilisés en médecine (deux publications résultent de ces travaux: Voigt *et al.*, 1982 & 1983; **Publication 22 & 23**).

Pendant mes études en biophysique, la technique fascinante du patch-clamp développée par Neher & Sakman (1976) est devenue très en vogue pour une analyse précise de canaux ioniques de la membrane de cellules, dans cette période aussi en biologie végétale. Le département de Biophysique de l'Université Humboldt a voulu développer et appliquer cette technique d'après la documentation dans la littérature (sans avoir accès aux amplificateurs commerciaux), et j'ai participé à ce challenge pendant mon stage de "diplôme" (=DEA) et surtout pendant ma thèse.

### I.2. Les canaux ioniques et leur caractérisation par la méthode du patch-clamp

Interface entre la cellule et son milieu, la membrane plasmique contrôle les échanges de matière et d'information (réception et transduction des signaux) avec l'environnement. Les processus de transport électrogénique par les membranes jouent un rôle important dans toutes les cellules vivantes, des microorganismes aux cellules d'animal et plante. Les protéines intégrales membranaires facilitent et régulent de tels processus de transport, fournissant ainsi un système régulé, capable d'ajuster les concentrations ioniques et le potentiel membranaire. Chez les animaux comme chez les plantes, les canaux ioniques sont identifiés comme des acteurs majeurs de l'échange d'information. Chez les plantes, ils ont en plus un rôle essentiel dans les flux "massifs" de solutés : *e.g.* prélèvement des ions nutritifs par la racine, accumulation de  $K^+$  et d'anions provoquant l'augmentation de la pression de turgescence et l'élongation cellulaire, libération massive des ions  $K^+$  et  $Cl^-$  conduisant à la fermeture des stomates.

Parmi les différentes protéines de transport, les canaux ioniques constituent une classe très grande et divergente, divisée en plusieurs sous-classes selon l'ion transporté ou les mécanismes de leur régulation. Par exemple, selon les stimuli menés à l'activation (ou désactivation), nous distinguons les canaux ioniques voltage-dépendants, dépendants du ligand ou mécano-sensibles. Les fonctions de telles protéines, les canaux ioniques, divergent comme le font leurs mécanismes de régulation, fournissant ainsi à chaque type de cellule une série spécifique et adaptée d'unités de transport.

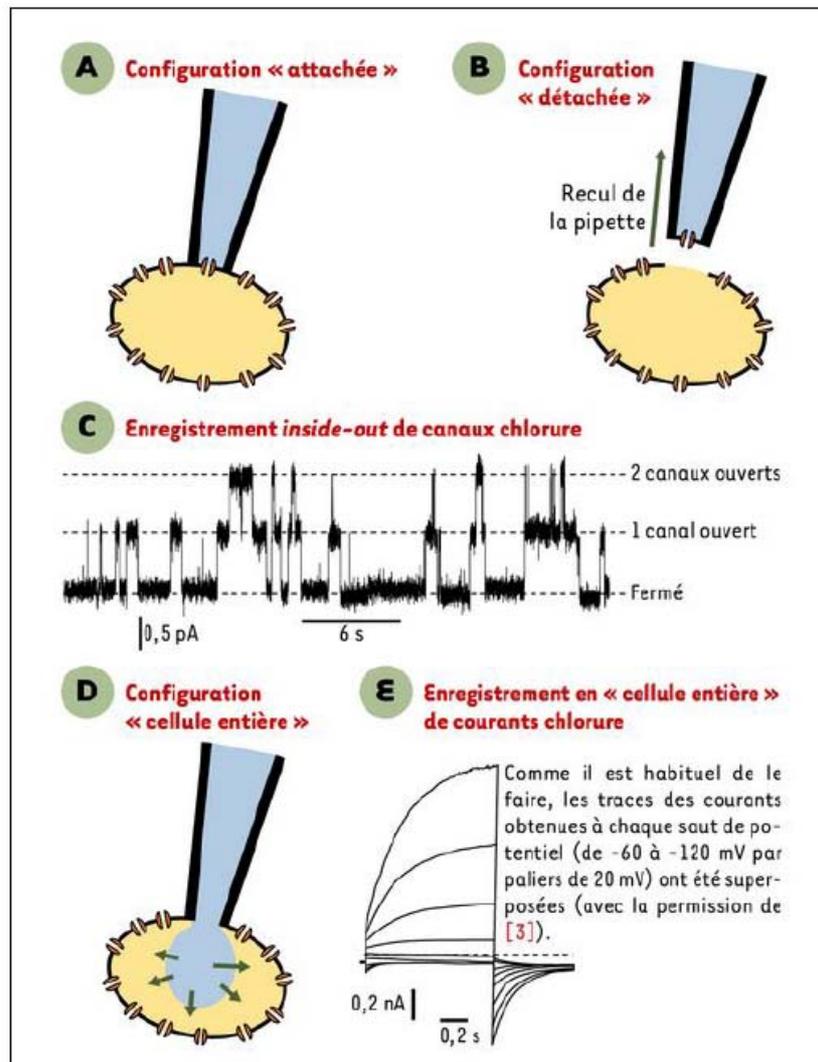
La technique du patch-clamp a été mise au point par Neher et Sakman en 1976 (Neher & Sakman, 1976; Hamill *et al.*, 1981) et leur a valu le prix Nobel de médecine en 1991, peu après la période où j'ai travaillé à Göttingen, dans leur ville, au laboratoire de Rainer Hedrich et Klaus Raschke. Cette technique permet de détecter les courants ioniques traversant la membrane des cellules et même d'un canal individuel grâce à l'enregistrement de l'activité électrique d'un fragment microscopique de membrane cellulaire. Une microélectrode de verre, polie à son extrémité, est approchée de la membrane cellulaire pour l'isoler électriquement. Par une aspiration douce, elle est collée ("scellée") au fragment de la membrane ("patch"). La résistance électrique entre le contenu de la microélectrode et le milieu baignant les cellules est supérieure à 1 GΩ, au niveau du point de contact, permettant ainsi la mesure de courants qui traversent la membrane. Les courants unitaires et totaux recueillis par la microélectrode de "patch" sont amplifiés, numérisés et filtrés par un convertisseur analogique/numérique puis enregistrés et analysés. Les différentes configurations du patch-clamp sont illustrées en figure 1.

### I.3. **Thèse:** *Etude en patch-clamp de différents types cellulaires et des effets de la 4-aminopyridine et de solvants organiques sur la membrane*

Pendant ma **Thèse**, nous avons développé la technique du patch-clamp au laboratoire pour la caractérisation de canaux ioniques de différents types cellulaires, avec le but d'étudier leur modulation par des effecteurs connus pour leurs effets toxiques (*e.g.* solvants organiques).

La technique de patch-clamp en mode canal unique a été appliquée à l'étude des canaux ioniques des membranes cellulaires. Cette technique permet l'enregistrement et la caractérisation de courants traduisant l'activité de canaux unitaires. Nous avons utilisé de différentes cellules animales et végétales (érythrocytes, fibroblastes, cellules Hela, cellules du muscle cardiaque, et protoplastes de plantes) à l'aide d'un poste de mesure construit dans le département de biophysique. La condition *sine qua non* de cette technique est d'obtenir un scellement parfait et une résistance électrique élevée entre la pointe de la pipette de patch et la membrane cellulaire. Avec le matériel dont je disposais, je n'ai pu obtenir cela qu'avec les cellules Hela et les cellules du muscle cardiaque. L'observation de l'activité de canaux ioniques en présence de l'inhibiteur de canaux potassiques voltage-dépendants, la 4-aminopyridine, a suggéré la présence de canaux potassium  $Ca^{2+}$ -dépendants. De plus, nous avons mis en évidence un changement morphologique des cellules Hela en présence de 4-aminopyridine.

Dans le cadre d'une étude concernant les problèmes de santé que peuvent causer les solvants organiques, deux représentants typiques, le trichloroéthylène et le dichlorométhane, ont été testés pour leurs effets sur la conductance des membranes. Nous avons observé que la présence de ces solvants provoque une activation de canaux potassiques sans déstabilisation de la membrane. Ces résultats suggèrent que les solvants ont un effet sur l'équilibre ionique des cellules, qui pourrait être impliqué dans les problèmes de santé résultant d'une exposition aiguë ou chronique aux solvants organiques. Nous en avons conclu que l'étude de ces phénomènes par la technique d'électrophysiologie de patch-clamp pouvait offrir une voie d'approche pour analyser les mécanismes conduisant à des problèmes médicaux spécifiques en cas de contact avec des solvants.



**Figure 1.** La méthode du patch-clamp et ses configurations pour mesurer les courants unitaires (**A-C**) ou totaux (**D & E**) (Teulon, 2004). (**A**) La configuration de départ après isolement électrique de la membrane est la configuration attachée ("cell-attached") permettant l'analyse des canaux unitaires toujours en contact avec leur milieu cytosolique. A partir de cette configuration, l'isolement de ce petit morceau de la membrane est possible (**B**, configuration détachée, "inside-out") ou la rupture pour obtenir accès à la surface entière de la membrane et pour contrôler le milieu de deux côtés (**D**, "whole-cell"). Exemples de courants ainsi obtenus sont illustrés en (**C**) pour les courants unitaires (les canaux oscillent entre un état fermé et ouvert) et en (**E**) pour les courants macroscopiques qui traversent toute la cellule.

A la fin de ma thèse, après la réunification de l'Allemagne, j'ai effectué un premier stage post-doctoral (1990-1991) dans l'équipe de Rainer Hedrich, Institut de Physiologie de Plante, Université de Göttingen, pour continuer de me former dans la technique de patch-clamp, précisément dans l'utilisation des outils commercialisés (amplificateur, software etc.).

## **II Canaux ioniques dans les cellules de la plante *in vivo* & leur caractérisation (Göttingen & Gif-sur-Yvette)**

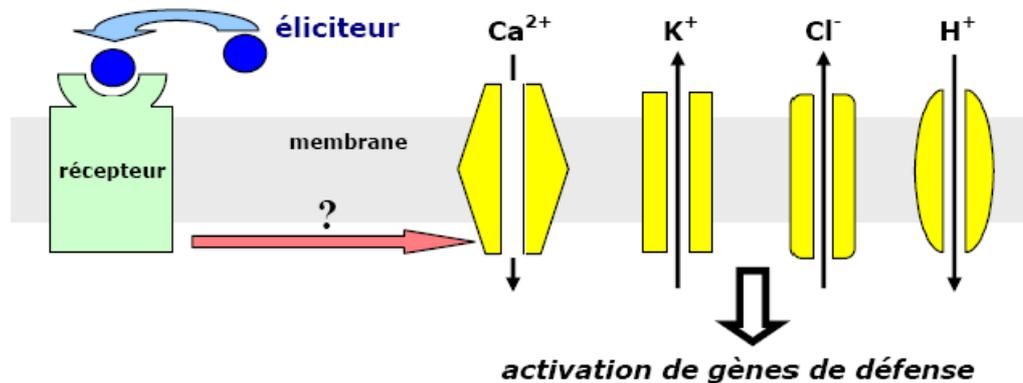
Après ma thèse à Berlin, je suis passée du domaine animal au domaine végétal pour démarrer les études en électrophysiologie sur les questions de caractérisation et régulation de canaux ioniques de la plante impliqués dans la signalisation. Mon premier post-doc à Göttingen (Allemagne), de novembre 1990 à mai 1991, a concerné l'étude d'un canal ionique impliqué dans les réponses à un éliciteur chez le persil (II.1.). Ensuite, au cours de mon séjour post-doctoral dans le cadre de contrats européens (Bridge et Biotech) dans le groupe "Réception et Transduction de Signaux" du Pr. Jean Guern et du Dr. Hélène Barbier-Brygoo à Gif-sur-Yvette de 1991 à 1995 (ISV, CNRS), nous avons décrit plusieurs types de canaux ioniques à la membrane plasmique des protoplastes de tabac (II.2.) et d'*Arabidopsis* (II.3.) et nous avons étudié leur régulation, notamment par l'auxine et la phosphorylation.

### **II.1. Identification et caractérisation d'un canal cationique perméable à $Ca^{2+}$ impliqué dans un processus d'élicitation – la signalisation**

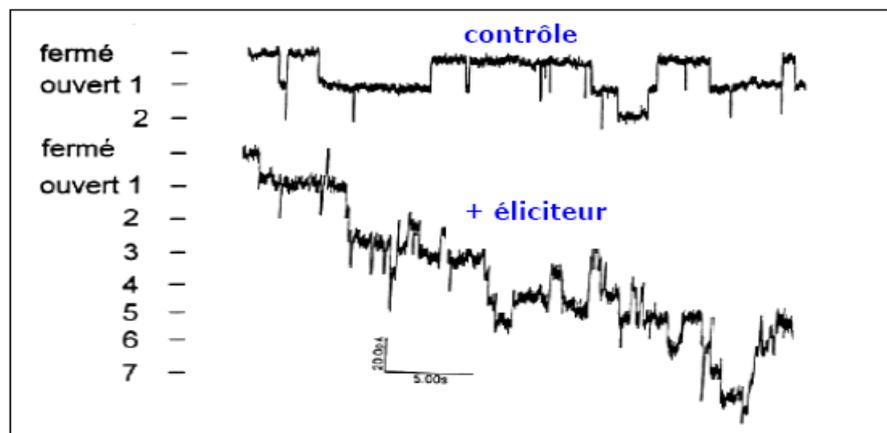
La perception par une plante d'un signal appelé éliciteur, émis par un pathogène, conduit au développement d'une série de réactions impliquant l'expression coordonnée de gènes de défense (Ebel & Cosio, 1994). Les molécules à activité d'éliciteur appartiennent à différentes familles: oligosaccharides, oligopeptides, glycoprotéines, lipides. Le fait qu'un éliciteur puisse être reconnu de façon spécifique par une plante et que cette reconnaissance se traduise par la mise en place de réactions de défense spécifiques chez cette plante, au niveau de la cellule infectée et dans les cellules environnantes, témoigne de l'existence de récepteurs et de chaînes de transduction de signaux spécialisés (Cosio *et al.*, 1990; Diekmann *et al.*, 1994; Nürnberger *et al.*, 1994). Des modifications du potentiel électrique membranaire et des flux d'ions à travers la membrane constituent des événements précoces dans les chaînes de transduction (Mathieu *et al.*, 1991).

La réponse de type "non-hôte" de cellules de persil (*Petroselinum crispum*) en culture à des éliciteurs dérivés de *Phytophthora sojae* constitue un modèle développé par le groupe de D. Scheel (MPI Cologne & IPB Halle) pour analyser les mécanismes impliqués dans l'élicitation (Parker *et al.*, 1991). Dans ce modèle, la suppression de  $Ca^{2+}$  du milieu ou l'introduction de bloqueurs des canaux calciques empêche le développement des réactions de défense des cellules (Nürnberger *et al.*, 1997). Une collaboration entre les groupes de D. Scheel et R. Hedrich (alors à l'Université de Göttingen en 1990) s'était développée dans ce contexte, avec pour objectif la caractérisation des canaux cationiques présents sur la membrane des cellules de persil. L'objectif de mon premier stage post-doctoral à Göttingen en 1990 a été d'analyser les conductances cationiques sur la membrane de protoplastes de cellules de persil par la technique du patch-clamp. Des travaux antérieurs avaient révélé que ces

### A Processus d'élicitation dans le modèle *Phytophthora sojae* / culture cellulaire de persil



### B Activation d'un canal cationique perméable à Ca<sup>2+</sup> de la membrane plasmique des cellules de persil par l'éliciteur fongique



**Figure 2.** Identification d'un canal cationique perméable à Ca<sup>2+</sup> impliqué dans la transduction d'un signal de défense contre un champignon pathogène. **(A)** Le modèle *Phytophthora sojae* / culture cellulaire de persil. Un éliciteur identifié dans ce modèle est un oligopeptide (Pep-13) provenant d'une glycoprotéine pariétale du champignon. Sa fixation sur un récepteur membranaire provoque rapidement des influx de Ca<sup>2+</sup> et H<sup>+</sup> et des efflux de K<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup>. Des approches pharmacologiques ont révélé que ces événements se situent en amont de la chaîne conduisant à l'activation des gènes de défense, au "burst" oxydatif et à la production de phytoalexines. L'influx de Ca<sup>2+</sup> semble correspondre à un événement très en amont dans la chaîne, puisque la suppression de Ca<sup>2+</sup> dans le milieu extérieur ou l'addition d'inhibiteurs des canaux calciques bloque le développement de la réponse des cellules à la présence de l'éliciteur. **(B)** Identification d'un canal perméable à Ca<sup>2+</sup> impliqué dans la réponse au pathogène. En utilisant la technique du patch-clamp sur la membrane de protoplastes de cellules de persil, nous avons identifié un canal cationique perméable à Ca<sup>2+</sup> et K<sup>+</sup>, possédant une forte conductance pour Ca<sup>2+</sup> (ca. 300 pS dans CaCl<sub>2</sub> 240 mM, et 80 pS dans CaCl<sub>2</sub> 1 mM). Les enregistrements de courants présents montrent que l'activité de ce canal est augmentée (phénomène de recrutement de canaux quiescents) par l'addition de l'éliciteur dans le milieu. Nous avons appelé ce canal LEAC, pour *Large conductance elicitor-activated channel*). Nous avons également montré que des mutations de la séquence peptidique de l'éliciteur exercent des effets sur le phénomène de recrutement du canal LEAC et sur le développement de la réponse des cellules à l'éliciteur qui sont corrélées (si la mutation supprime le phénomène de recrutement du canal LEAC, il n'y a pas d'activation des gènes de défense) (Zimmermann *et al.*, 1997).

protoplastes présentent une sensibilité aux éliciteurs, semblable à celle des cellules en culture (Dangl *et al.*, 1987).

Nos premiers résultats ont révélé la présence d'un canal cationique perméable à  $\text{Ca}^{2+}$  d'un nouveau type, caractérisé par une conductance unitaire importante (*ca.* 300 pS dans  $\text{CaCl}_2$  240 mM) et une durée moyenne d'ouverture relativement longue, de l'ordre de plusieurs secondes. De telles caractéristiques permettaient d'imaginer que ce canal pouvait effectivement constituer un élément de la chaîne de transduction du signal, autorisant des changements rapides et marqués des flux ioniques transmembranaires et/ou du potentiel de membrane. En plus, ce canal était activé par l'addition d'éliciteurs provenant du pathogène *Phytophthora sojae*. Dans l'ensemble, ces résultats apportaient la première démonstration de l'intervention directe d'un canal ionique dans un processus d'élicitation.

Après mon départ de Göttingen pour Gif-sur-Yvette, dans le Laboratoire de Jean Guern, j'ai poursuivi ce travail dans le cadre d'une collaboration impliquant également T. Nürnberger (groupe de D. Scheel). Nous avons montré que le canal précédemment identifié était sensible aux ions  $\text{La}^{3+}$  et  $\text{Gd}^{3+}$  (caractéristique courante des canaux calciques), et présentait une conductance relativement importante (*ca.* 80 pS) dans des conditions de concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  physiologiques (1 mM à l'extérieur, *i.e.* la concentration plausible de la solution apoplasmique). Nous avons montré qu'un éliciteur oligopeptidique (Pep-13), dérivé de la paroi du pathogène et identifié comme la plus petite molécule dotée d'une activité élicitrice (Nürnberger *et al.*, 1994), est capable d'activer de façon réversible le canal. Enfin, nous avons mis en évidence que des mutations introduites dans Pep-13 affectent de façon semblable la capacité de l'oligopeptide à activer le canal et à déclencher les réactions de défense des cellules, apportant ainsi la preuve définitive de l'intervention du canal dans le processus d'élicitation (Zimmermann *et al.*, 1997; **Publication 14**). De ce fait, ce canal a été appelé LEAC, pour *Large Elicitor-Activated ion Channel*. La figure 2 résume les résultats et conclusions de ce travail.

## II.2. Caractérisation de canaux potassiques et anioniques sur protoplastes de tabac

De différents résultats obtenus par l'équipe d'accueil à Gif-sur-Yvette avaient permis d'identifier des modifications du potentiel membranaire et/ou des flux d'ions transmembranaires comme des éléments précoces de chaînes de transduction de signaux déclenchés par l'auxine (Barbier-Brygoo *et al.*, 1991) ou des éliciteurs (Mathieu *et al.*, 1991) chez des cellules en culture ou des protoplastes de tabac. Dans ce contexte, l'objectif de mon travail a été de développer la technique du patch-clamp dans le laboratoire de façon à caractériser les canaux ioniques impliqués dans ces événements membranaires précoces.

### II.2.1. Identification d'un canal $\text{K}^+$ rectifiant sortant chez les protoplastes de tabac en culture

Les résultats obtenus par Mathieu *et al.* (1991) avaient mis en évidence un efflux de  $\text{K}^+$  déclenché par un éliciteur de type oligogalacturonide chez les cellules de tabac. Dans ce contexte, notre objectif était d'identifier le canal responsable de la conductance potassique sortante et de préciser la sensibilité à l'éliciteur de ce canal.

Nous avons caractérisé un canal potassique rectifiant sortant sur la membrane des protoplastes de ces cellules, et montré que ce canal était potentiellement capable de conduire l'efflux de  $K^+$  déclenché par l'éliciteur. Par contre, nous n'avons pu obtenir aucun indice suggérant une sensibilité directe du canal à l'éliciteur. Cela pourrait signifier que l'activité du canal est affectée de façon indirecte par l'éliciteur et/ou que le signal déclenché par l'éliciteur en direction du canal ne "passe" pas chez les protoplastes, parce que le traitement enzymatique permettant de digérer le squelette pariétal détruit certains éléments impliqués dans la transmission de ce signal. Ces résultats ont été présentés et discutés dans le mémoire de DEA de Sébastien Thomine ("Contribution à la caractérisation des unités de transport de la membrane plasmique impliquées dans les flux de potassium et de protons induits par les oligogalacturonides chez les cellules de tabac", 1992).

Dans le prolongement de cette étude, nous avons procédé à une caractérisation pharmacologique du canal potassique rectifiant sortant, identifié sur la membrane des cellules de tabac en culture (Thomine *et al.*, 1994; **Publication 21**). Nous avons ainsi mis en évidence une sensibilité de ce canal potassique à des composés (vérapamil, nifédipine ou bépridil), habituellement utilisés pour inhiber les canaux calciques dans les cellules animales.

### II.2.2. Caractérisation du canal anionique TSAC des cellules de tabac en culture

Parallèlement au travail de caractérisation du canal  $K^+$  résumé dans le paragraphe précédent, nous avons analysé la conductance anionique de la membrane des cellules de tabac en culture (Zimmermann *et al.*, 1994; **Publication 20**). En mode cellule entière, nous avons mis en évidence un courant activé par le voltage, présentant un maximum d'intensité à une valeur de potentiel voisine de -90 mV et un potentiel de réversion proche du potentiel d'équilibre de  $Cl^-$  (seul anion perméant présent dans les solutions d'enregistrement). Un enregistrement typique de ce courant est présenté sur la figure 3. Nous avons montré que la substitution de  $Cl^-$  par un anion imperméant (le glutamate) provoque une inhibition du courant, apportant ainsi la preuve que le canal conduisant ce courant présente une sélectivité en faveur des anions. Cette sélectivité en faveur des anions a été confirmée par une analyse en mode "canal unique" : le potentiel de réversion déterminé à partir de la courbe courant-voltage correspond au potentiel d'équilibre de  $Cl^-$ . La conductance unitaire du canal est voisine de 15 pS (en présence de  $Cl^-$  150/100 mM interne/externe). Ce canal a été appelé TSAC (pour *Tobacco Suspension Anion Channel*). TSAC a été le premier canal anionique caractérisé dans une cellule végétale autre que la cellule de garde (Marten *et al.*, 1991; Schroeder & Keller, 1992). TSAC présente des cinétiques d'activation et de désactivation rapides (constantes de temps de l'ordre de la milliseconde) et une inactivation lente (secondes). La régulation de l'activité du canal par le voltage traduit essentiellement un phénomène d'activation par la dépolarisation (ou, ce qui revient au même, une désactivation par l'hyperpolarisation). Le seuil d'activation est voisin de -120 mV. Nous avons observé deux ensembles de résultats particulièrement intéressants concernant la régulation de ce canal, ceux-ci sont présentés de façon simplifiée par la figure 3. Premièrement, en supprimant l'ATP (*i.e.* pas d'ATP dans le contenu de la pipette) et en utilisant des inhibiteurs de kinases (staurosporine; Ruegg & Burgess, 1989) ou de phosphatases (okadaic acide; Cohen *et al.*, 1990), nous avons montré que la sensibilité au voltage du canal (vitesse de désactivation à l'hyperpolarisation) est dépendante de

phénomènes de phosphorylation-déphosphorylation du canal lui-même ou de protéines régulatrices (Figure 3). Deuxièmement, l'addition d'auxine (1-NAA) dans le milieu (ou d'un anticorps agoniste de l'auxine, D16, *i.e.* reconnaissant un site de liaison de l'auxine ABP1; Venis *et al.*, 1992; Rück *et al.*, 1993) provoque une modification de la sensibilité au voltage du canal, se traduisant par un déplacement du seuil d'activation vers des valeurs de potentiel plus négatives (Figure 3). En conclusion, le canal TSAC pourrait voir son activité régulée par phosphorylation-déphosphorylation à l'intérieur d'une chaîne de transduction d'un signal déclenché par la présence d'auxine sur la face externe de la membrane.

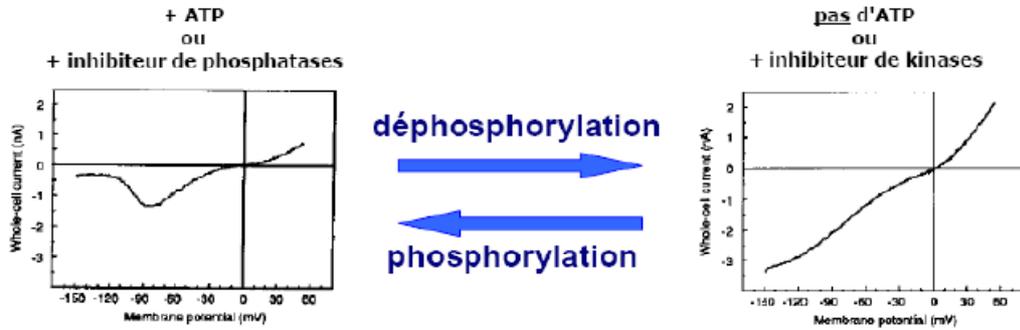
Dans le prolongement de ce travail, nous avons étudié l'effet de différents agents provoquant une dépolarisation de la membrane (deux éliciteurs, un inhibiteur de la (H<sup>+</sup>)ATPase membranaire - le vanadate -, des inhibiteurs du métabolisme énergétique) sur l'efflux de Cl<sup>-</sup>. Nous avons observé que tous ces traitements provoquent un efflux de Cl<sup>-</sup>, en accord avec les données établies précédemment indiquant que le canal TSAC est activé par la dépolarisation. Cependant les résultats obtenus se sont révélés complexes. D'une part, l'intensité de l'efflux de Cl<sup>-</sup> déclenché par le traitement dépolarisant n'est pas corrélée à l'intensité de la dépolarisation (*i.e.* des dépolarisations d'amplitudes comparables peuvent être accompagnées d'efflux significativement différents). D'autre part, l'analyse pharmacologique a révélé des distorsions entre la sensibilité du canal TSAC à des inhibiteurs classiques des canaux anioniques et la sensibilité de l'efflux de Cl<sup>-</sup> à ces mêmes inhibiteurs (*e.g.* l'acide éthacrinique est pratiquement sans effet sur le canal TSAC, mais bloque fortement l'efflux de Cl<sup>-</sup> déclenché par les traitements dépolarisants). Ces résultats (Zimmermann *et al.*, 1998a; **Publication 13**) indiquent probablement que le niveau d'activation du canal du TSAC n'est pas le déterminant unique de l'efflux de Cl<sup>-</sup> induit par une dépolarisation du plasmalemme. Par exemple, l'intensité de l'efflux pourrait dépendre également de l'activité d'autres canaux (anioniques et/ou cationiques) sur le tonoplaste, assurant une remobilisation des pools d'ions vacuolaires.

### II.3. Caractérisation d'un canal anionique exprimé dans les cellules épidermiques de l'hypocotyle d'*Arabidopsis*

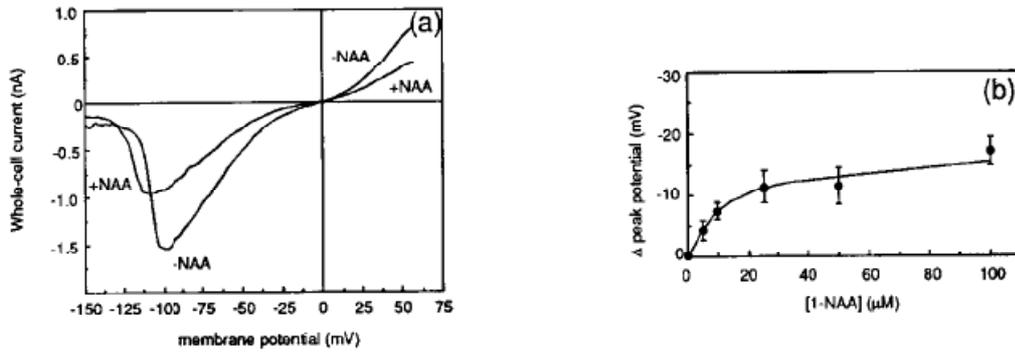
*Arabidopsis* était encore un modèle très largement ignoré des électrophysiologistes lorsque l'équipe de Gif-sur-Yvette a démarré ce travail "pionnier" (Thèse de Sébastien Thomine). La mise au point d'un protocole de préparation de protoplastes d'épiderme d'hypocotyle d'*Arabidopsis* nous a permis d'identifier un nouveau canal, présentant certaines caractéristiques évoquant celles du canal TSAC caractérisé chez le tabac (II.2.2).

En résumé, le canal anionique caractérisé chez *Arabidopsis* présente deux modes de fonctionnement selon la présence ou l'absence d'ATP. En présence d'ATP, le canal fonctionne selon un mode "rapide" (mode du type "R - *rapid*" du canal anionique GCAC1 caractérisé sur la membrane de la cellule de garde de *Vicia faba*; Hedrich *et al.*, 1990). Le canal est fermé au potentiel de repos et s'active rapidement dès que la membrane se dépolarise. Lorsque le potentiel de membrane est ramené vers des valeurs plus négatives, le canal se désactive rapidement, et de plus en plus complètement au fur et à mesure que le potentiel devient plus négatif. En absence d'ATP, le canal se met à fonctionner selon un mode "lent" (mode du type "S - *slow*"; Linder & Raschke, 1992; Schroeder & Keller, 1992; Frachisse *et al.*, 2000), *i.e.* après avoir été activé par une

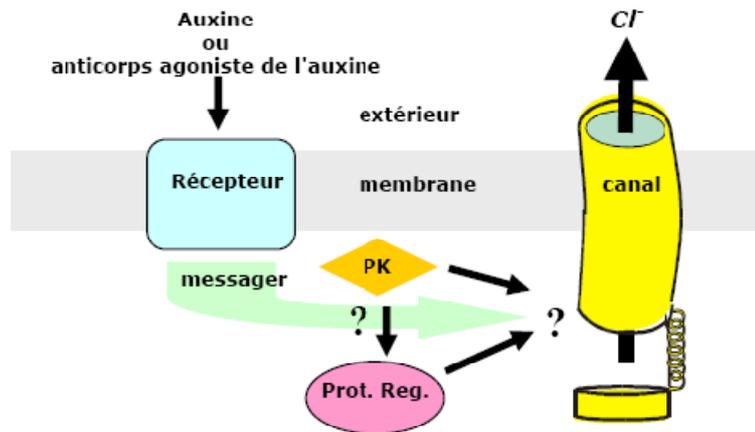
**A Régulation du canal anionique TSAC par phosphorylation / déphosphorylation**



**B Effet de l'auxine sur le potentiel d'activation du canal anionique TSAC**



**C Interprétation et modèle**



**Figure 3.** Régulation de l'activité du canal anionique voltage-dépendant TSAC (TSAC = Tobacco Suspension Anion Channel) par phosphorylation et l'auxine (Zimmermann *et al.*, 1994). Le canal TSAC caractérisé sur la membrane de cellules de tabac en culture est activé par la dépolarisation. **(A)** Le voltage dépendance de TSAC est régulé par les nucléotides et / où des évènements de phosphorylation (directe où indirecte). **(B)** L'addition d'auxine dans le milieu extérieur provoque un déplacement du potentiel d'activation du canal vers les valeurs de potentiel plus négatives. Le canal est ouvert par une dépolarisation de la membrane. En absence d'auxine, le potentiel d'activation du canal est voisin de -120 mV (trace -NAA sur le panneau a). L'addition d'une forme active d'auxine (1-NAA 10  $\mu$ M) dans le milieu provoque un déplacement du potentiel d'activation du canal et de la position pic de courant (trace +NAA). Ce phénomène n'est pas observé avec la forme d'auxine inactive 2-NAA (inactive sur la polarisation membranaire, Barbier-Brygoo *et al.*, 1991). Par contre, il s'observe en présence d'un anticorps agoniste de l'auxine (dirigé contre un site de liaison de cette hormone). L'amplitude du déplacement du pic de courant vers les potentiels plus négatifs par l'auxine (1-NAA) dépend de la concentration de cette hormone dans le milieu (panneau b). Concentration de Cl<sup>-</sup>: 154/110 mM, int/ext. **(C)** Interprétation. Les canaux anioniques peuvent être des carrefours entre différents réseaux de signalisation. Le signal hormonal est perçu sur la face externe de la membrane puisque l'anticorps exerce un effet comparable à celui de l'auxine sur l'activité du canal TSAC. On imagine que le site de perception du signal est un récepteur membranaire. Cette chaîne pourrait intégrer des mécanismes de phosphorylation précédemment repérés comme impliqués dans la régulation du potentiel d'activation du canal.

dépolarisation de la membrane, le canal ne se désactive que très lentement et de façon incomplète lorsque le potentiel de membrane est ramené vers des valeurs négatives. Ces résultats, obtenus en mode "cellule entière" (*i.e.* analyse des courants macroscopiques), ont été complétés par une analyse en mode canal unique. La présence d'ATP module la durée moyenne de l'état ouvert et de l'état fermé du canal lors d'une hyperpolarisation de la membrane, contrôlant ainsi la probabilité de l'état ouvert du canal. Cette correspondance entre les observations faites en mode "cellule entière" et en mode "canal unique" constitue un argument supplémentaire appuyant l'hypothèse que les courants observés ne sont pas conduits par deux canaux différents mais par un canal unique, fonctionnant sous deux modes différents (Thomine *et al.*, 1995; **Publication 19**). L'analyse des caractéristiques et de la régulation de ce canal a été poursuivie par Sébastien Thomine après mon départ de Gif-sur-Yvette (Thomine *et al.*, 1997).

### III Identification moléculaire de canaux végétaux & leur caractérisation dans les systèmes d'expression hétérologue (Golm & Montpellier)

Entre 1995 et 2000, j'ai travaillé dans l'équipe de Bernd Müller-Röber (*Junior Research Group*), à l'Institut Max-Planck de Golm (*Molecular Plant Physiology*, direction: Lothar Willmitzer). L'objectif principal de notre travail a été l'identification des canaux végétaux au niveau moléculaire et leur caractérisation par expression fonctionnelle dans les systèmes hétérologues comme les cellules d'insectes et les ovocytes de grenouille. A Golm, j'ai travaillé sur les canaux potassiques de type *Shaker* (III.1.) chez la pomme de terre (III.1.1. & III.2.) et chez la tomate (III.1.1.2.), sur les canaux potassiques de type double-pore chez *Arabidopsis thaliana* (III.3.). En plus, nous avons essayé d'identifier de nouveaux canaux par clonage via expression fonctionnelle dans les ovocytes de *Xenopus* (III.4.). En continuité de mon travail sur les canaux *Shaker*, j'ai participé à Montpellier à la découverte de propriétés fonctionnelles du dernier membre de cette famille chez *Arabidopsis thaliana*, AKT6, en l'exprimant dans les protoplastes de tabac (III.1.2.).

#### III.1. Les canaux potassiques végétaux de type *Shaker*

La croissance de la plante nécessite que le  $K^+$  soit prélevé en quantité importante à partir du sol, puis distribué dans les différents compartiments, tissus et organes. Chez *Arabidopsis*, les analyses *in silico* indiquent que ces fonctions de transport sont assurées par au moins 35 gènes de canaux ou transporteurs, se regroupant en 5 familles (Mäser *et al.*, 2001; Szczerba *et al.*, 2009). La famille la mieux caractérisée est celle constituée par les canaux potassiques *Shaker* (Pilot *et al.*, 2003). Les données actuelles obtenues par génétique inverse indiquent que les canaux *Shaker* dominent la conductance potassique de la membrane cellulaire dans probablement tous les tissus et types cellulaires de la plante. Ces canaux contribuent donc de façon majeure aux différents transports de  $K^+$  dans la plante.

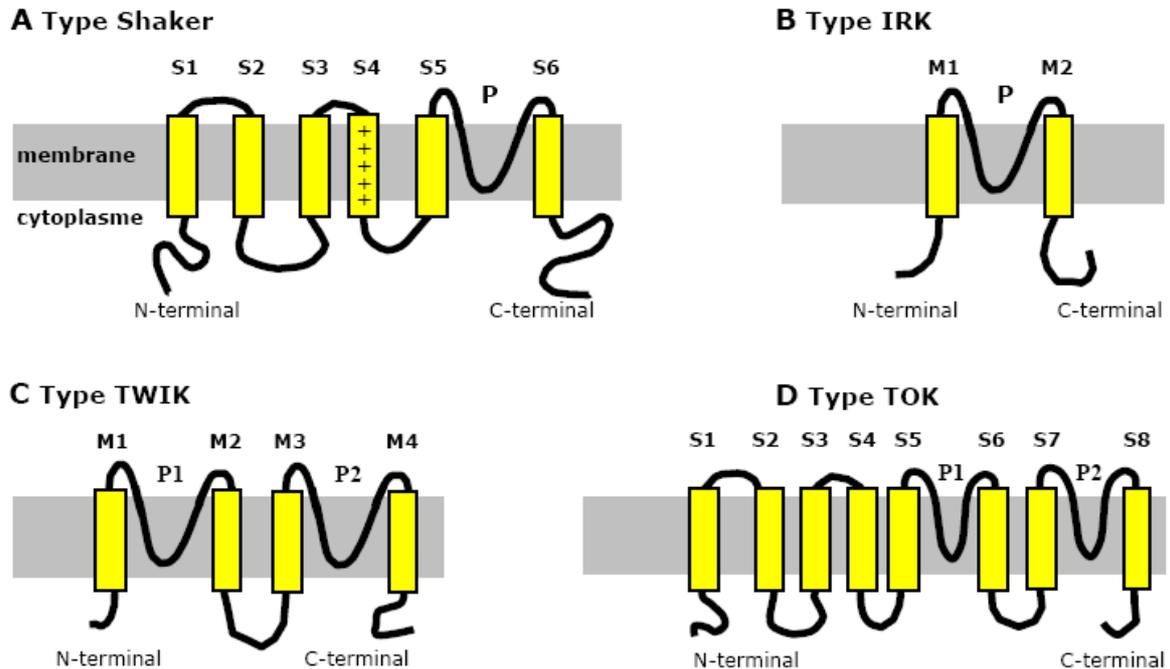
Les premiers canaux potassiques identifiés chez les végétaux, KAT1 et AKT1 (Anderson *et al.*, 1992; Sentenac *et al.*, 1992) font partie de la super-famille *Shaker*, dont les premiers membres ont été clonés chez la drosophile (Papazian *et al.*, 1987). Tous les canaux potassiques identifiés à ce jour, chez les animaux ou chez les végétaux, sont caractérisés par la présence d'un domaine très conservé, appelé P ("pore"). Ce domaine joue un rôle majeur dans la

structuration du pore aqueux du canal et le contrôle de la sélectivité ionique. Le canal est une structure multimérique (tétramérique). Quatre domaines P s'assemblent pour former le pore (Doyle *et al.*, 1998). Les différents canaux se distinguent par le nombre de domaines P présents par polypeptide (1 ou 2), et le nombre de segments transmembranaires (2, 4, 6 ou 8). Sur la base de ces critères, quatre types de structures secondaires peuvent être définis (Jan & Jan, 1997), définissant 4 familles appelées *Shaker*, IRK, TWIK et TOK. Les structures correspondantes sont présentées sur la figure 4. Les polypeptides *Shaker* présentent de façon caractéristique six segments transmembranaires, appelés S1 à S6, dont un, S4, présente des charges positives et constitue un "voltage senseur".

Chez les plantes, les premiers canaux KAT1 (78 kDa) et AKT1 (97 kDa) ont été clonés par complémententation fonctionnelle de mutants de levure déficients pour le transport de  $K^+$  (gènes *TRK1* et *TRK2* inactivés) (Anderson *et al.*, 1992; Sentenac *et al.*, 1992). Ces deux canaux sont caractérisés par la présence d'un domaine hydrophobe constitué de 6 segments transmembranaires S1 à S6 (S4 ayant une charge électrique nette positive), et d'un domaine P entre S5 et S6. En aval du domaine hydrophobe, les deux canaux présentent un site potentiel de fixation des nucléotides cycliques. AKT1 possède un domaine ankyrine (système d'interaction protéine-protéine) en aval du domaine de fixation des nucléotides cycliques. Les homologues de séquence entre les deux canaux reprennent en aval du domaine ankyrine d'AKT1, définissant un nouveau domaine, appelé  $K_{HA}$ , que notre équipe a identifié comme impliqué dans un phénomène de "regroupement" (clusterisation) des canaux sur certains sites de la membrane (Ehrhardt *et al.*, 1997; III.2.). Les structures particulières des canaux des types AKT et KAT sont représentées sur la figure 4A.

Les programmes de séquençage systématique, mais aussi différentes stratégies de clonage, ont révélé de nombreux autres canaux apparentés à AKT1 ou KAT1, chez *Arabidopsis* (III.1.2.) et chez d'autres plantes comme la pomme de terre et la tomate (III.1.1.; Figure 5). Les caractéristiques fonctionnelles de certains de ces canaux ont été analysées *via* les techniques d'électrophysiologie (courants macroscopiques et "single channel") en système hétérologue (Dreyer *et al.*, 1999). Il est important de noter que, dans ce domaine, il faut pouvoir disposer de plusieurs systèmes d'expression (ovocyte de xénope, cellule d'insecte, cellule de mammifère de type COS), parce que certains canaux s'expriment dans un système d'expression mais pas dans un autre. C'est, par exemple, le cas d'AKT1, qui a pu être caractérisé dans les cellules d'insecte (Gaymard *et al.*, 1996) et dans la levure (Bertl *et al.*, 1997) mais pas dans l'ovocyte de xénope. Récemment, les partenaires interagissant avec AKT1 ont été identifiés, la kinase  $Ca^{2+}$  dépendante CIPK23 et les protéines calcineurine B-like CBL1 & 9 (Li *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006). Leur co-expression avec le canal AKT1 en ovocytes permet le fonctionnement de ce canal aussi dans ce système hétérologue et indique que la phosphorylation joue un rôle important dans la régulation du canal. En plus, ces résultats récents montrent bien l'implication de canaux ioniques dans les réseaux de signalisation.

L'ensemble des données électrophysiologiques disponibles chez *Arabidopsis* indiquent que les canaux de type *Shaker* sont régulés par le voltage. Certains (KAT1; AKT1; Schachtman *et al.*, 1992; Gaymard *et al.*, 1996) sont du type *rectifiant entrant* (activés par l'hyperpolarisation, autorisant de ce fait un influx de  $K^+$ ). D'autres (canaux SKOR & Gork d'*Arabidopsis*, Gaymard *et al.*, 1998; Hosy *et al.*, 2003) sont du type *rectifiant sortant* (activés par la



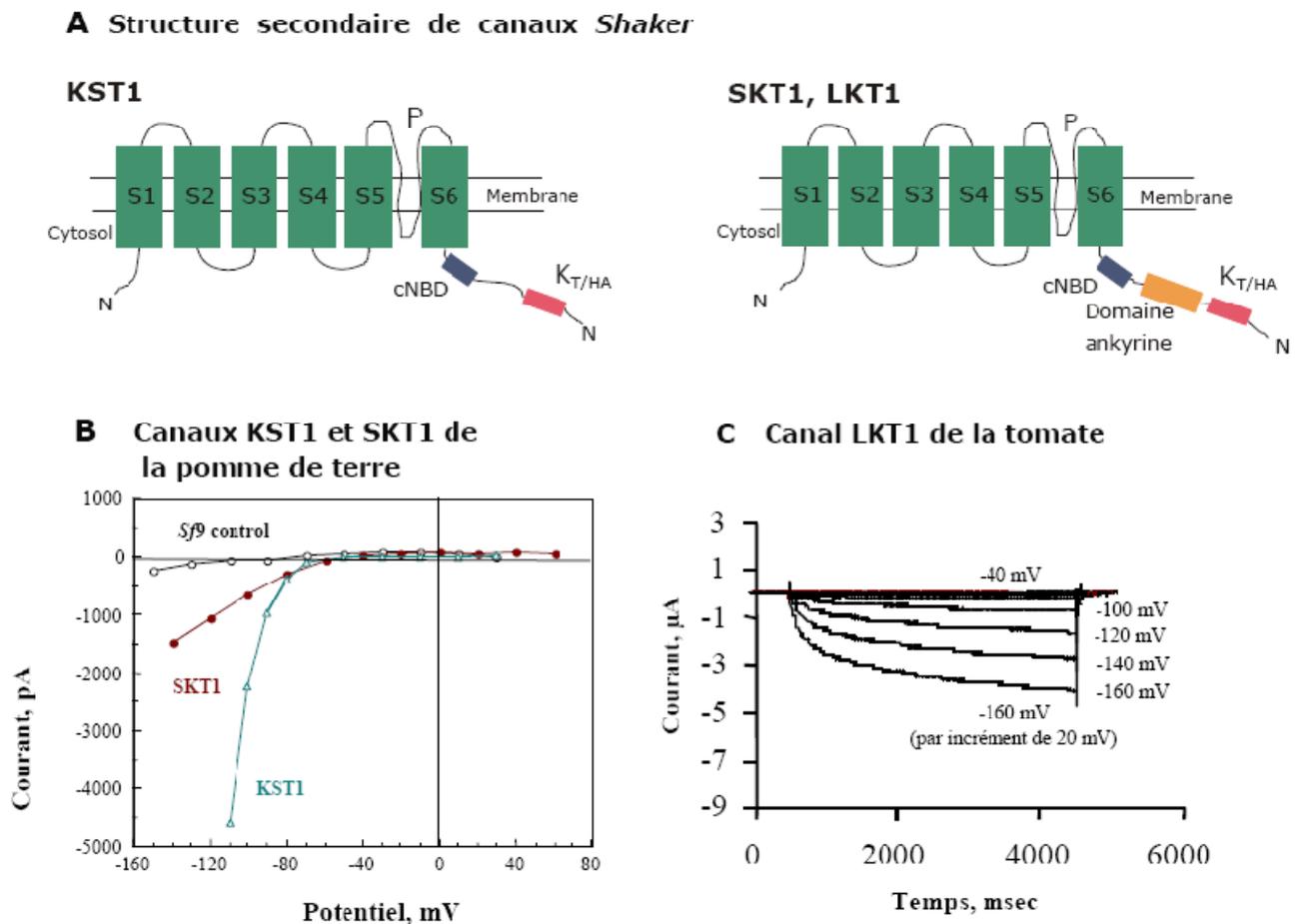
**Figure 4.** Structure secondaire des canaux potassiques. Tous les canaux  $K^+$  clonés à ce jour, chez les bactéries, les animaux ou les végétaux, sont caractérisés par la présence d'un ou deux domaines membranaires appelés P (ou H5), très conservés. Le canal fonctionnel est une structure multimérique, et 4 domaines P s'assemblent pour former le pore aqueux de la protéine. Quatre familles multigéniques de canaux sont distinguées. **(A)** Canaux de type *Shaker*. Les canaux *Shaker* présentent six segments transmembranaires (classiquement appelés S1 à S6) et un domaine P (présent entre S5 et S6). Le domaine S4 possède plusieurs résidus chargés positivement (K ou R, symbolisés par les signes "+"). Ce domaine constitue le siège de la sensibilité au voltage du canal (les mouvements de S4 provoqués par les variations du gradient de potentiel électrique transmembranaire conduisent à des changements conformationnels qui ouvrent ou ferment le canal). Les canaux de type *Shaker* sont activés ("gated") par le voltage, et/ou les nucléotides cycliques et/ou  $Ca^{2+}$ . Le premier canal *Shaker* a été cloné chez la drosophile (Papazian *et al.*, 1987). Chez *Arabidopsis*, une dizaine de canaux de type *Shaker* ont été identifiés à ce jour (données publiées ou issues du séquençage systématique). Notre équipe (MPI, Golm) a caractérisé, via le système d'expression baculovirus/cellule d'insecte, deux canaux de type *Shaker* de la pomme de terre et de la tomate (Ehrhardt *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 1998b; Hartje *et al.*, 2000; Cf. Rapport sur les travaux effectués). **(B)** Canaux de type IRK. Ces canaux (deux segments transmembranaires, classiquement appelés M1 et M2, et un domaine P) ont été clonés initialement chez la souris et le rat (Kubo *et al.*, 1993). La structure d'un canal bactérien de ce type a été déterminée récemment par cristallographie (Doyle *et al.*, 1998). Notre équipe a cloné le premier canal présentant ce type structure chez les plantes (chez *Arabidopsis*: Czempinski *et al.*, 1999). **(C)** Canaux de type TWIK. Ces canaux (4 segments transmembranaires, M1 à M4, et 2 domaines P) ont été clonés initialement chez l'homme (Lesage *et al.*, 1996). Notre équipe a cloné et caractérisé le premier canal végétal de ce type (canal KCO1 cloné chez *Arabidopsis*: Czempinski *et al.*, 1997; Cf. Rapport sur les travaux effectués). **(D)** Canal TOK1. Un seul canal de ce type est connu actuellement. Il a été cloné chez *Saccharomyces cerevisiae* (Ketchum *et al.*, 1995). Il présente 8 segments transmembranaires et 2 domaines P, évoquant la structure d'un canal de type *Shaker* (sans charge positive dans S4) en tandem avec un canal de type IRK.

dépolarisation et autorisant un efflux de  $K^+$ ), et AtKC1 est une sous-unité régulatrice des autres canaux entrants (Duby *et al.*, 2008; Jeanguenin *et al.*, 2008; Jeanguenin *et al.*, soumis). La fonction de différents canaux d'*Arabidopsis*, AKT1, KAT1, SPIK, SKOR, ou GORK, a pu être établie par des approches de type génétique inverse. AKT1 est exprimé dans les tissus périphériques de la racine, où il participe à la fonction de prélèvement de  $K^+$  à partir de la solution du sol (Hirsch *et al.*, 1998; Rubio *et al.*, 2008). KAT1 est présent dans les cellules de garde, où il conduit l'influx de  $K^+$  qui permet l'ouverture des stomates (Ichida *et al.*, 1997; Lebaudy *et al.*, 2008). Le canal rectifiant sortant GORK, exprimé également dans les cellules de garde, est responsable de l'efflux de  $K^+$  impliqué dans la fermeture des stomates (Ache *et al.*, 2000; Hosy *et al.*, 2003). SKOR est exprimé dans les tissus stélaires de la racine et participe à la sécrétion de  $K^+$  dans la sève xylémique (Gaymard *et al.*, 1998). Le canal entrant SPIK, exprimé dans le pollen, est responsable de la turgescence nécessaire à l'élongation des tubes polliniques (Mouline *et al.*, 2002).

### III.1.1. Identification de canaux de type *Shaker* chez la pomme de terre et la tomate

#### III.1.1.1. Les canaux KST1 et SKT1, 2 & 3 identifiés chez la pomme de terre

Le criblage à basse stringence d'une banque d'ADNc préparés à partir de fragments d'épiderme de feuilles de pomme de terre enrichis en cellules de garde a conduit à l'identification d'un canal de type KAT1, qui est appelé KST1. L'analyse du profil d'expression *in planta* et des caractéristiques fonctionnelles de KST1 a mené à la conclusion que ce canal correspond probablement au canal rectifiant entrant majeur de la cellule de garde (Müller-Röber *et al.*, 1995). Une stratégie comparable a ensuite conduit à l'identification d'un canal de type AKT1, que nous avons appelé SKT1. La séquence codant la région C-terminale du canal KST1 a ensuite été utilisée comme amorce pour cribler une banque d'ADNc de pomme de terre *via* le système du double hybride dans la levure. Ce travail a été initialement démarré dans la perspective d'identifier des protéines interagissant avec KST1 et en régulant l'activité. Cela a conduit à l'identification de nouveaux canaux (Ehrhardt *et al.*, 1997; III.2.). Le clonage de canaux par cette approche constitue un argument en faveur de l'hypothèse (Dreyer *et al.*, 1997) que les canaux de type *Shaker* végétaux pourraient former, comme certains de leurs homologues animaux, des structures hétéro-multimériques. En fait, les canaux animaux *Shaker* ont une structure tétramérique. De nombreuses données ont révélé que des sous-unités  $\alpha$  codées par des gènes différents, mais appartenant à des sous-familles compatibles, peuvent s'associer et former des canaux hétérotétramériques. Ce phénomène a probablement pour fonction d'accroître la diversité fonctionnelle des courants potassiques sur la membrane cellulaire. Les canaux végétaux de type *Shaker* ont eux aussi une structure tétramérique. La région C-terminale cytoplasmique en aval du domaine transmembranaire est impliquée dans le processus de tétramérisation (Figure 5, Cf. Figures 7 & 8). A ce jour, de nombreuses études suggèrent que le phénomène d'hétéromultimérisation décrit dans les cellules animales pourrait se produire également dans les cellules végétales (Dreyer *et al.*, 1997; Xicluna *et al.*, 2007; Duby *et al.*, 2008; Jeanguenin *et al.*, 2008; Lebaudy *et al.*, 2008). Ainsi, notre opération de criblage avec la région C-terminale de KST1 comme appât dans le



**Figure 5.** Exemples de caractérisation fonctionnelle de différents canaux potassiques végétaux de type *Shaker*. **(A)** Structures secondaires de canaux *Shaker* KST1, SKT1 et LKT1. SKT1 et KST1 sont deux canaux potassiques de type *Shaker* identifiés chez la pomme de terre. Le premier appartient à la sous-famille AKT et le second à la sous-famille KAT (respectivement présence et absence du domaine ankyrine). Ces deux canaux ont été clonés à partir d'une banque d'ADNc préparée à partir de fragments d'épiderme de feuilles enrichis en cellules de garde. Le canal LKT1 de la sous-famille AKT a été cloné par criblage d'une banque d'ADNc préparée à partir de poils absorbants de racines de tomate. **(B)** Canaux KST1 et SKT1 exprimés dans des cellules d'insecte (Ehrhardt *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 1998b). La figure présente les courbes courant-voltage obtenues dans des cellules Sf9 (concentration de  $K^+$ : 150/30 mM, int./ext.). Ces courbes indiquent que les deux canaux sont du type rectifiant entrant. Le potentiel d'activation de SKT1 (valeur de potentiel à partir duquel le canal commence à s'ouvrir et à conduire un flux d'ions) est voisin de -60 mV. Celui de KST1 est plus négatif, voisin de -80 mV. KST1 présente des caractéristiques fonctionnelles qui évoquent fortement celles du canal  $K^+$  entrant majeur de la cellule de garde de pomme de terre (Müller Röber *et al.*, 1995). **(C)** Canal LKT1 exprimé dans des ovocytes de xénope (Hartje *et al.*, 2000). La figure montre les traces des courants par LKT1 exprimé dans l'ovocyte de xénope, en réponse à des épisodes d'hyperpolarisation successifs de la membrane (valeurs de potentiel indiquées en regard des cinétiques; concentration de  $K^+$  externe : 119 mM). Les résultats montrent que le canal est du type rectifiant entrant. Il s'active avec une cinétique relativement lente (>4 secondes pour atteindre l'état stationnaire) à l'hyperpolarisation (potentiel d'activation voisin de -50 mV), et ne s'inactive pas. Dans les poils absorbants, LKT1 pourrait participer à la fonction de prélèvement de  $K^+$  à partir du sol.

système du double hybride a conduit au clonage de nouveaux canaux potassiques.

Les canaux clonés chez la pomme de terre ont été appelés SKT1, 2 et 3 ou KST1 selon qu'ils appartiennent aux sous-familles définies respectivement par les canaux AKT1 (présence d'un domaine ankyrine) ou KAT1 d'*Arabidopsis*. Notre objectif a été de fournir une analyse des caractéristiques fonctionnelles de ces canaux. A ce jour, les seules données publiées concernent KST1, caractérisé par Rainer Hedrich dans les ovocytes dans le cadre d'une collaboration avec Bernd Müller-Röber, avant mon arrivée dans l'équipe, et par nous-mêmes ensuite dans les cellules d'insecte (Müller-Röber *et al.*, 1995; Ehrhardt *et al.*, 1997), et le canal SKT1 (Zimmermann *et al.*, 1998b) en utilisant le système d'expression baculovirus-cellule d'insecte. Les premières données obtenues par le groupe de Rainer Hedrich avec lequel notre équipe a collaboré suggéraient que ce canal ne s'exprimait pas sous forme fonctionnelle dans l'ovocyte de xénope. Les résultats obtenus indiquent que SKT1 est un canal de type rectifiant entrant (potentiel d'activation voisin de -60 mV). La figure 5B montre une courbe courant-voltage obtenue pour ce canal. L'article publié (Zimmermann *et al.*, 1998b; **Publication 12**) présente essentiellement une analyse du courant macroscopique conduit par SKT1 (cinétiques d'activation, sélectivité ionique), ainsi que des données pharmacologiques (blocage par Cs<sup>+</sup>) et une étude de l'effet du pH externe sur l'activité du canal. Le canal est activé par une acidification du milieu extérieur. Ce phénomène pourrait participer à la régulation de la vitesse de prélèvement de K<sup>+</sup> par la cellule. L'interprétation retenue pour ce type d'observation est que l'acidification du milieu apoplasmique par la (H<sup>+</sup>)ATPase membranaire (Sentenac & Grignon, 1987; Grignon & Sentenac, 1991) favoriserait l'absorption de K<sup>+</sup> *via* les canaux de ce type sensibles au pH externe.

Il faut noter que le canal SKT1 ne complète pas les souches de levures déficientes pour le transport de K<sup>+</sup> utilisées pour le clonage de KAT1 et d'AKT1. Cependant, après la caractérisation de SKT1 dans les cellules d'insecte, d'autres expériences en ovocytes ont révélé qu'une modification de la préparation du plasmide d'expression après linéarisation a permis d'obtenir des ARNc dont l'injection dans l'ovocyte conduit à l'expression d'un canal fonctionnel (*Cf.* III.1.1.2. Hartje *et al.*, 2000; III.2. Zimmermann *et al.*, 2001).

En comparant les propriétés de KST1 exprimé dans les cellules d'insecte ou dans des ovocytes, nous avons montré que certaines caractéristiques de ce canal (*e.g.* sensibilité à Cs<sup>+</sup>) sont affectées par le système d'expression utilisé (Zimmermann *et al.*, 1998b). Ce phénomène est classique (Véry *et al.*, 1995) et pose la question de la signification des données obtenues en système hétérologue, par rapport aux caractéristiques réelles du canal dans sa cellule d'origine (Dreyer *et al.*, 1999; **Publication 11**).

#### III.1.1.2. Le canal LKT1 identifié chez la tomate

Ce travail a été l'objet d'une collaboration avec une autre équipe de l'institut MPI (Drs. D. Klonus et J. Riesmeier). Cette équipe a construit une banque d'ADNc préparés à partir de poils absorbants de racine de tomate, et criblé cette banque à l'aide de sondes dérivées de canaux potassiques d'*Arabidopsis*. Ce travail a conduit au clonage d'un canal appelé LKT1, appartenant à la sous-famille AKT.

LKT1 est exprimé principalement dans les racines, et particulièrement dans les poils absorbants, comme son homologue AKT1 chez *Arabidopsis*. L'analyse de plantes transgéniques d'*Arabidopsis* exprimant le gène rapporteur *GUS* sous le contrôle de la région promotrice d'*AKT1* avait révélé que ce canal est exprimé

dans les poils absorbants (ainsi que dans l'épiderme et le cortex racinaire) (Lagarde *et al.*, 1996). Une preuve fonctionnelle de la présence de canaux potassiques sur le plasmalemme des poils absorbants avait déjà été apportée par des approches électrophysiologiques *in situ* (e.g. Gassmann & Schroeder, 1994). Le rôle joué par les poils absorbants dans la fonction de prélèvement n'est pas encore parfaitement précisé. Il est clair que l'une de leurs fonctions est de fortement augmenter le volume de sol exploré par la racine. Cependant, pour certains auteurs, les poils absorbants auraient une fonction de "senseur" de la concentration des ions nutritifs dans le sol, mais ne seraient pas impliqués directement dans l'absorption des ions (Duckett *et al.*, 1994). D'autres données viennent par contre de révéler une implication directe des poils absorbants dans le prélèvement de phosphate par la racine (Gahoonia & Nielsen, 1998).

L'objectif de notre collaboration avec D. Klonus et J. Riesmeier a été la caractérisation fonctionnelle du canal LKT1 (Hartje *et al.*, 2000; **Publication 7**). Nous avons obtenu une expression fonctionnelle de ce canal dans l'ovocyte de xénope. La figure 5C présente des enregistrements de courant obtenus pour ce canal en réponse à des épisodes successifs d'hyperpolarisation de la membrane. Ces enregistrements indiquent que LKT1 est un canal rectifiant-entrant, s'activant lorsque le potentiel devient plus négatif que -50 mV. Ce phénomène de rectification traduit une sensibilité intrinsèque du canal au voltage (et non un blocage du courant sortant par  $Mg^{2+}$ ). Les cinétiques d'activation sont relativement lentes (Figure 5C). L'analyse de la séquence de sélectivité révèle que le canal LKT1 est très sélectif de  $K^+$ . Comme SKT1, son activité est stimulée par une acidification du milieu extérieur (ce phénomène qui joue probablement un rôle dans le contrôle de la vitesse de prélèvement de  $K^+$  par le poil absorbant).

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'aluminium sur l'activité de LKT1. Dans les sols acides, la concentration de  $Al^{3+}$  peut atteindre un niveau toxique et limiter la production de biomasse. Cette toxicité résulte, au moins en partie, d'effets néfastes sur la croissance des racines et l'absorption de  $K^+$  (Huang *et al.*, 1992; Ryan *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1995). En relation avec cette question, une analyse électrophysiologique conduite chez le blé a révélé la présence de canaux potassiques bloqués par  $Al^{3+}$  sur la membrane des poils absorbants (Gassmann & Schroeder, 1994). Nous n'avons observé, pour notre part, aucun effet de  $Al^{3+}$  sur l'activité du canal LKT1.

### III.1.2. Révélation des propriétés fonctionnelles du dernier canal de type *Shaker*, AKT5, chez *Arabidopsis thaliana* (Montpellier)

La famille de canaux potassiques de type *Shaker* d'*Arabidopsis* compte 9 gènes, dont 8 ont une fonction relativement bien précisée dans la plante (Lebaudy *et al.*, 2007; Cf. III.1.). Ce sont *AKT1*, *AKT2*, *SPIK*, *KAT1*, *KAT2*, *AtKC1*, *GORK* et *SKOR*. Un seul gène, *AKT5* (at4g32500), n'a pas encore été caractérisé, ni sur le plan fonctionnel, ni sur le plan physiologique. De façon intéressante, ce gène est le seul de la famille des canaux *Shaker* à être exprimé dans la graine (données obtenues dans l'équipe; Mouline, 2002). Dans la graine, la mise en réserve du potassium puis sa remobilisation sont cruciales pour la germination et le développement de la plantule (Zerche & Ewald, 2005). Malgré l'importance de ces processus, les systèmes de transport de  $K^+$  dans la graine sont encore totalement inconnus à ce jour. En général, il existe très peu d'études sur la nutrition minérale des graines (Chopin *et al.*, 2007).

L'objectif de ce travail, conduit récemment à Montpellier avec deux étudiantes en stage M2, est de préciser les propriétés fonctionnelles du canal AKT5 et le rôle que ce canal joue dans la physiologie de la graine chez *Arabidopsis*.

### III.1.2.1. Caractérisation fonctionnelle du canal AKT5 par expression dans les protoplastes du tabac

Les tentatives d'expression dans des systèmes hétérologues classiques et de caractérisation des propriétés fonctionnelles du canal AKT5 avaient jusqu'alors toutes échoué. Nous avons ainsi exploré la possibilité d'utiliser la transformation transitoire de protoplastes de mésophylle de tabac (Hosy *et al.*, 2005; Duby *et al.*, 2008) pour caractériser les propriétés fonctionnelles d'AKT5 par patch-clamp. Cet objectif a été atteint (travail débuté par Christiane Koziolok et projet de Laetitia Kroniewicz & Magali DiPietro dans le cadre de leur stages Master2R en 2007 & 2008). Les vecteurs utilisés pour ce travail permettent une co-expression de la protéine d'intérêt et de la GFP (Figure 6A). La fluorescence émise par la GFP, suite à une excitation à 488 nm, est utilisée pour identifier les protoplastes transformés (Figure 6B). Les taux de transformation obtenus sont compris entre 20 et 50%.

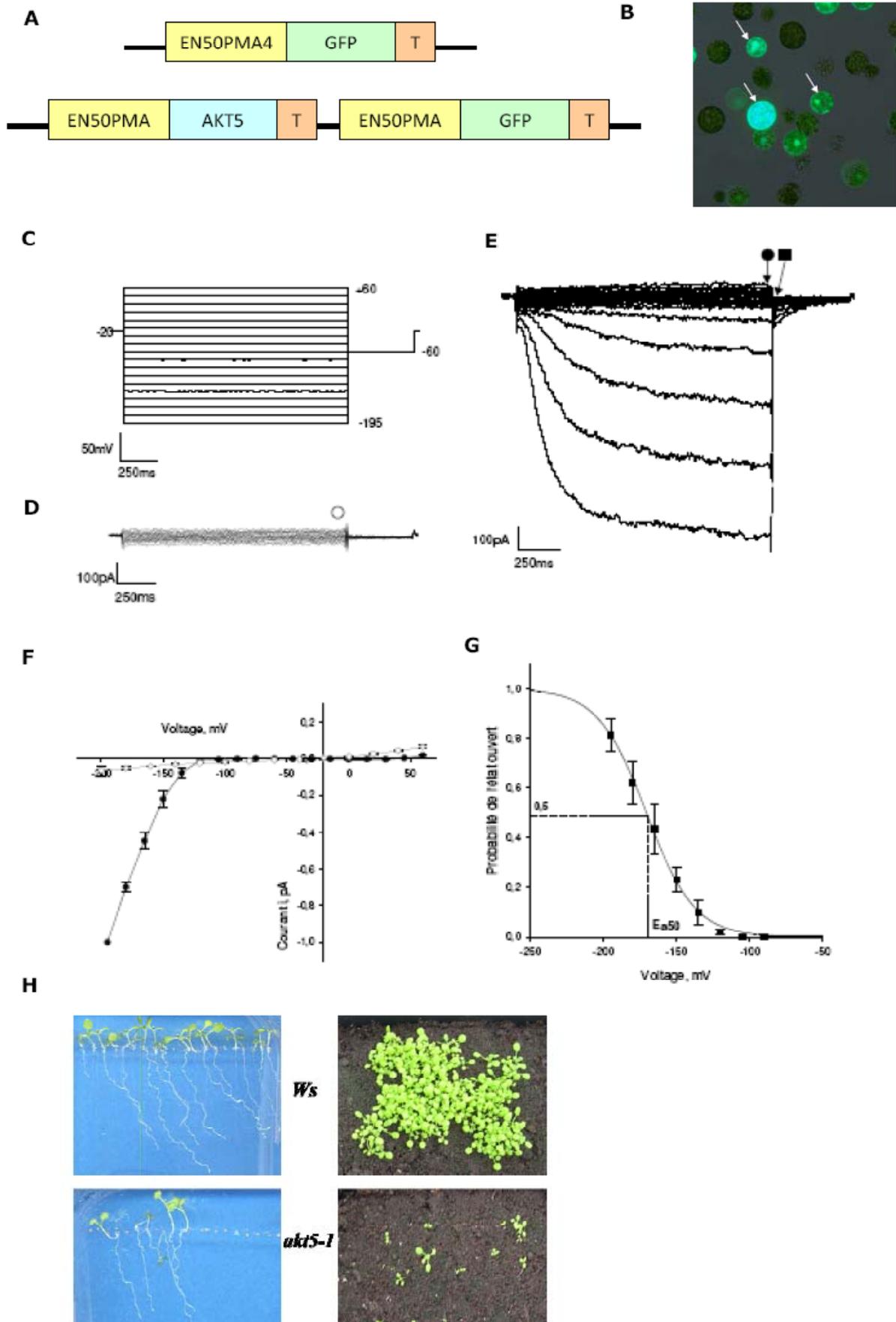
La conductance membranaire de protoplastes de mésophylle de tabac transformés transitoirement est analysée après une vingtaine d'heures par "patch-clamp" en configuration cellule entière (Figure 6 C-G). AKT5 est un canal sélectif du potassium, à rectification entrante, donc susceptible de participer à l'absorption (ou redistribution) du potassium par la graine (pendant sa formation et / ou sa germination). Le canal est inhibé par le césium comme décrit pour d'autres canaux de type *Shaker*. De façon intéressante, AKT5 est activé par une acidification du milieu externe.

### III.1.2.2. Caractérisation du mutant ko *akt5*

Les analyses phénotypiques de la lignée mutante invalidée dans *AKT5* suggèrent qu'AKT5 joue un rôle à la fois dans la formation et la germination de la graine. En effet, le mutant produit des graines d'aspect (taille et couleur) hétérogène. Des tests de germination sur des milieux pauvres en  $K^+$  ont indiqué dans les expériences préliminaires que des graines issues du mutant ont une capacité de germination très altérée dans certaines conditions, et une croissance racinaire réduite pendant la première semaine après germination. Une teneur en potassium plus faible que celle des graines de génotype sauvage a été aussi observée.

Une diminution de la capacité de germination a été observée dans certains lots de graines (Figure 6H). La vernalisation a pu augmenter un peu le taux de germination chez les mutants. Plus intéressant, les expériences supplémentaires ont montré que l'acide gibbérellique augmente considérablement le taux de germination maximal des mutants ce qui suggère que la dormance est plus profonde. Par contre, la variation de la concentration en  $K^+$  dans le milieu n'a pas changé la différence entre sauvage et mutants.

Le but de ces analyses est de mieux comprendre le rôle de ce canal AKT6 dans ces processus de formation et germination de graines d'*Arabidopsis*. Enfin, il est prévu de préparer une publication de nos résultats concernant ce dernier canal de type *Shaker* d'*Arabidopsis* (Cf. VI.).

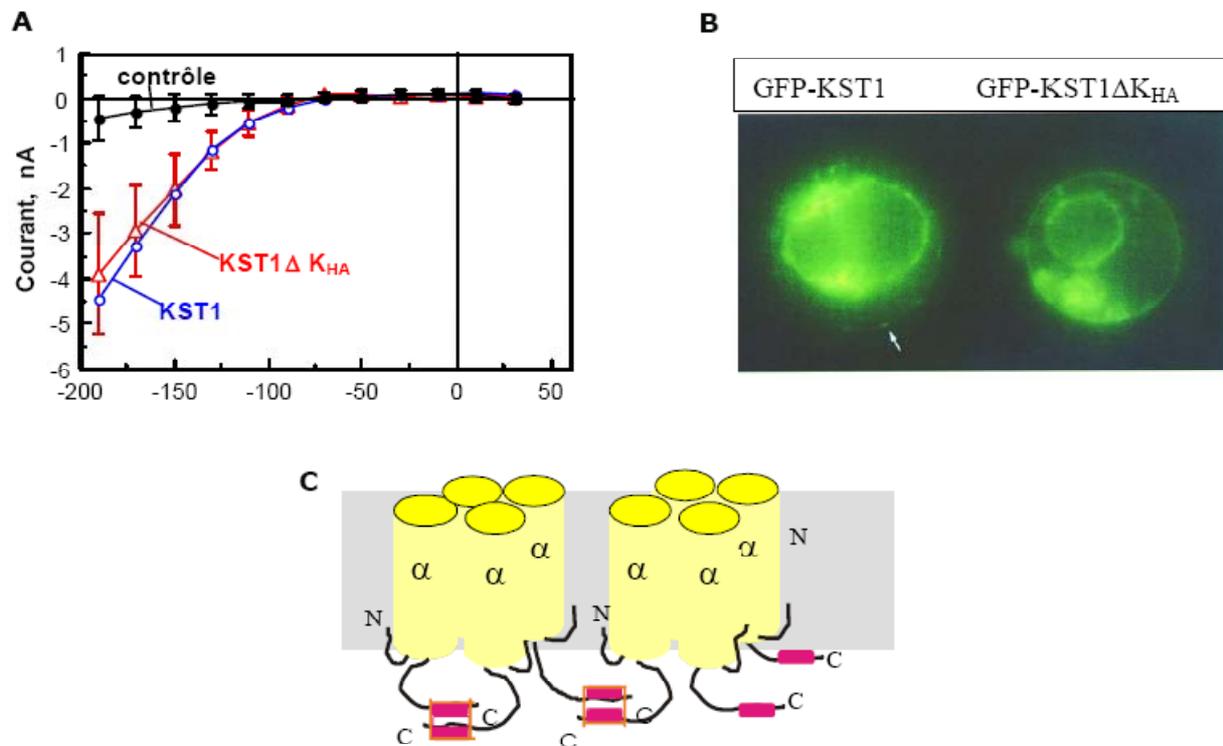


**Figure 6.** Le canal AKT5 exprimé fonctionnellement dans les protoplastes de tabac et caractérisé par patch-clamp, ainsi que l'effet de sa mutation sur la germination. **(A-B)** Les protoplastes de mésophylle de tabac sont transformés transitoirement par une construction exprimant AKT5 et la GFP. *SKT1* est, comme *KST1*, exprimé dans les cellules de garde de la pomme de terre. **(A)** Vecteurs d'expression. *EN50PMA4*: promoteur fort de *Nicotiana plumbaginifolia*, *T*: Termineur du gène nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens*. Vecteur contrôle exprimant la GFP ("Green fluorescent protein") seule (en haut) et vecteur à deux cassettes exprimant AKT5 et la GFP comme marqueur de transformation. **(B)** Protoplastes de mésophylle de tabac 20 h après transformation avec le vecteur d'expression à deux cassettes permettant la co-expression d'AKT5 et de la GFP. Superposition des images en lumière visible et UV à 488 nm. **(C-G)** AKT5 est un canal activé par l'hyperpolarisation. **(C)** Protocole de voltage-clamp. Un potentiel allant de +60 à -195 mV est appliqué pendant 1,5 sec, avec un pas de -15 mV entre chaque épisode. Le potentiel est ensuite porté à -60 mV pendant 0,5 sec avant le retour au potentiel de maintien de -20 mV. **(D)** Exemple représentatif des courants enregistrés sur un protoplaste contrôle transformé par le vecteur exprimant la GFP seule. **(E)** Exemple représentatif des courants enregistrés sur un protoplaste transformé par le vecteur exprimant AKT5 (et la GFP). **(F)** Relation courant/voltage (I/V), à l'état stationnaire. La valeur du courant (moyenne  $\pm$  écart-type, n=3 pour le contrôle et n=8 pour les courants AKT6) est échantillonnée à l'instant indiqué en D et E par le rond (blanc pour le contrôle, noir pour AKT6). **(G)** Le canal AKT5 est activé par l'hyperpolarisation. La probabilité de l'état ouvert (moyenne  $\pm$  écart-type, n=5) pour chaque potentiel appliqué est calculée à partir du courant de désactivation enregistré à -60 mV à l'instant indiqué en E par le symbole carré. Les deux paramètres d'une équation de Boltzmann sont ajustés à la cinétique expérimentale : potentiel de demi-activation  $E_{a50} = -171 \pm 3$  mV et charge apparente de "gating"  $z_g = 1,6 \pm 0,13$ . **(H)** Effet de la mutation *akt5* sur la germination des graines. Germination de la lignée contrôle sauvage *Ws* d'*Arabidopsis thaliana* et de la lignée mutante *akt5-1 in vitro* à jour 7 post-semis (panneaux de gauche) et en serre à jour 13 post-semis (panneaux de droite). La réduction de la germination reflète une dormance plus profonde.

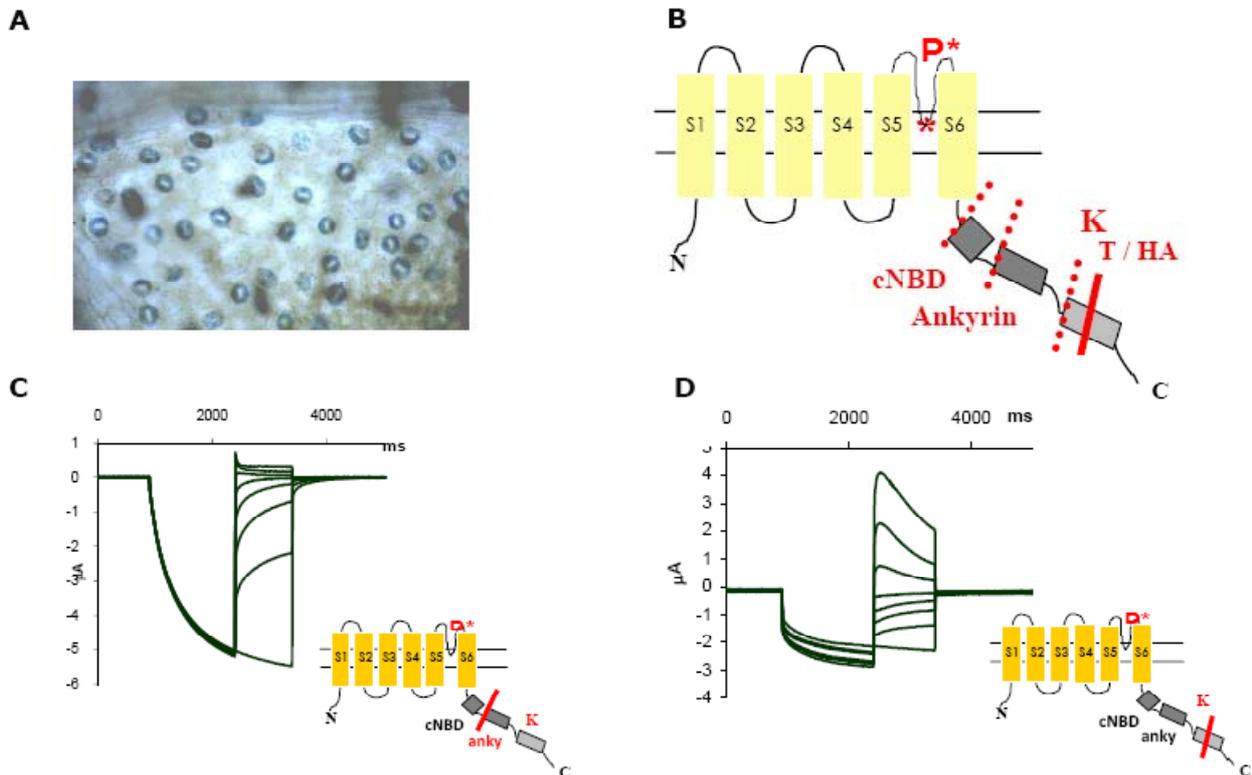
### III.2. Relation structure-fonction des canaux de type *Shaker* : rôle du domaine C-terminal

Tous les canaux que nous avons identifiés chez la pomme de terre, de type KST ou SKT, présentent un domaine très conservé à leur extrémité C-terminale (*i.e.* en aval du domaine ankyrine chez les canaux de type SKT). Ce domaine est aussi présent dans tous les canaux végétaux de type *Shaker* (*e.g.* les canaux AKT# et KAT# d'*Arabidopsis*, le canal LKT1 de la tomate). Il présente une région riche en résidus hydrophobes, suivie d'une région riche en résidus acides. Il a de ce fait été appelé domaine  $K_{HA}$ . Nous avons précisé le rôle de ce domaine en utilisant, au départ, le canal KST1 comme modèle (Ehrhardt *et al.*, 1997; **Publication 16**). L'utilisation du système du double hybride dans la levure a révélé que ce domaine peut interagir à la fois avec lui-même et avec la région C-terminale correspondante des autres canaux identifiés par notre équipe chez la pomme de terre (III.1.1.1.). L'existence de ces interactions a été confirmée par une approche indépendante, appelée "Green Western" (analyse de type Western blot reposant sur l'utilisation de peptides fusionnés à la GFP). Nous avons ensuite exprimé dans des cellules d'insecte le canal KST1 sauvage et ce même canal tronqué de son domaine  $K_{HA}$ , puis chacun de ces deux canaux en fusion avec la GFP. L'observation de la fluorescence émise par la GFP révèle un phénomène de regroupement (formation de "clusters") des canaux sur la membrane dépendant de la présence du domaine  $K_{HA}$  (Figure 7B). Par contre, l'analyse électrophysiologique (patch-clamp en mode cellule entière) indique que le canal tronqué du domaine  $K_{HA}$  reste fonctionnel et présente des caractéristiques semblables à celles du canal sauvage (Figure 7A; sensibilité au voltage, cinétique d'activation, sélectivité en faveur de  $K^+$ ). En conclusion (modèle présenté en Figure 7C), le domaine  $K_{HA}$  serait impliqué dans des interactions entre les canaux, provoquant leur regroupement à certains sites de la membrane (Ehrhardt *et al.*, 1997). Par contre, ce domaine ne serait pas indispensable à la tétramérisation et à l'activité du canal. Nous ne savions pas encore, à ce moment là, si le phénomène de formation de clusters a une signification physiologique et participe au contrôle de l'activité des canaux *in planta*. Cependant, une distribution radiale a été trouvée récemment pour le canal KAT1 d'*Arabidopsis thaliana* exprimé dans les cellules de garde de *Vicia faba* (Homann *et al.*, 2007). De plus, une modulation de la densité de KAT1 dans les vésicules d'exocytose est probablement due à la formation de clusters (Hurst *et al.*, 2004) et régulée par des protéines de type SNARE (Sutter *et al.*, 2006).

En outre, nous avons montré l'interaction entre les deux canaux de cellule de garde KST1 & SKT1 chez la pomme de terre par cette région C-terminale  $K_{T/HA}$  (Zimmermann *et al.*, 2001; **Publication 6**). En fait, la co-expression de ces deux canaux a pour résultat des courants avec des propriétés nouvelles en ovocytes. L'analyse de délétions C-terminales du canal SKT1 muté a montré que le motif  $K_T$  est indispensable pour la formation des hétérotétramères (Figure 8).



**Figure 7.** Relation structure-fonction du canal potassique KST1. Le domaine C-terminale conservé ( $K_{HA}$ ) est impliqué dans un phénomène de "clusterisation" des canaux dans la membrane. Le canal potassique rectifiant entrant de cellule de garde de la pomme de terre a été exprimé et caractérisé hétérologue dans des cellules d'insecte. **(A, B)** La délétion du domaine C-terminal  $K_{HA}$  provoque la disparition du phénomène de "concentration" du signal de fluorescence sur des sites de la membrane tout en laissant le canal fonctionnel. **(A)** Comparaison des courants macroscopiques (patch-clamp en mode cellule entière) dans des cellules d'insecte contrôle, dans des cellules exprimant le canal KST1 sauvage (courbe en bleu) et dans des cellules exprimant le canal KST1 tronqué de son domaine  $K_{HA}$  C-terminal (courbe en rouge). Pour tous les voltages étudiés, les courants conduits par le canal tronqué sont comparables à ceux conduits par le canal sauvage. Concentration de  $K^+$ : 150/30 mM, int./ext. **(B)** Localisation du signal de fluorescence dans des cellules d'insecte exprimant une fusion de la GFP avec le canal KST1 sauvage ou une fusion de la GFP avec le canal KST1 tronqué du domaine  $K_{HA}$  en C-terminal. Des points fluorescents, attribués à un phénomène de "clusterisation" des canaux chimériques, sont détectables. La flèche pointe l'un d'entre eux. Ce phénomène de concentration du signal de fluorescence en certains points de la membrane n'apparaît pas après délétion du domaine  $K_{HA}$ . **(C)** Le canal fonctionnel a une structure tétramérique (association de 4 sous-unités). Le domaine  $K_{HA}$  d'une sous-unité peut interagir avec le domaine  $K_{HA}$  d'une autre sous-unité d'un même canal ou d'un canal différent. Ce type d'interaction, d'un canal à l'autre, serait à l'origine d'un phénomène de "clusterisation" des canaux (Ehrhardt *et al.*, 1997). Au sein du cluster, les canaux pourraient avoir des propriétés (cinétiques d'activation, coopérativité) différentes de celles du canal isolé (hypothèse formulée par *e.g.* Honoré *et al.*, 1992).



**Figure 8.** Relation structure-fonction du canal potassique SKT1. Le domaine C-terminale conservé ( $K_{T/HA}$ ) est impliqué dans l'hétéromérisation du canal avec le canal KST1 (Zimmermann *et al.*, 2001). **(A)** SKT1 est, comme KST1, exprimé dans les cellules de garde de la pomme de terre. **(B)** SKT1 a été muté dans la région de la pore pour les expériences de co-expression avec KST1 dans les ovocytes de xénope. En plus, les délétions de la région C-terminale ont été faites pour étudier les domaines responsables de l'interaction avec les autres sous-unités. Les premières délétions (lignes rouges pointillées) semblent empêcher l'hétéromérisation avec KST1 (courants sauvages de KST1 **(C)**). Par contre, la délétion dans le domaine  $K_{T/HA}$  après le motif  $K_T$  modifie fortement les courants **(D)** indiquant ainsi l'hétéromérisation du mutant de pore avec KST1.

### III.3. Identification de nouvelles familles de canaux potassiques chez *Arabidopsis*

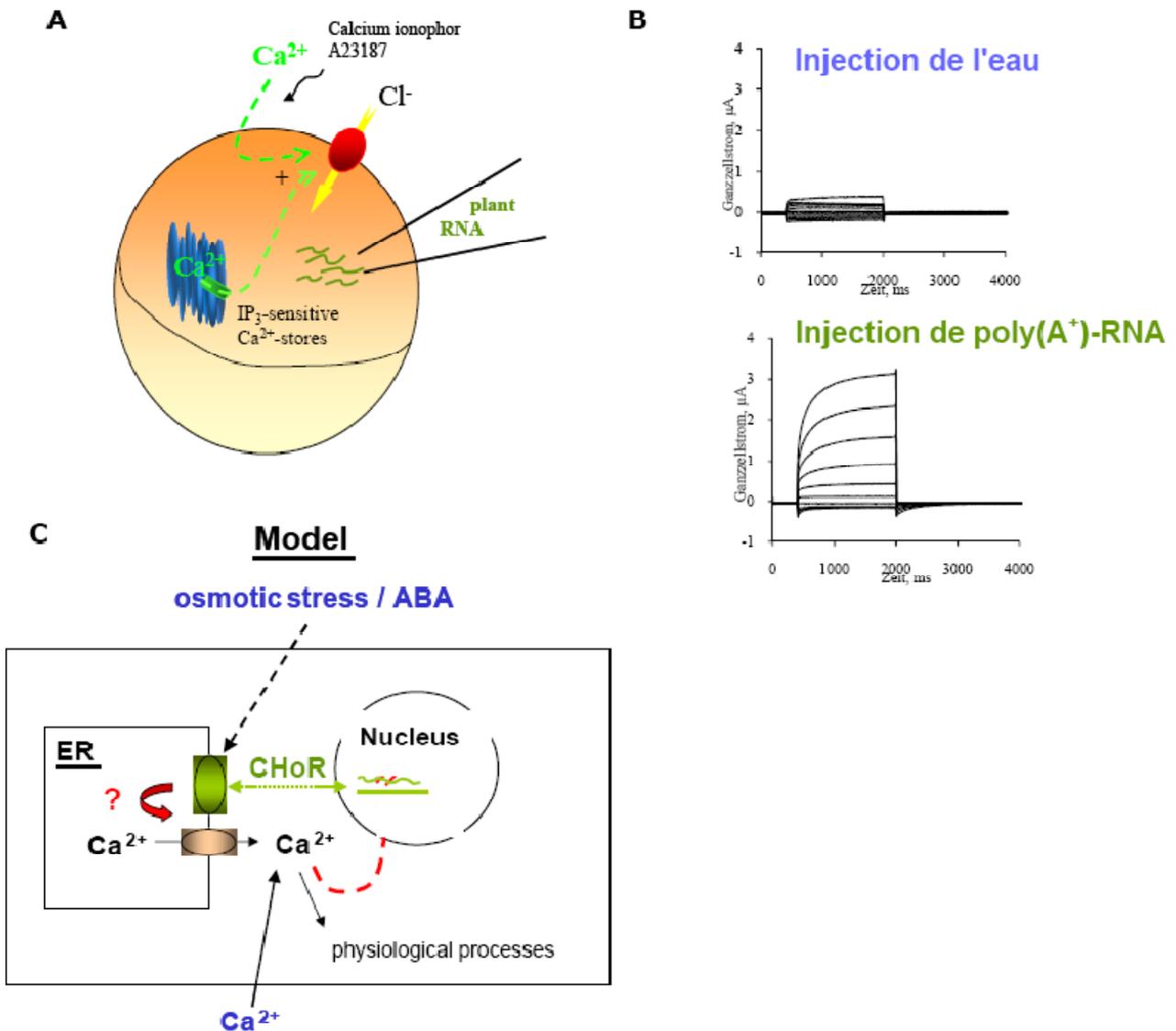
#### III.3.1. Deux nouvelles familles de canaux K<sup>+</sup> identifiées chez *Arabidopsis*

Tous les canaux potassiques clonés à ce jour, chez les bactéries, les animaux ou les végétaux, sont caractérisés par la présence d'un ou deux domaines appelés P, très conservés, structurant le pore aqueux du canal. À la suite de la découverte du canal TOK chez la levure (Ketchum *et al.*, 1995) (Figure 4D), Katrin Czempinski, de notre équipe à Golm, a utilisé les séquences consensus correspondant aux domaines P de ce canal pour interroger les banques de données fournies par les opérations de séquençage systématique chez *Arabidopsis*. Ce travail a conduit à l'identification de 3 nouveaux canaux (Czempinski *et al.*, 1997 & 1999; **Publication 10 & 15**). Les deux premiers, appelés initialement KCO1 et KCO2, présentent des homologies de structure caractéristique et de séquence avec les canaux potassiques animaux de la famille TWIK (Lesage *et al.*, 1996; canaux à 4 segments transmembranaires et deux pores en tandem; Figure 4C). Le troisième canal, que nous avons appelé provisoirement KCO3, est apparenté aux canaux de type IRK (Kubo *et al.*, 1993; un domaine P encadré par deux segments transmembranaires; Figure 4B). Ces trois canaux possèdent, dans leur région C-terminale, deux domaines potentiels de fixation de Ca<sup>2+</sup>, de type EF-hand.

KCO1 appartient à une famille multi-génique, renommée TPK (pour "tandem-pore K<sup>+</sup> channel"), contenant maintenant plusieurs membres chez *Arabidopsis* (Czempinski *et al.*, 1999; Lebaudy *et al.*, 2007). Contrairement aux canaux de type *Shaker*, les TPKs ne forment pas d'hétéromères (Voelker *et al.*, 2006). En plus des analyses sur KCO1 (=TPK1; Cf. III.3.2.) la fonction d'AtTPK4, localisé dans la membrane plasmique, a été déterminée avec son rôle dans les pollen (Becker *et al.*, 2004).

#### III.3.2. Le canal KCO1 (TPK1) et son expression dans les cellules d'insecte

Le gène *KCO1* est exprimé dans les semences en germination, les feuilles et les fleurs, à un très faible niveau (détectable uniquement par RT-PCR). L'injection de transcrits *KCO1* dans des ovocytes de xénope se traduit rapidement par la mort des ovocytes, excluant toute possibilité de caractérisation du canal dans ce système. Par contre, l'expression du polypeptide correspondant (41 kDa) dans des cellules d'insecte a généré un courant potassique sortant activé par une augmentation de la concentration de Ca<sup>2+</sup> dans le cytoplasme (Czempinski *et al.*, 1997). En relation avec cette propriété, les analyses de séquence ont révélé la présence dans le polypeptide KCO1 de deux motifs de type "EF-hand" potentiellement impliqués dans la fixation de Ca<sup>2+</sup>. De plus, la mobilité électrophorétique du polypeptide est affectée par la présence de Ca<sup>2+</sup> (Czempinski *et al.*, 1999). Par contre, les résultats initialement obtenus dans les cellules d'insecte Sf9 et Sf21 n'étaient pas reproductibles dans les expériences suivantes à cause de la présence de courants de "background" dans ces cellules en culture antérieures (courants endogènes ou "contaminations" par des transfections). De plus, les résultats obtenus en suite dans l'équipe ont montré que KCO1 (TPK1) est exprimé dans le tonoplaste (Czempinski *et al.*, 2002). Finalement, TPK1 a pu être identifié par des approches génétiques comme le canal VK de la vacuole (Gobert *et al.*, 2007).



**Figure 9.** A la recherche de la base moléculaire de conductance anionique ou calcique – criblage par expression fonctionnelle dans les ovocytes de *Xenopus laevis*. **(A)** Nous avons injecté et exprimé L'ARN (polyA<sup>+</sup>) de jeunes feuilles de pomme de terre (enrichie de cellules de garde) a été injecté et exprimé dans les ovocytes de xénope, une banque d'ADNc a été construit et testé par voltage-clamp à deux électrodes. **(B)** Un courant chlorure activé par calcium, endogène, a été stimulé par l'ARN et par certaines fractions de la banque d'ADNc. StCHoR (*Solanum tuberosum* Calcium Homeostasis Regulator) a été identifié grâce à l'analyse de sous-pools de la banque d'ADNc. **(C)** Le modèle de travail suggère que StCHoR stimule la libération du calcium de stores internes à partir de signaux de l'environnement (Hartje, 2000).

#### III.4. Recherche de nouvelles familles de canaux de pomme de terre par expression fonctionnelle dans les ovocytes de *Xenopus laevis*

Une stratégie de criblage par expression fonctionnelle dans les ovocytes de xénope a été développée dans le cadre de la Thèse de Stefanie Hartje afin de rechercher la base moléculaire de conductance anionique (ou calcique). Cette conductance anionique de la membrane plasmique est bien documentée *in planta* (Cf. II.2.2. & II.3.) mais à ce jour l'identification moléculaire n'est pas encore acquise et reste un challenge (Cf. VII). En parallèle, une thèse dans l'équipe a été conduite sur la caractérisation d'un candidat ciblé, un transporteur de la superfamille ABC (ATP-binding cassette), et a révélé que AtMRP5 est impliqué dans la régulation de canaux anioniques (Gaedeke *et al.*, 2001). Récemment, une protéine a été identifiée, SLAC1, qui est impliquée dans la conductance anionique de la membrane plasmique de cellules de garde, mais il n'est pas encore prouvé si cette protéine présente elle-même une sous-unité du canal (Negi *et al.*, 2008; Vahisalu *et al.*, 2008).

La stratégie d'expression fonctionnelle dans les ovocytes, comme la complémentation fonctionnelle de mutants de levure, est susceptible de conduire à la découverte de canaux "nouveaux". Elle est cependant lourde et risquée : en effet, si elle a mené à l'identification de nombreux gènes chez les animaux (Hediger *et al.*, 1987; Lübbert *et al.*, 1987; Takumi *et al.*, 1988; Frech *et al.*, 1989; Jentsch *et al.*, 1990; Sigel, 1990; Paulmichl *et al.*, 1992), elle n'a encore jamais été utilisée avec succès pour le clonage de canaux ou transporteurs chez les végétaux. Par contre, l'injection d'ARN de tissus de la plante a clairement provoqué des signaux dans les ovocytes (Cao *et al.*, 1992; Debarbieux *et al.*, 1999). En plus, un syntaxin de tabac, impliqué dans la signalisation d'ABA, a pu être cloné à la recherche d'un récepteur d'ABA (Leyman *et al.*, 1999).

Nous avons injecté et exprimé l'ARN (polyA<sup>+</sup>) de jeunes feuilles de pomme de terre (enrichi de cellules de garde) dans les ovocytes de xénope, construit une banque d'ADNc et testé l'expression de canaux par voltage-clamp à deux électrodes. En fait, un courant chlorure activé par calcium, endogène (Barish, 1983; Lübbert *et al.*, 1987; Parekh *et al.*, 1993; Parekh, 1995; Weber, 1999a & 1999b), a été stimulé par l'ARN et par certaines fractions de la banque d'ADNc. Des résultats similaires ont été observés et reportés pour l'ARN de chicorée par un laboratoire à Lille (Debarbieux-Deleporte *et al.*, 2002), mais la protéine responsable n'a pas été identifiée. Grâce à la banque d'ADNc, sous-fractionnée, nous avons pu identifier et cloner par une stratégie d'analyse de sous-pools enfin une nouvelle protéine, plant-spécifique, impliquée dans l'homéostasie du calcium appelée StCHoR (*Solanum tuberosum Calcium Homeostasis Regulator*). CHoR a été caractérisé fonctionnellement dans les ovocytes, sa localisation et expression dans la plante analysée (Hartje, 2000; Figure 9).

A la fin de la thèse de Stefanie Hartje en 2000, un manuscrit a été préparé, et un autre étudiant en thèse, Marc Lohse, a continué ce travail (sur l'homologue chez *Arabidopsis*; Lohse, 2004). Je me suis engagée pour la suite de ces travaux, entre autre par l'établissement d'une coopération avec Christian Mazars (laboratoire à Toulouse) pour les mesures du calcium en protoplastes exprimant CHoR. Mais, malheureusement, malgré ces efforts (deux étudiants en thèse) et l'affichage de ces travaux sur le site du laboratoire, le manuscrit n'est toujours pas soumis à ce jour.

## IV Transport & Symbiose (Montpellier)

Les recherches que j'ai conduites pendant mes post-docs, avant le recrutement au CNRS en 2000, couvrent un champ assez large, de l'analyse de la relation structure-fonction de canaux en système hétérologue à l'étude de leurs rôles et régulation par phosphorylation *in situ* dans la plante, dans le cadre de problématiques telles que l'analyse de la transduction de signaux et des relations plantes-pathogènes. Les articles de revue publiés en 1999, "*Ion channels in plant signalling*" (Zimmermann *et al.*, 1999 en *Cell. Mol. Life Sci.*; **Publication 8**), "*Plant Ion channels: from molecular structures to physiological functions*" (Zimmermann & Sentenac, 1999 en *Curr. Opin. Plant Biol.*; **Publication 9**) et "*Molecular mechanisms and regulation of plant ion channels*" (Czempinski *et al.*, 1999 en *J. Exp. Bot.*; **Publication 10**) traduisent mon investissement dans ce domaine.

En 2000, j'ai été recrutée au CNRS au sein de l'équipe "*Canaux Ioniques*" dirigée par Hervé Sentenac avec un programme de recherche sur le rôle des canaux potassiques dans une relation bénéfique plante-champignon, dans la symbiose mycorhizienne chez le champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum*. Cette relation symbiotique est basée sur l'échange de nutriments entre les deux partenaires, mais l'identification moléculaire de systèmes de transport était tout à son début en 2000 (Chalot *et al.*, 2002). Ce chapitre présente le contexte de ce programme de recherche ainsi que les principaux résultats obtenus à ce jour.

### IV.1. Contexte du programme sur la symbiose ectomycorhizienne

Les mycorhizes sont des organes symbiotiques associant les racines d'une plante au mycélium d'un champignon. Un large ensemble de données physiologiques et écophysiologicals montre que le principal bénéfice que retire la plante de cette symbiose avec le champignon est une amélioration de sa nutrition minérale. Cependant, au niveau moléculaire, les connaissances dans ce domaine sont encore très réduites.

Notre programme a pour objectif général d'analyser au niveau moléculaire les mécanismes fongiques d'absorption et de transfert des solutés impliqués dans l'association mutualiste avec l'arbre hôte (symbiose ectomycorhizienne). Pour identifier des systèmes de transport d'ions minéraux chez ce champignon, nous collaborons avec le Laboratoire *Biogéochimie du Sol et de la Rhizosphère* (UMR 1222, INRA, Montpellier).

Dans le cadre de notre équipe, trois thèses ont été conduites sur les thèmes suivants: (1) "Identification de systèmes de transport de  $P_i$  et  $K^+$  chez le champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum*" par Marie-Violaine Tatry encadrée par Hervé Sentenac et Claude Plassard (*Biogéochimie du Sol et de la Rhizosphère*); (2) "Analyse moléculaire des mécanismes d'absorption et de transfert d'ions nutritifs par le partenaire fongique dans la symbiose ectomycorhizienne : les transports de potassium" par Raphaël Lambilliotte, encadré par Hervé Sentenac et moi-même (co-direction) et (3) "Identification, caractérisation fonctionnelle et rôle d'un transporteur de  $K^+$  de la famille Trk chez le champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum*" par Claire Corratgé, encadré par Hervé Sentenac et moi-même (co-direction). Actuellement, une thèse a débuté par Muhammad Zulqurnain Haider (*Cf. V.*).

Les systèmes de transport potassiques ont été choisis comme cible privilégiée, eu égard aux rôles que ces protéines sont susceptibles d'avoir d'une

part dans la nutrition (absorption de  $K^+$  à partir de la solution du sol, puis sécrétion de cet ion dans l'apoplasme cortical de la racine-hôte), et d'autre part dans le contrôle de la polarisation membranaire et les fonctions connexes (énergisation de la membrane, transduction de signaux, signalisation champignon-arbre). L'analyse des mécanismes d'absorption et de transfert de solutés impliqués dans la symbiose ectomycorhizienne est conduite en combinant les techniques de biologie moléculaire et d'électrophysiologie. Le champignon modèle choisi pour conduire ce projet, *Hebeloma cylindrosporum*, permet de développer une approche de type physiologie moléculaire (Marmeisse *et al.*, 2004).

#### IV.2. La banque d'ADNc et d'ESTs du champignon *Hebeloma cylindrosporum* comme ressource pour identifier des transporteurs membranaires

Notre équipe s'est engagée dans une opération de séquençage systématique et d'analyse *in silico* d'ESTs ("Expressed Sequence Tags") d'*Hebeloma* en collaboration avec le Laboratoire *Génétique et développement des plantes* à Perpignan UMR 5096 (Drs. Richard Cooke et Michel Delseny). Cette partie de projet a été conduite dans le cadre du programme du *Génopole* de Montpellier. Elle représente une composante essentielle du travail de la Thèse de Raphaël Lambilliotte (Lambilliotte *et al.*, 2004; **Publication 4**). Une banque d'ADNc a été produite à partir du champignon cultivé *in vitro* pour développer une stratégie de clonage par complémentation fonctionnelle de levure ainsi que l'opération de séquençage systématique d'ESTs d'un champignon ectomycorhizien. 15000 clones ont été obtenus et ordonnés, parmi lesquels 4036 ont été séquencés et l'ensemble des ESTs accessibles (4596) analysé. Les séquences obtenues, comparées par Blast avec des séquences connues et déposées dans les banques de données publiques, identifient 2691 contigs (après assemblage *in silico* des séquences). Les données ont été traitées par la plate-forme bioinformatique de Génoplante à Evry. Cette ressource, une banque de données accessible aux autres laboratoires, est utile à toute la communauté "mycorhize" (<http://urgi.versailles.inra.fr/projects/>) (Lambilliotte *et al.*, 2004).

L'analyse bioinformatique de la collection d'ESTs a révélé au sein de cette ressource un grand nombre de systèmes de transport membranaire potentiels qui intéressent directement notre laboratoire ou d'autres laboratoires travaillant sur la symbiose. Environ 1% des gènes ainsi identifiés codent pour des protéines impliquées dans des transports membranaires d'ions minéraux ou de solutés organiques. Spécifiquement, la banque d'ESTs a permis d'identifier une cinquantaine de gènes susceptibles de coder des systèmes de transport impliqués dans la nutrition (azote, phosphate, potassium, métaux lourds, sucres...). L'obtention de ces données constitue donc une étape importante dans l'analyse des mécanismes moléculaires responsables des échanges de solutés entre les partenaires de la symbiose ectomycorhizienne.

En particulier, nous avons isolé par criblage *in silico* de notre banque d'étiquettes deux transporteurs de phosphate (sujet de thèse de Marie-Violaine Taty), un transporteur de potassium homologue aux transporteurs de levure de type Trk (sujet de thèse de Claire Corratgé), un canal potassique homologue aux canaux de type *Shaker* chez les animaux et chez les plantes, et un canal anionique de type CIC. Le canal anionique CIC partage des homologies avec les canaux animaux de ce type (Miller, 2006; Dutzler, 2007). Les premiers tests effectués pour trouver les caractéristiques fonctionnelles de CIC en exprimant ce canal dans les ovocytes n'ont pas donné de résultats, mais ce canal pourrait

jouer un rôle intéressant pour la sécrétion des anions vers l'arbre hôte.

Mon travail concerne plus particulièrement le transporteur potassique de type Trk et le canal  $K^+$  de type *Shaker* (Cf. IV.3.1. & IV.3.2., ci-dessous). Parallèlement, pour avancer dans la caractérisation d'autres gènes codant pour d'autres types de transporteurs (phosphate, peptides,  $NH_4^+$ , sucre, acides aminés, métaux, ABC protéines) ou d'autres protéines (phosphatase, aminotransférases, glutamine synthétase, glutamate synthase, uréase, asparagine synthétase) probablement impliquées dans la symbiose, nous avons mis en place des collaborations en France et en Allemagne.

Les transporteurs de phosphate ont été caractérisés en collaboration avec Claude Plassard (INRA, Montpellier). Des expériences de complémentation de souches mutantes de levures déficientes pour le transport de phosphate ont montré que les systèmes de transport de phosphate d'*Hebeloma* (apparentés au transporteur de phosphate PHO84 de la levure) rétablissent la croissance des levures en milieu pauvre en orthophosphate. Les deux transporteurs *HcPT1* & *HcPT2* représentent ainsi des systèmes de symport  $H^+ : Pi$  avec des caractéristiques différentes. Il est raisonnable d'imaginer que *HcPT1* joue un rôle dans l'absorption de  $Pi$  à partir du sol. En effet, ce gène répond fortement aux variations de la disponibilité de  $Pi$  dans le milieu, avec une expression qui augmente rapidement en cas de carence en  $Pi$ , et diminue fortement dans le cas d'un apport de  $Pi$ . Par contre, dans l'organisme symbiotique, *HcPT2* est exprimé uniquement dans les mycorhizes, et cette expression est favorisée par la présence de  $Pi$  dans le milieu. L'ensemble de ces résultats sur les transporteurs de phosphate a été publié récemment (Tatry *et al.*, 2009; **Publication 1**).

Une autre collaboration s'est faite avec le groupe de Daniel Wipf à Tübingen (laboratoire de Wolf Frommer) puis ensuite à Bonn (maintenant Pr à Dijon) en Allemagne dans le cadre d'un programme Procope. Cette démarche a permis à l'étudiant Enno Rikirsch de faire une partie de son stage (3 mois) de "Diplôme" (équivalent du DEA) puis à Mariam Benjdia de travailler dans le cadre de sa thèse dans notre laboratoire. Le groupe de Daniel Wipf était intéressé spécifiquement à la nutrition azotée des plantes (Müller *et al.*, 2007). Au contraire de son partenaire naturel, *Pinus pinaster*, le champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum* est à même de prélever l'azote organique du sol sous forme d'acides aminés et de peptides. L'azote, ainsi prélevé est ensuite transmis à la plante hôte au niveau du réseau de Hartig. Notre collaboration a permis d'étudier le transport de l'azote organique sous forme de peptides par *Hebeloma*. Le mycélium d'*Hebeloma cylindrosporum* est capable de se développer sur un milieu contenant des peptides en tant qu'unique source azotée. Deux transporteurs de peptides, pouvant participer à l'absorption de peptides du sol, *HcPTR2A* et *HcPTR2B*, ont été isolés par complémentation fonctionnelle de mutants de levures à partir de notre banque d'ADNc. Ces transporteurs présentent des similitudes avec les membres de la famille des transporteurs de peptides de type PTR, et ce tant au niveau structural qu'au niveau fonctionnel. *HcPTR2A* et *HcPTR2B*, dont les séquences contiennent les signatures 1 et 2 de la famille PTR, présentent respectivement 11 et 10 domaines transmembranaires potentiels. Les résultats obtenus lors de l'analyse de l'expression des gènes dans le mycélium de la souche dicaryotique D2, et au cours des expériences d'absorption de dipeptides marqués, permettent de formuler l'hypothèse qu'*HcPTR2A* et *HcPTR2B* seraient respectivement un transporteur à forte et un transporteur à faible affinité pour les dipeptides. L'ensemble de ce travail sur les transporteurs de peptides a été publié (Benjdia *et al.*, 2006; **Publication 3**).

Notre équipe s'intéresse particulièrement aux mécanismes de transport de l'ion  $K^+$  chez les plantes (Zimmermann & Sentenac, 1999; Zimmermann & Chérel, 2005; **Publication 24**), et de différentes études (éco)physiologiques ont montré que l'ectomycorhization exerce un effet très bénéfique sur la nutrition potassique de la plante (Rygiewicz & Bledsoe, 1984; Jongmans *et al.*, 1997).

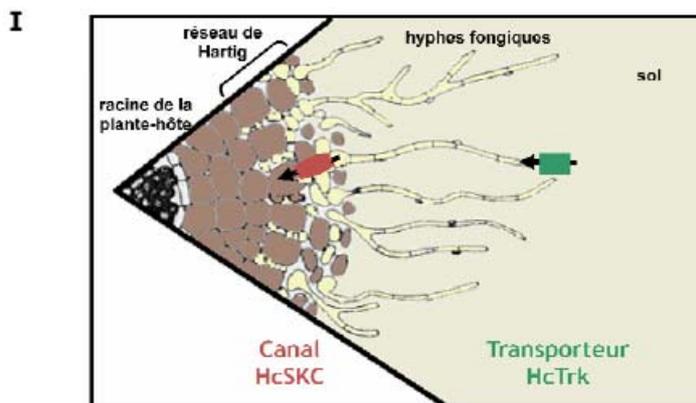
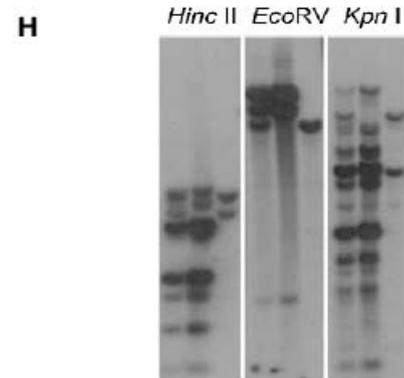
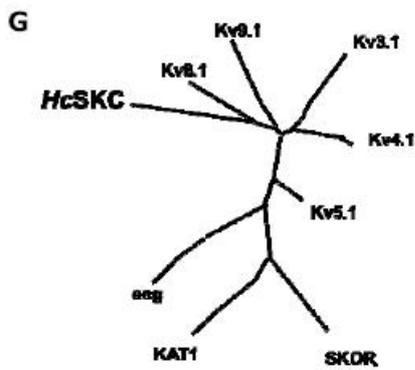
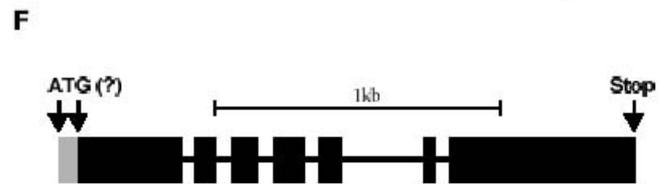
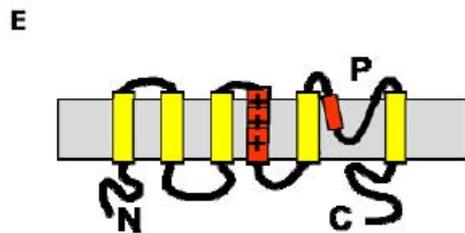
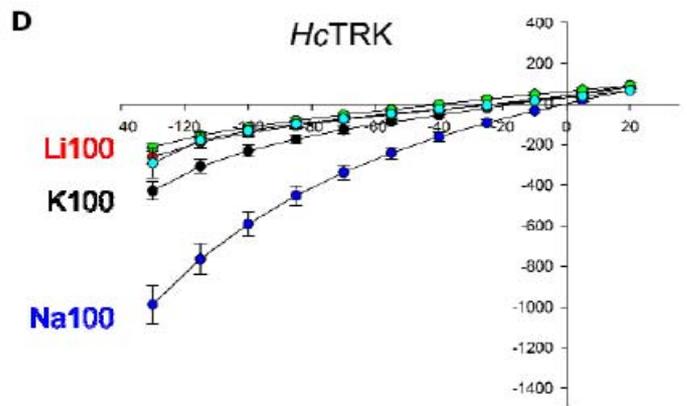
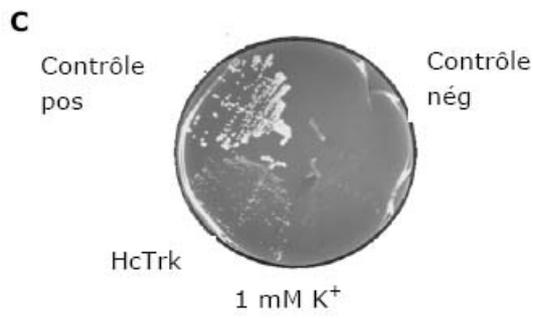
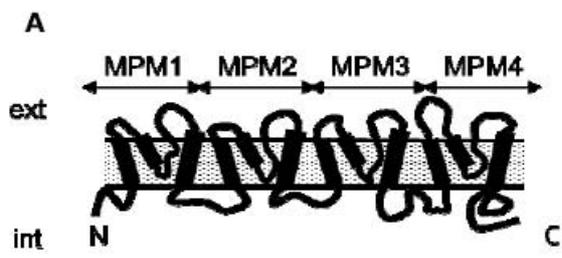
### IV.3. Identification des systèmes de transport potassique

#### IV.3.1. Identification et analyse d'un transporteur de type Trk

Un gène codant pour un transporteur de type symport  $H^+:K^+$  à haute affinité, similaire aux systèmes Trk identifiés chez les levures (Gaber *et al.*, 1988; Ko & Gaber, 1991; Bertl *et al.*, 2003) a été identifié par homologie parmi les ESTs. Nous avons appelé ce gène *HcTrk*. Notre hypothèse de travail est que ce système participe au prélèvement à haute affinité de  $K^+$  par les hyphes fongiques dans le sol. Deux gènes de ce type, *Trk1* et *Trk2*, impliqués dans le transport de  $K^+$  existent chez *Saccharomyces cerevisiae*. Le premier est nécessaire au développement du transport à forte affinité et le second au développement du transport à faible affinité. Les deux protéines chez la levure partagent 55% d'identité. Des homologues de ces gènes ont été clonés chez d'autres champignons, où ils constituent la famille appelée Trk, ainsi que chez les bactéries (Trk & Ktr) et chez les plantes où ils constituent la sous-famille appelée HKT (review en préparation dans ce contexte). Concernant leurs fonctions, de différentes sélectivités ont été décrites : spécificité pour le potassium (symport  $K^+:H^+$  ou uniport  $K^+$ ) chez les levures (Gaber *et al.*, 1988; Ko & Gaber, 1991) mais perméabilité à la fois au sodium et au potassium, ou même perméabilité uniquement à  $Na^+$  chez les plantes (Rubio *et al.*, 1995; Schachtman & Liu, 1999; Mäser *et al.*, 2002; Berthomieu *et al.*, 2003).

L'analyse du transporteur potassique de type Trk a été avancée dans le cadre du travail de Thèse de Claire Corratgé (co-direction Hervé Sentenac et moi-même). Nous avons obtenu et analysé la séquence complète du gène codant pour le transporteur, appelé *HcTRK*, étudié son expression et ses caractéristiques fonctionnelles (Corratgé *et al.*, 2007; **Publication 2**; Figure 10 A-D).

Une banque d'ADN génomique a été criblée à l'aide d'une sonde correspondant à l'EST codant pour *HcTrk*. Les phages positifs issus du criblage ont été analysés par PCR. L'ADN de deux phages a été purifié et analysé par Southern Blot avec une sonde pleine longueur (correspondant à l'EST) et une sonde correspondant à la région N-terminale. Les fragments positifs ont été sous-clonés et analysés. Cette analyse a permis la vérification de la région N-terminale de transporteur Trk et également l'identification de la région promotrice. L'analyse du gène *HcTrk* a révélé la présence d'un nombre élevé d'introns (20) de petite taille (entre 46 et 74 pb) qui interrompent la phase ouverte de lecture et représentent environ 33 % du gène. Ce type de structure a été retrouvé chez quelques autres gènes d'*Hebeloma cylindrosporum* déjà analysés et pourrait être typique des gènes de basidiomycètes. *HcTrk* encode une protéine de 791 acides aminés. Le profil d'hydropathie du polypeptide *HcTrk* montre au moins une dizaine de segments transmembranaires potentiels. Une structure commune aux transporteurs eucaryotes de type Trk et HKT et aux transporteurs prokaryotes KtrB et TrkH a été proposée par Durell et ses collègues (Durell & Guy, 1999; Durell *et al.*, 1999; Zeng *et al.*, 2004). Quatre domaines MPM (pour membrane / pore / membrane) seraient assemblés pour



**Figure 10.** Transport du potassium au sein de la symbiose ectomycorhizienne chez *Hebeloma cylindrosporum*. Deux systèmes de transport de  $K^+$  ont été identifiés grâce à la banque d'ESTs (Lambilliotte *et al.*, 2004), un transporteur de type Trk (Corratgé *et al.*, 2007) et un canal de type *Shaker*. **(A-D)** Le transporteur *HcTrk*. **(A)** Structure modèle de la protéine. **(B)** Structure du gène avec 20 introns de la taille de 50-60 pb (ADNc 2.4 kb). **(C)** Complémentation de la levure déficiente en transporteur du potassium. Caractérisation fonctionnelle en ovocytes de xénope. L'expression de *HcTrk* induit les courants potassiques et sodiques. **(E-H)** Le canal *HcSKC*. **(E)** Structure modèle du canal de type *Shaker*. **(F)** Structure du gène avec 6 introns (ADNc 1.4 kb). **(G)** Le canal SKC d'*Hebeloma* est homologue aux canaux animaux de la famille *Shaker* suggérant qu'il s'agit d'un canal sortant. Mais la caractérisation fonctionnelle a jusqu'ici échoué. **(H)** Caractérisation fonctionnelle en ovocytes de xénope. L'expression de *HcTrk* induit les courants potassiques et sodiques. **(G)** Criblage du gène et Southern blot ont révélé l'existence de 4 copies de SKC dans la souche h1 d'*Hebeloma*. **(I)** Modèle du travail sur le transport du potassium au sein de la symbiose ectomycorhizienne. L'hypothèse est que le transporteur est responsable de l'absorption du potassium et le canal du transfert du potassium vers des racines de la plante.

former le pore du transporteur, qui serait responsable de la sélectivité ionique de la perméation.

Nous avons montré, par complémentation fonctionnelle de levures *Saccharomyces cerevisiae* déficientes pour le transport de potassium (*trk1* et *trk2*, souches mutantes *Wagf2* et  $W\Delta 6$ ), qu'*HcTrk* est effectivement doté d'une activité d'absorption de  $K^+$ . En plus, les caractéristiques fonctionnelles ont été analysées en système hétérologue, après expression dans les ovocytes de xénope, à l'aide des techniques de l'électrophysiologie. Les données obtenues dans l'ovocyte constituent la première caractérisation électrophysiologique d'un transporteur fongique de la famille Trk. Elles indiquent qu'*HcTrk* génère des courants entrants s'activant instantanément et qu'il est perméable à  $K^+$  mais aussi à  $Na^+$ . Le transporteur ne laisse pas passer  $Rb^+$ ,  $Li^+$  et  $Cs^+$ . Aucune dépendance de courants au pH a été détectée. La perméabilité de *HcTrk* au  $Na^+$  n'était pas attendue au départ. L'ensemble de ces résultats appuie l'hypothèse d'un transporteur présentant un long pore, analogue à celui d'un canal. Des interactions entre  $Na^+$  et  $K^+$  au sein de ce pore pourraient générer un couplage, à stoechiométrie variable, entre les flux de ces deux ions.

Nous avons démarré l'étude de l'expression du gène *HcTrk* à la fois par Northern blot chez le mycélium cultivé en milieu liquide et par RT-PCR chez le champignon cultivé en condition de symbiose. L'effet de la composition du milieu de culture et la localisation du transcrite dans la mycorhize et les hyphes périphériques ont été analysés. Les données d'expression obtenues par Northern blot chez le champignon cultivé *in vitro* n'ont révélé aucune régulation transcriptionnelle d'*HcTrk* en fonction de la disponibilité de  $K^+$ , de  $Na^+$  ou du pH du milieu. Les analyses d'expression réalisées par RT-PCR chez le champignon en association symbiotique avec *Pinus pinaster* montrent qu'*HcTrk* est exprimé au niveau des hyphes périphériques explorant le sol. *HcTrk* pourrait donc jouer un rôle dans le prélèvement de  $K^+$  et  $Na^+$  à partir de sols forestiers pauvres. L'ensemble du travail sur *HcTrk* a été publié (Corratgé *et al.*, 2007) et un article de revue sur la famille de transporteurs Trk/Ktr/HKT chez les bactéries, champignons et chez les plantes est en préparation.

#### IV.3.2. Identification et analyse d'une famille de canaux de type *Shaker*

Parmi les ESTs, nous avons initialement identifié un canal correspondant à la famille des canaux potassiques de type *Shaker* (Figure 10 E-H), une famille bien connue chez les animaux comme chez les végétaux (Cf. III.1.; Armstrong & Hille, 1998; Zimmermann & Sentenac, 1999). L'identification de ce canal potassique chez un champignon est particulièrement intéressante car aucun canal de type *Shaker* ne peut être identifié dans le génome de la levure *S. cerevisiae*. Par contre, *S. cerevisiae* possède un canal potassique appelé TOK1, qui représente une structure unique, caractérisée par la présence de huit segments transmembranaires et de deux régions "pore" (Ketchum *et al.*, 1995). TOK1 est un canal rectifiant sortant. Il faut aussi noter, dans ce contexte, que la présence de canaux potassiques de type *Shaker* n'avait pas encore été décrite dans la littérature sur les champignons.

L'analyse phylogénétique indique que le canal d'*Hebeloma*, que nous avons appelé *HcSKC1*, est plus proche des canaux animaux que des canaux de plantes. Cette homologie suggère que *HcSKC1* pourrait jouer un rôle dans la sécrétion du potassium car les canaux animaux dont il est le plus proche sont des canaux sortants. L'analyse de l'ADN génomique et le criblage ont révélé l'existence d'une famille multigénique d'au moins quatre membres, présentant un très fort taux de

similarité dans la souche monokaryotique h1. Une analyse de l'ADN génomique par Southern Blot avec de différentes souches d'*Hebeloma* a révélé l'existence d'une grande variabilité dans la redondance de ce canal chez les souches h7 et h1 (une seule copie d'un gène homologue de *HcSKC* dans la première souche, et 4 copies dans la seconde). Ce résultat est très intéressant, mais a compliqué les approches de clonage des ADNc pleine longueur et l'étude de l'expression fonctionnelle. L'analyse des différents clones génomiques a permis de déterminer la structure génique d'*HcSKC*, révélant la présence de six introns d'une taille entre 50 et 60 pb, comparable avec les données sur *HcTrk*.

L'expression d'*HcSKC* a été analysée dans un premier temps (sans possibilité de distinguer les différents transcrits possibles) à la fois par Northern blot (pour le champignon en culture *in vitro*) et par RT-PCR (champignon en symbiose). *HcSKC* est détecté dans les mycorhizes et son expression ne semble pas être dépendante des conditions de la culture (concentration  $K^+$ ,  $Na^+$ , pH).

Tous les essais d'expression et de caractérisation fonctionnelle en système hétérologue, en exprimant au début la séquence correspondant à l'EST *HcSKC1* dans des ovocytes de xénope, ont été négatifs. Ensuite, l'identification d'un nouveau codon ATG a défini un nouvel ADNc d'*HcSKC*, qui a été cloné dans le vecteur d'expression dans l'ovocyte. Nous avons obtenu deux ADNc, appelé *SKC1A* et *SKC1B*, avec six différences au niveau nucléotidique (deux différences au niveau polypeptidique). Ces constructions, après transcription *in vitro* et injection d'ARN dans les ovocytes de xénope, n'ont toujours pas généré de courants significatifs, ni sortants ni entrants. De même, la correction d'un problème potentiel dans le vecteur d'expression pGEMDG (présence d'un autre ATG dans la cassette de clonage au niveau de sites de restriction) n'a pas permis d'observer de courant. La seule observation était que l'expression de notre canal fongique provoque régulièrement une stimulation de courants endogènes à l'ovocyte aux potentiels hyperpolarisants. Cette observation est aussi faite pour d'autres canaux (GLR, CIC) par d'autres chercheurs et semble être associée à une simple surexpression de protéines étrangères dans les ovocytes.

Après ces séries de tentatives en ovocytes de xénope qui n'ont pas abouti à l'observation d'un courant imputable à l'expression d'*HcSKC1*, il était nécessaire d'essayer d'autres systèmes d'expression. Nous avons choisi l'expression dans les cellules COS comme autre système hétérologue animal, cloné *HcSKC* dans un vecteur de l'expression adapté (pCI), fait les transfections transitoires, et ensuite testé le canal par la technique de patch-clamp dans ces cellules. Malgré ce changement du système de l'expression et ainsi du contrôle de solutions externes et internes, aucun courant significatif causé par *HcSKC* n'a été détecté.

Finalement, un autre espoir de révéler les propriétés fonctionnelles de ce canal de type *Shaker HcSKC* serait le clonage d'un canal plus long au niveau de N-terminus, car nous avons détecté un autre transcrit différent au niveau de l'extrémité 5', en plus du canal *HcSKC1* (*SKC1A* & *B*) isolé. La séquence de ce transcrit, appelé *HcSKC2*, correspond à une autre séquence génomique (phage V1) et représente, en amont de la séquence codant un motif N-terminal commun "ASASTIEL", trois autres ATG dans le cadre de lecture ouvert. Les expériences pour amplifier et cloner ce canal *SKC2* sont en route, avec l'espoir de pouvoir enfin caractériser la fonction de ce canal *Shaker* fongique.

En résumé, pour ces deux systèmes de transport de  $K^+$ , le transporteur *HcTrk* (Cf. IV.3.1.) et le canal de type *Shaker*, l'hypothèse de travail (Figure 10I) retenue est la suivante : le système *Trk* serait responsable du prélèvement de  $K^+$  à partir du sol, et le canal  $K^+$  assurerait ensuite la sécrétion de ce cation en

direction de la plante hôte (activité de sécrétion suggérée par les similarités de séquence avec les canaux sortants animaux). Il faudrait vérifier et éventuellement confirmer ce modèle par la détermination de propriétés fonctionnelles du canal SKC, par la localisation précise de ces systèmes de transport potassique et par des approches génétiques (*Cf. V.*).

## B PROJET DE RECHERCHE

Mon projet, qui cible le transport transmembranaire, en continuité de mes travaux antérieurs, principalement dans la symbiose ectomycorhizienne (V.) mais aussi dans la plante (VI.), a pour but la caractérisation moléculaire de mécanismes d'absorption et d'échange du potassium et d'autres éléments nutritifs. En plus, en collaboration avec des collègues de l'équipe, l'analyse de transporteurs impliqués dans le transport d'anions est envisagée (VII.)

### V. Symbiose ectomycorhizienne - mécanismes des échanges entre champignon et plante hôte

#### Résumé du projet

La symbiose mycorhizienne a permis la conquête des terres émergées par les premiers végétaux et constitue un phénomène biologique majeur des écosystèmes terrestres. Le champignon assure le prélèvement des ions nutritifs du sol et les transfère à la plante hôte, en échange de photosynthétats. Cependant, malgré son importance sur la productivité des écosystèmes, nos connaissances sur les mécanismes moléculaires contrôlant l'interaction symbiotique et les transports membranaires de solutés sont encore très réduites.

Dans ce contexte, l'objectif de mon projet, en continuité des travaux antérieurs (Cf. IV.), est de décortiquer les mécanismes moléculaires nécessaires à la fonctionnalité de la symbiose ectomycorhizienne dans le continuum sol-hyphe-plante pour les deux espèces fongiques modèles, qui sont *Hebeloma cylindrosporum* et, à terme, *Laccaria bicolor*, respectivement associées à un gymnosperme (*Pinus pinaster*) et un angiosperme (*Populus trichocarpa*). Les régulations moléculaires existantes à l'interface cellule fongique-cellule hôte des ectomycorhizes, représentée par le réseau de Hartig, seront étudiées. Cet axe de recherche sur la symbiose mycorhizienne, a pour objectif la caractérisation moléculaire de transporteurs membranaires du partenaire fongique, et l'étude des rôles de ces protéines dans la symbiose chez le champignon modèle. L'analyse des mécanismes d'absorption et de transfert de solutés impliqués dans la symbiose ectomycorhizienne est conduite en combinant les techniques de biologie moléculaire, d'imagerie et d'électrophysiologie. Mes priorités sont de compléter les travaux au niveau moléculaire et électrophysiologique par des approches cellulaires et les outils de l'imagerie.

Concernant les échanges de potassium, les gènes déjà identifiés chez *H. cylindrosporum*, qui codent un transporteur et un canal, sont des candidats extrêmement intéressants pour assurer respectivement l'absorption et l'efflux de potassium des hyphes extra-racinaires ou du réseau de Hartig. Les canaux et transporteurs potassiques ont été choisis comme cible privilégiée, eu égard aux rôles que ces protéines sont susceptibles d'avoir d'une part dans la nutrition (absorption de  $K^+$  à partir de la solution du sol, puis sécrétion de cet ion dans l'apoplasme cortical de la racine-hôte), et d'autre part dans le contrôle de la polarisation membranaire et les fonctions connexes (énergisation de la

membrane, transduction de signaux, signalisation champignon-arbre). L'absorption du sucre par le champignon en échange de la symbiose au niveau du réseau de Hartig est aussi très intéressante au niveau moléculaire et au niveau de la régulation. L'objectif est la détermination de leurs propriétés fonctionnelles et l'analyse de l'expression spatio-temporelle de ces gènes et de leurs produits durant l'interaction pour obtenir des informations pertinentes sur le fonctionnement d'une interaction si complexe. Dans ce cadre, une thèse par Muhammad Zulqurnain Haider a débuté en octobre 2008.

Ce projet permettra de progresser dans la compréhension des mécanismes de signalisation contrôlant l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne, et des systèmes responsables du transfert de solutés du champignon à la plante, impliquant une spécialisation de la membrane plasmique chez le champignon entre sites de prélèvement et sites de sécrétion.

### V.1. La symbiose ectomycorhizienne & le contexte du projet

La symbiose mycorhizienne, associant les champignons avec les racines de plantes, détermine la productivité d'écosystèmes végétariens. Les ectomycorhizes se trouvent essentiellement sur des espèces ligneuses, qui représentent moins de 3% des taxons végétaux mais qui constituent l'essentiel des forêts des régions tempérées, montagneuses et boréales. Les champignons ectomycorhiziens sont dans la plupart des cas des Basidiomycètes (*Boletus*, *Chanterelles*, *Amanitas*, ...), et ils sont associés aux gymnospermes (*Pinus*, *Abies*, *Picea*, *Pseudotsuga*, ...) comme aux angiospermes (*Quercus*, *Fagus*, *Populus*, ...). Dans ces associations arbre-champignon, le mycélium forme un manchon continu autour de la racine. Les hyphes, qui s'insinuent entre les cellules de l'épiderme et du cortex racinaire, constituent le réseau de Hartig. A l'extérieur de ce réseau et du manchon périphérique, le champignon explore le sol par l'intermédiaire d'hyphes individuelles, de rhizomorphes et/ou de cordons mycéliens. C'est dans l'interface spécialisée, dans le réseau de Hartig, que le métabolisme du champignon est soumis à une réorientation, peu comprise à ce jour, et les nutriments absorbés par les hyphes extraradicales sont sécrétés vers la plante. Les ectomycorhizes sont des organes complètement nouveaux, leur différenciation implique la reconnaissance entre deux partenaires compatibles, l'échange de molécules et un changement de l'expression de gènes (Martin *et al.*, 2001 & 2007; Martin, 2008). L'expression différentielle de gènes du champignon entre différents sites a été montrée pour le champignon ectomycorhizien *Paxillus involutus* indiquant une spécialisation de tissus (Wright *et al.*, 2005).

La symbiose mycorhizienne favorise la croissance de l'espèce-hôte. Elle pourrait stimuler la résistance des racines à certains pathogènes du sol ainsi qu'à augmenter leur résistance à la présence de métaux lourds. On considère cependant que le phénomène le plus important est une amélioration de la nutrition hydrominérale de la plante (Smith & Read, 1997). De nombreux travaux indiquent en effet que la mycorhization favorise l'acquisition par la plante de la plupart des éléments nutritifs (N, P, K et micro-éléments) (Smith & Read, 1997; Buscot *et al.*, 2000; Chalot *et al.*, 2002; Cairney, 2005). Pour la nutrition potassique, au moins 5-6% du potassium total de la plante sont d'origine de cette symbiose (Jentschke *et al.*, 2001). Le potassium est récupéré dans le sol par dégradation biologique de roches. L'augmentation (par rapport à un contrôle non mycorhizé) est particulièrement marquée pour les ions dont la disponibilité dans le sol est la plus limitante. Les approches (éco)physiologiques ont décrit les

effets bénéfiques de cette symbiose sur la nutrition minérale et le développement de la plante hôte.

Le champignon assure le prélèvement des ions nutritifs du sol et les transfère à la plante hôte, en échange de photosynthétats livrés par la plante (Nehls *et al.*, 2001; Fajardo Lopez *et al.*, 2008). La symbiose est bénéfique pour les deux organismes car, le champignon et la plante sont caractérisés par un mode de vie différent mais complémentaire. Deux hypothèses, non exclusives l'une de l'autre, sont cependant très généralement acceptées. (1) Pour une même quantité de carbone allouée à la fonction d'acquisition des ions nutritifs, la mycorhization permettrait d'augmenter le volume de sol exploré. (2) L'hyphe mycélienne aurait une aptitude plus grande que celle de la racine à mobiliser des éléments nutritifs peu disponibles (*e.g.* phosphore présent dans les composés organiques du sol, ions  $\text{NH}_4^+$  rétrogradés dans les phyllosilicates, ions  $\text{K}^+$  liés au réseau cristallin des phyllosilicates), et le champignon disposerait de systèmes d'absorption plus performants que ceux de la plante (Jongmans *et al.*, 1997; Wallander & Wickman, 1999; Landeweert *et al.*, 2001). Toutefois, au niveau moléculaire, nos connaissances sur les mécanismes contrôlant cette interaction symbiotique et les transports membranaires de solutés sont encore réduites.

Des progrès significatifs ont été faits dans la recherche de symbiose ectomycorhizienne, d'une part par le séquençage récemment achevé du premier génome d'un champignon ectomycorhizien, *Laccaria bicolor*, ouvrant l'ère génomique dans ce domaine (Martin *et al.*, 2008; Martin & Selosse, 2008; <http://genome.jgi-psf.org/Lacbi1/Lacbi1.home.html>). Cette ressource est particulièrement intéressante car elle ouvrira la possibilité de choisir et isoler les nouveaux candidats impliqués dans l'assimilation et la sécrétion d'ions minéraux nutritifs de la cellule fongique via l'espace apoplastique. D'autre part, la recherche sur le champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum* des dernières années a permis à cette espèce d'être un autre modèle ectomycorhizien approprié pour disséquer au niveau moléculaire le rôle du champignon dans la symbiose ectomycorhizienne (Marmeisse *et al.*, 2004). Son cycle de vie est caractérisé par une phase haploïde et dicaryotique et autant haploïde que dicaryotique mycélium peuvent former les mycorhizes avec le pin maritime *P. pinaster*, permettant les études génétiques. *H. cylindrosporum* est le premier champignon ECM pour lequel les mutants ont été obtenus (Marmeisse *et al.*, 1992 & 1998). *Hebeloma* est particulièrement intéressant parce que (1) la transformation génétique du champignon est maîtrisée (Combié *et al.*, 2003; Bellion *et al.*, 2007; Ngari *et al.*, 2009) et (2) son cycle de vie complet de la spore à la spore peut être achevé dans des conditions entièrement contrôlées (Debaud & Gay, 1987). A ce jour, beaucoup d'outils sont disponibles pour les deux espèces modèles. Ces outils incluent pour *Laccaria* le génome entier (Martin *et al.*, 2008), et aussi de banques d'ESTs et les microarrays pour déterminer du profil de transcriptome. Pour *Hebeloma*, les ressources suivantes sont disponibles: une banque d'ADN génomique qui représente le génome haploïde (Jargeat *et al.*, 2000), la collection de mutants fongiques de 2000 lignes d'insertion de T-ADN (Combié *et al.*, 2003), deux banques de ADNc dans les vecteurs d'expression de levure permettant la complémentation fonctionnelle de mutantes de levure (Wipf *et al.*, 2003; Lambilliotte *et al.*, 2004) utilisés pour produire la banque d'ESTs fongiques. Les données d'ESTs ont été traitées par la plate-forme bioinformatique de *GénoPlante* à Evry, et cette ressource ainsi que son analyse bioinformatique sont mises à la disposition de la communauté scientifique internationale sur un site web (<http://urgi.versailles.inra.fr/projects/>) (Cf. IV.2.; Lambilliotte *et al.*, 2004).

Nous travaillons sur ces deux modèles. (1) Le champignon ectomycorhizien, *Hebeloma cylindrosporium*, a été retenu comme le premier modèle. *Hebeloma cylindrosporium* est une espèce caractéristique de l'écosystème dunaire de la côte atlantique européenne. Dans la forêt des Landes (sols sableux très pauvres), il est naturellement associé au pin maritime (*Pinus pinaster*). Ce champignon peut cependant former des mycorhizes fonctionnelles avec de nombreux végétaux ligneux, aussi bien gymnospermes qu'angiospermes, dont il améliore la croissance (Grange *et al.*, 1997; Gryta *et al.*, 1997; Marmeisse *et al.*, 2004). (2) A terme et en collaboration avec le laboratoire de Francis Martin (INRA, Nancy), nous travaillerons aussi sur le deuxième modèle, le premier champignon dont le génome est séquencé, *Laccaria bicolor*, partenaire symbiotique d'angiosperme *Populus trichocarpa* (Martin *et al.*, 2008; Martin & Selosse, 2008).

Plusieurs gènes, jouant probablement un rôle dans l'échange symbiotique, ont été identifiés et partiellement caractérisés (Chalot *et al.*, 2002; Fajardo Lopez *et al.*, 2008; Lucic *et al.*, 2008), dont des systèmes de transport pour les nutriments majeurs: le sucre (Nehls *et al.*, 1998), l'ammonium (3 gènes: Javelle *et al.*, 2001 & 2003), le nitrate (1 gène: Jargeat *et al.*, 2003), les acides aminées (2 gènes: Wipf *et al.*, 2002), les oligopeptides (2 gènes: Benjdia *et al.*, 2006). L'ensemble des résultats concernant le transport de nitrate au sein de la symbiose ectomycorhizienne a récemment été rassemblé dans un article de revue (Müller *et al.*, 2007). En plus, nous avons isolé et en partie caractérisé deux transporteurs de phosphate (2 gènes: Tatry *et al.*, 2009), un canal potassique de type *Shaker* et un transporteur potassique de la famille Trk (Lambilliotte *et al.*, 2004; Corratgé *et al.*, 2007) du champignon *Hebeloma cylindrosporium* (Cf. IV.). L'identification de ces deux systèmes du transport du potassium est spécialement intéressante car cela ouvre l'opportunité d'étudier les processus de transport sur les deux sites, l'absorption de nutriments comme la sécrétion via la plante hôte. Le transporteur du potassium a été caractérisé par des moyens de l'électrophysiologie via une expression hétérologue dans les ovocytes de *Xenopus* (Corratgé *et al.*, 2007) montrant que l'expression fonctionnelle de systèmes de transport du champignon est bien possible dans ce type de système hétérologue. Les transporteurs de phosphate ont été caractérisés par expression fonctionnelle dans la levure et la régulation de leur expression en dépendance de phosphate a été étudiée (Tatry *et al.*, 2009). Cependant, la localisation précise d'expression de ces systèmes de transport du champignon est manquante. Des premiers résultats ont été obtenus avec des méthodes innovantes pour le champignon (Cf. V.5.2.; Corratgé, 2006; Van Aarle *et al.*, 2007).

## V.2. Objectifs du projet sur la symbiose ectomycorhizienne

Le projet a pour but de décortiquer les mécanismes moléculaires nécessaires à la réalisation des échanges dans le continuum sol-hyphe-plante dans le cas de la symbiose ectomycorhizienne associée à la plupart des espèces ligneuses des forêts boréales et tempérées. L'objectif scientifique du projet est d'attribuer des rôles aux gènes fongiques qui sont potentiellement impliqués dans l'absorption et les efflux d'ions dans les ectomycorhizes, en particulier dans l'espace apoplasmique commun aux deux types de cellules et de savoir comment ils interagissent pour produire une symbiose fonctionnelle. Pour cela, nous disséquons les mécanismes moléculaires qui sont supposés jouer un rôle important dans la dynamique des flux des ions nutritifs à la fois aux sites d'absorption (mycélium extra-racinaire) et de libération (réseau de Hartig) de ces

ions minéraux. Ces analyses vont contribuer à répondre aux questions concernant des mécanismes moléculaires responsables de la polarisation et de la différenciation de la membrane plasmique entre site d'absorption et site de sécrétion dans la racine ectomycorrhizienne. Les objectifs spécifiques du projet seront d'établir pour les gènes candidats, en utilisant différentes approches, (1) la caractérisation fonctionnelle, (2) la dynamique spatio-temporelle des transcrits et des protéines dans les cellules fongiques, (3) l'analyse de la régulation de l'expression et (4) l'analyse du rôle des gènes candidats dans leur contexte.

Plus spécifiquement, les gènes candidats en priorité résultent de nos travaux antérieurs. Dans la banque d'ESTs du champignon *Hebeloma cylindrosporum*, un canal potassique de la famille *Shaker* (HcSKC) a été identifié, mais n'est pas encore caractérisé fonctionnellement à ce jour. Il existe un deuxième transcrit de ce canal avec un N-terminus prolongé en comparaison avec le premier transcrit isolé au départ. En plus, chez *Laccaria bicolor*, un canal homologue à HcSKC a été identifié. D'autre part, un transporteur de sucres se trouve dans la ressource d'ESTs d'*Hebeloma* et pourrait participer à l'absorption par le champignon de sucres en provenance de la plante. L'objectif du présent projet sera en priorité la caractérisation de ces systèmes de transport du champignon ainsi que leur localisation (et la localisation de gènes déjà caractérisés, HcTrk, HcPT1 & HcPT2). La caractérisation fonctionnelle de ces gènes candidats sera effectuée en utilisant l'expression en systèmes hétérologues (ovocyte de Xénope, cellules COS, complémentation de mutantes de levure) et l'électrophysiologie. La localisation de gènes au sein du champignon en contact symbiotique avec la plante hôte, l'arbre *Pinus pinaster*, permettra de comprendre le rôle des systèmes de transport. La différenciation du champignon pendant la symbiose entre l'interface sol-champignon et l'interface cellule fongique-cellule hôte des ectomycorrhizes, représentée par le réseau de Hartig, est probablement accompagnée par une expression spécifique de transporteurs et canaux.

Pour atteindre les objectifs, la stratégie de recherche sera basée sur la combinaison d'outils cellulaires, physiologiques et moléculaires qui sont nécessaires pour établir la localisation et la fonction des gènes candidats potentiellement impliqués dans les échanges de nutriments dans les deux associations ectomycorrhiziennes modèles, l'association entre le pin maritime et *Hebeloma cylindrosporum* et le peuplier et *Laccaria bicolor*. Les gènes ciblés sont soit déjà disponibles, soit seront obtenus d'après les séquences du génome de *Laccaria bicolor*. Du point de vue méthodologique, le projet fera appel aux approches d'électrophysiologie, de marquage *in situ* de transcrits de gènes d'intérêt (hybridation) et de suivi de l'expression de promoteurs (GFP/GUS) et/ou de protéines de fusion (type GFP). Les gènes chimériques correspondants seront introduits dans *Hebeloma* par transgénèse via *Agrobacterium*. Les observations et acquisitions d'images seront réalisées par microscopie confocale à déconvolution spectrale permettant de traiter l'autofluorescence des tissus de la plante hôte *P. pinaster*.

Un travail de Thèse a débuté en octobre 2008 (par Muhammad Zulqurnain Haider) visant à caractériser les propriétés fonctionnelles d'un canal potassique et d'un transporteur de sucres du champignon ectomycorrhizien *Hebeloma cylindrosporum*, et à préciser leur localisation au sein de la mycorrhize, pour comprendre leur rôle dans les échanges de solutés entre les deux partenaires.

### V.3. Analyse du transport de K<sup>+</sup>

L'objectif prioritaire de mon programme est de déterminer le rôle des transporteurs et canaux potassiques dans la fonction de nutrition potassique du champignon et de l'arbre-hôte: prélèvement des ions K<sup>+</sup> du sol par des transporteurs et / ou canaux de type entrant, sécrétion de ces ions en direction de l'hôte par des canaux de type sortant. Au-delà de ces fonctions, il est probable que le contrôle de l'activité des canaux K<sup>+</sup> participe à la régulation des flux d'ions nutritifs du champignon à l'hôte, via le rôle que ces protéines exercent sur la régulation du gradient de potentiel électrique transmembranaire qui, avec le gradient de pH, énerge la membrane et assure le couplage énergétique de l'ensemble des transports (Pi, sucres, acides aminés etc.).

Pour les deux systèmes de transport du K<sup>+</sup> identifiés chez *Hebeloma cylindrosporum*, le modèle retenu est le suivant: le système HcTrk serait responsable du prélèvement de K<sup>+</sup> (et Na<sup>+</sup>?) à partir du sol, et le canal K<sup>+</sup> HcSKC assurerait ensuite la sécrétion de ce cation en direction de la plante hôte (activité de sécrétion suggérée par les similarités de séquence avec les canaux sortants animaux). Pour confirmer ce modèle, la priorité, à court terme, sera d'avancer la caractérisation fonctionnelle du canal potassique, soit par clonage et expression du canal plus long dans un système hétérologue classique (ovocytes, COS), soit par co-expression de ces deux canaux (SKC1 & SKC2), soit par utilisation de protoplastes de tabac comme autre système de l'expression.

Les priorités et objectifs sont (1) l'isolement d'ADNc pleine longueur pour les canaux SKC de type *Shaker* chez *Hebeloma* (transcrit HcSKC2) et des homologues chez *Laccaria bicolor*, afin (2) de déterminer leurs caractéristiques fonctionnelles, (3) préciser la localisation de l'expression de ces gènes (transporteur *Trk* & canal *SKC*) et les régulations (stratégie du gène rapporteur et/ou hybridation *in situ*, Cf. V.5., ci-dessous) et (4) déterminer le rôle de ces gènes dans la nutrition potassique du champignon et de la plante par approche génétique (RNAi, mutants) (Cf. V.6., ci-dessous).

L'opération de séquençage systématique d'ESTs d'*Hebeloma* a facilité la première étape, l'identification de canaux ioniques et transporteurs. L'étroite proximité de séquence des membres de la famille multigénique HcSKC avec les *Shaker* animaux traduit vraisemblablement une proximité en termes de caractéristiques fonctionnelles (*i.e.* canal rectifiant sortant). HcSKC pourrait donc constituer un modèle moléculaire d'étude de la fonction de transfert de solutés nutritifs du champignon vers sa plante hôte. Dans ce contexte, l'isolement de l'ADNc complet des différentes copies d'HcSKC (HcSKC2 en plus de HcSKC1) et des homologues chez *Laccaria bicolor* (LbSKC) ainsi que l'acquisition de certitudes vis-à-vis des caractéristiques fonctionnelles de cette famille de gènes représentent des objectifs prioritaires. D'autre part, l'analyse de la ressource d'ESTs a révélé une séquence, appelée HcTrk, homologue des transporteur *Trk* identifiés chez la levure et donc susceptible de participer à la fonction de prélèvement de K<sup>+</sup> à partir du sol (Corratgé *et al.*, 2007). Nous disposerions alors de deux systèmes de transport permettant l'étude de l'intégration des fonctions de prélèvement et de sécrétion chez le champignon.

L'objectif est de déterminer les caractéristiques fonctionnelles de ce canal HcSKC (et/ou LbSKC) par expression en système hétérologue. Pour la caractérisation fonctionnelle, nous disposons de différents systèmes d'expression (levures, ovocytes, cellules COS, protoplastes). L'expression dans une souche de levure (*S. cerevisiae*) déficiente pour le transport de K<sup>+</sup> permettra de se faire une première idée des caractéristiques fonctionnelles des types de systèmes de

transport potassique. Pour une analyse électrophysiologique, les ADNc sont exprimés dans des ovocytes de xénope, ou en cas d'échec (jusqu'à maintenant pour le canal HcSKC1), dans des cellules de mammifère ou dans les protoplastes. Il faut disposer de plusieurs systèmes alternatifs dans ce type d'approche, parce qu'il arrive que certains canaux s'expriment sous forme fonctionnelle dans un système et pas dans un autre. L'objectif de cette phase de caractérisation fonctionnelle en système hétérologue sera d'établir la "carte d'identité" (définition des caractéristiques fonctionnelles et pharmacologiques) de systèmes du transport identifiés chez le champignon.

Dans un premier temps, l'analyse de l'expression de gènes candidats, *HcTrk* & *HcSKC*, a été conduite par Northern blot chez le champignon cultivé *in vitro* en absence de plante hôte, et par RT-PCR chez le champignon en symbiose (la quantité d'ARN extraite à partir de mycorhizes et hyphes périphériques étant limitante pour l'analyse par Northern).

Ensuite, il sera indispensable de préciser les patrons d'expression spatio-temporels des gènes étudiés et la localisation au niveau sub-cellulaire des protéines correspondantes, pour comprendre le rôle que ces gènes jouent dans l'association symbiotique avec la plante. Par exemple, il faudrait déterminer si le canal potassique identifié est exprimé dans les hyphes périphériques ou les hyphes du réseau de Hartig (au contact des cellules racinaires), et s'il est exprimé sur la membrane plasmique ou une autre membrane cellulaire. Autrement dit, des outils d'imagerie cellulaire doivent être adaptés et développés pour l'étude de la symbiose mycorhizienne (Cf. V.5., ci-dessous).

#### V.4. Analyse du transport de sucre

En complément de notre modèle impliquant l'absorption et la sécrétion des ions nutritifs ( $K^+$ ), l'analyse d'un transporteur fongique impliqué dans l'absorption de sucre au sein de l'interaction symbiotique avec la plante (au niveau du réseau de Hartig) sera très intéressante. Si la plante profite de la symbiose grâce à une meilleure nutrition minérale, les bénéfices du champignon sont d'ordre trophique. En fait, la principale source de nutriments organiques pour un champignon ectomycorhizien provient des photosynthétats de la plante, plus spécifiquement des sucres simples. Ces sucres sont principalement le saccharose, le glucose et le fructose contenus dans l'apoplaste commun à l'interface entre les deux organismes (Nehls *et al.*, 2000).

Des transporteurs de monosaccharides ont été identifiés chez le champignon basidiomycète *Amanita muscaria* (Nehls *et al.*, 1998 & 2001) et chez l'ascomycète *Tuber borchii* (Polidori *et al.*, 2007). Récemment, le premier transporteur de monosaccharides d'un Gloméromycète a été cloné (Schüssler *et al.*, 2006).

Parmi la collection d'ESTs, nous avons identifié une étiquette codant pour un transporteur de sucre chez *Hebeloma cylindrosporum*. La première étape pour l'analyse de ce transporteur du sucre sera le clonage de son ADNc complet à partir de séquences disponibles, et ainsi la préparation de plasmides pour l'expression fonctionnelle en systèmes hétérologues comme la levure et les ovocytes de Xénope. Le but sera ensuite la caractérisation fonctionnelle du transporteur de sucres après expression en systèmes hétérologues, dans la levure pour une complément de mutants de transport de sucres et dans des ovocytes de xénope pour une caractérisation électrophysiologique. A terme, pour mieux comprendre la régulation et le rôle de ce transporteur du sucre chez le champignon, sa localisation au sein de la symbiose par construction des

plasmides promoteur-*GFP/GUS* et transformation du champignon via *Agrobacterium* et/ou par hybridation *in situ* (Cf. V.5.), et les analyses de mutants et/ou lignes RNAi (Cf. V.6.) sont envisagés.

#### V.5. Localisation de systèmes de transport au sein de la symbiose

Dans le cadre de l'hypothèse de travail sur les systèmes de transport du potassium, nous supposons que HcTrk serait exprimé plutôt dans les hyphes explorant le sol et les hyphes périphériques du manteau, et HcSKC au contact des cellules racinaires dans le réseau de Hartig. La présence de transcrits *HcTrk* a pu être mise en évidence par des expériences de RT-PCR dans les hyphes périphériques du champignon, cultivé en condition de symbiose avec *P. pinaster* (Corratgé *et al.*, 2007). Des transcrits *HcTrk* ont également été localisés dans des préparations de mycorhizes. Des analyses réalisées pour HcSKC ont permis de localiser l'expression d'*HcSKC* dans les mycorhizes. Pour analyser de façon plus précise la localisation de ces systèmes de transport (et d'autres), l'utilisation des approches de transgénèse (Cf. V.5.1.) et de la technique d'hybridation *in situ* (Cf. V.5.2.) est envisagée.

L'objectif sera d'analyser la localisation et la régulation de l'expression de gènes candidats impliqués dans les processus de transport. Nous chercherons à répondre aux questions suivantes:

- L'expression est-elle constitutive ou associée à l'établissement de la symbiose ?
- L'expression est-elle localisée à certaines structures (réseau de Hartig, manchon fongique, hyphes extérieures) ou concerne-t-elle l'ensemble du mycélium ?
- Le niveau d'expression est-il sensible à la disponibilité de nutriments transportés (K<sup>+</sup> / sucre)?

Ces questions concernant la localisation et régulation de systèmes de transport au sein de membranes fongiques polarisées pendant la symbiose demandent le développement et l'application de techniques de la localisation de transcrits et protéines et des outils de l'imagerie. Cet effort méthodologique, en collaboration avec des partenaires, va mettre à disposition les outils pour la communauté de la symbiose.

Du point de vue méthodologique, cette partie du projet sera fondée sur des approches de marquage *in situ* de transcrits de gènes d'intérêt (hybridation ou RT-PCR) et de suivi de l'expression de transcrits (promoteur-*GUS/GFP*) et/ou de protéines de fusion avec GFP. Les gènes chimériques correspondants seront introduits dans *Hebeloma* par transgénèse via *Agrobacterium*. Les observations et acquisitions d'images seront réalisées par microscopie confocale à déconvolution spectrale permettant de traiter l'autofluorescence particulièrement intense des tissus de la plante-hôte *Pinus pinaster*. L'accent sera mis sur l'utilisation d'outils nouveaux comme le microscope multiphoton qui permet une observation en profondeur des tissus ou encore le "Real Time Microscope" dont le pôle Montpellier Rio Imaging possède le seul exemplaire en France. Cette nouvelle technologie est particulièrement bien adaptée à la visualisation *in vivo* des systèmes membranaires car elle produit des images en lumière visible avec une très grande résolution, un très fort contraste et une très grande fidélité des couleurs. Ce type de microscope devrait donc générer des données nouvelles et originales *in vivo* sur la dynamique des interactions mycélium-racine et du fonctionnement de la symbiose ectomycorhizienne.





































