



HAL
open science

Electrophysiologie et physiologie moléculaire des transports membranaires chez les végétaux

Anne-Aliénor Véry

► **To cite this version:**

Anne-Aliénor Véry. Electrophysiologie et physiologie moléculaire des transports membranaires chez les végétaux. *Vegetal Biology*. 2006. tel-02815982

HAL Id: tel-02815982

<https://hal.inrae.fr/tel-02815982>

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

Dossier présenté à l'Université Montpellier II
en vue de l'obtention du

Diplôme d'Habilitation à Diriger des Recherches

Discipline: Physiologie Moléculaire des Plantes

Par

Anne-Aliénor Véry

Biochimie & Physiologie Moléculaire des Plantes

UMR 5004 CNRS - INRA – Agro.M - Université Montpellier II

Electrophysiologie et physiologie moléculaire des transports membranaires chez les végétaux

Soutenance le 12 mai 2006

devant le jury :

Hélène BARBIER-BRYGOO	DR CNRS, Gif sur Yvette	Rapporteur
Pierre CHARNET	DR CNRS, Montpellier	Examineur
Marcel CREST	DR CNRS, Marseille	Rapporteur
Jacques JOYARD	DR CNRS, Grenoble	Rapporteur
Alain PUGIN	Professeur, Université de Bourgogne	Examineur
Bruno TOURAINE	Professeur, Université Montpellier II	Examineur

Sommaire

CURRICULUM VITAE	2
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	3
EVALUATION DE LA RECHERCHE	7
ENCADREMENT	7
TRAVAUX EFFECTUES.....	11
Résumé du parcours scientifique.....	11
1. Etude du couplage entre le transport de K ⁺ et le transport d'H ₂ O dans un canal de Chara.....	13
2. Caractérisation dans l'ovocyte de xénope d'un des premiers canaux clonés chez les végétaux.....	16
3. Analyse de la réponse à NaCl des stomates de deux espèces d'Aster, une halophyte et une glycophyte: recherche des canaux impliqués dans cette réponse.	20
4. Caractérisation de canaux calciques impliqués dans la croissance polarisée des hyphes mycéliennes et des poils absorbants racinaires.....	24
5. SPIK, un canal entrant d' <i>Arabidopsis</i> essentiel pour la fertilité du pollen.....	28
6. Un nouveau type fonctionnel parmi les canaux Shaker végétaux identifié chez le maïs.	32
7. Autres activités depuis mon recrutement dans l'équipe <i>Canaux Ioniques</i> à Montpellier.....	35
Références.....	36
PROJET DE RECHERCHE: Rôle des transporteurs HKT dans l'homéostasie potassique et sodique et la résistance au stress salin chez le riz.....	37
Résumé du projet.....	37
1. Origine du projet.....	38
2. Données bibliographiques.....	39
2.1. Rôles de K ⁺ et Na ⁺ dans la cellule.....	39
2.2. Transports de K ⁺ et Na ⁺ et résistance au sel.....	40
2.3. Les systèmes de transport de K ⁺	41
2.4. Transporteurs HKT et résistance au sel.....	43
2.5. La famille HKT du riz.....	44
3. Intérêt du modèle riz et de la famille HKT du riz pour le projet.....	45
4. Projet.....	46
4.1. Objectifs et stratégies.....	46
4.2. Positionnement du projet au niveau international, groupes concurrents et atouts de notre équipe.....	47
4.3. Caractérisation fonctionnelle.....	48
4.4. Localisation subcellulaire.....	53
4.5. Analyse de la fonction des HKT dans la plante.....	53
4.6. Conclusion.....	54
Références.....	56

Curriculum vitae

Anne-Aliénor VERY

née le 26/02/1966
nationalité française
célibataire

Laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes

UMR 5004 Agro-M/INRA/CNRS/UM2

Institut de Biologie Intégrative des Plantes, Place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1

Tél: 04-99-61-25-74, FAX: 04-67-52-57-37

Mél: very@ensam.inra.fr

FORMATION ET DIPLOMES

1990-1994: **DOCTORAT**, spécialité Sciences Agronomiques préparé à l'ENSA-M (Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier). Thèse soutenue en décembre 1994 (félicitations écrites).

1990: **Diplôme d'Ingénieur Agronome** obtenu à l'ENSA-M.
DEA de Sciences Agronomiques, option nutrition minérale (Université Montpellier II).

1987-1990: Scolarité à l'ENSA-M.

1985-1987: Classes préparatoires Math Sup Bio et Math Spé Bio.

1985: Baccalauréat C.

RECHERCHE: formation et postes occupés

Depuis juillet 1999: **IE2 CNRS** (BAP A, SDV) au Laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes (UMR 5004 Agro-M/INRA/CNRS/UM2) de Montpellier (directeur: Prof. Claude Grignon).

Fév. 1996-juin 1999: **ASSISTANTE DE RECHERCHE (POST-DOC)** dans le "Plant Laboratory", à l'Université de York (Royaume Uni; 11 mois), puis dans le Département des Sciences Végétales, à l'Université de Cambridge (Royaume Uni), sous la direction du Dr Julia Davies. Contrats BBSRC.

Fév. 1995-Janv. 1996: **ASSISTANTE DE RECHERCHE (POST-DOC)** dans le "Plant Laboratory", à l'Université de York (Royaume Uni), sous la direction du Prof. Dale Sanders. Contrat avec l'Université de York ("Research Fellow"): 3 mois; bourse INRA/BBSRC: 3 mois; bourse UE "PTP short term training fellowship": 6 mois.

Déc. 1990-Déc. 1994: **DOCTORAT** dans le Laboratoire de Biochimie et Physiologie Végétales (URA 573 CNRS/ENSA-M/INRA) de Montpellier (Directeur: Prof. Claude Grignon), sous la direction du Dr Jean-Baptiste Thibaud. Contrat d'Allocataire de Recherche MESR: 3 ans; contrat CNRS/UE-Biotech (Ingénieur contractuel): 10 mois.

Sept. 1989-Sept. 1990: **DEA** (Université Montpellier II).

Lieux du stage: Laboratoire de Physiologie Végétale, à l'Université Libre de Bruxelles, sous la direction du Dr Fabrice Homblé, et Laboratoire de Biochimie et Physiologie Végétales (URA 573 CNRS/ENSA-M/INRA) sous la direction du Dr Jean-Baptiste Thibaud.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Eléments d'analyse:

- **18 articles dans des journaux à comité de lecture, et 1 article de vulgarisation dans la revue Biofutur**
- **Publications obtenues à chaque stade du cursus scientifique, DEA (1 article), thèse (5 articles), premier post-doc (2 articles), second post-doc (3 articles), IE à Montpellier (7 articles)**
- **17 des 18 articles publiés dans des journaux pour lesquels un facteur d'impact est disponible, et 1 article publié dans un journal "online" récent (Plant Methods) ne possédant pas encore de facteur d'impact**
- **Facteur d'impact moyen sur l'ensemble des 17 articles: 7,3**
- **La moitié des articles (i.e., 9/18) signés avec le statut de premier auteur (facteur d'impact moyen: 8,7).**
- **Le tiers des publications (6/18) signé avec le statut d'auteur en charge de correspondance (facteur d'impact moyen: 9,5)**
- **J'ai publié des articles avec le statut d'auteur en charge de correspondance dans le cadre de mon premier contrat post-doctoral à York (1 article), de mon second contrat post-doctoral à Cambridge (2 articles) et depuis mon retour à Montpellier (3 articles).**

Articles dans des journaux à comité de lecture

Homblé F, **Véry A-A**, 1992. Coupling of water and potassium ions in K⁺ channels of the tonoplast of *Chara*. *Biophys. J.* 63: 996-999.

Véry A-A, Bosseux C, Gaymard F, Sentenac H, Thibaud J-B, 1994. Level of expression in *Xenopus* oocytes affects some characteristics of a plant inward-rectifying K⁺ channel. *Pflügers Arch.* 428: 422-424.

Véry A-A, Gaymard F, Bosseux C, Sentenac H, Thibaud J-B, 1995. Expression of a cloned plant K⁺ channel in *Xenopus* oocytes: analysis of macroscopic currents. *Plant J.* 7: 321-332.

Logan H, Basset M, **Véry A-A**, Sentenac H, 1997. Plasma membrane transport systems in higher plants: From black boxes to molecular physiology. *Physiol. Plant.* 100: 1-15.

Robinson MF, **Véry A-A**, Sanders D, Mansfield TA, 1997. How can stomata contribute to salt tolerance? *Ann. Bot.* 80: 387-393.

Watts HJ, **Véry A-A**, Perera THS, Davies JM, Gow NAR, 1998. Thigmotropism and stretch-activated channels in the pathogenic yeast, *Candida albicans*. *Microbiology (SGM)* 144: 689-695.

Véry A-A (auteur en charge de correspondance), Davies JM, 1998. Laser microsurgery permits fungal plasma membrane single-ion-channel resolution at the hyphal tip. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1569-1572.

Goudet C, **Véry A-A (co-1^{er} auteur)**, Milat M-L, Ildefonse M, Thibaud J-B, Sentenac H, Blein J-P, 1998. Magnesium ions promote assembly of channel-like structures from beticolin 0, a non peptide fungal toxin purified from *Cercospora beticola*. *Plant J.* 14: 359-364.

Véry A-A (auteur en charge de correspondance), Robinson MF, Mansfield TA, Sanders D, 1998. Guard cell cation channels are involved in Na⁺-induced stomatal closure in a halophyte. *Plant J.* 14: 509-521.

Véry A-A (auteur en charge de correspondance), Davies JM 2000. Hyperpolarisation-activated calcium channels at the tip of *Arabidopsis* root hairs. *PNAS* 97: 9801-9806.

Plassard C, Guérin-Laguette A, **Véry A-A**, Casarin V, Thibaud J-B, 2002. Local measurements of nitrate and potassium fluxes along roots of maritime pine. Effects of ectomycorrhizal symbiosis. *Plant Cell Environ.* 25: 75-84.

Mouline K, **Véry A-A (co-1^{er} auteur)**, Gaymard F, Boucherez J, Pilot G, Devic M, Bouchez D, Thibaud J-B, Sentenac H, 2002. Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K⁺ channel in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 16: 339-350.

Véry A-A (auteur en charge de correspondance), Sentenac H, 2002. Cation channels in the *Arabidopsis* plasma membrane. *Trends Plant Sci.* 7: 168-175.

Hosy E, Vavasseur A, Mouline K, Dreyer I, Gaymard F, Porée F, Boucherez J, Lebaudy A, Bouchez D, **Véry A-A**, Simonneau T, Thibaud J-B, Sentenac H, 2003. The *Arabidopsis* outward K⁺ channel *GORK* is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *PNAS* 100: 5549-5554.

Berthomieu P, Conéjéro G, Nublat A, Brackenbury WJ, Lambert C, Savio C, Uozumi N, Oiki S, Yamada K, Cellier F, Gosti F, Simonneau T, Essah PA, Tester M, **Véry A-A**, Sentenac H, Casse F, 2003. Functional analysis of *AtHKT1* in *Arabidopsis* shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBO J.* 22: 2004-2014.

Véry A-A (auteur en charge de correspondance), Sentenac H, 2003. Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 575-603.

Su Y-H, North H, Grignon C, Thibaud J-B, Sentenac H, **Véry A-A (auteur en charge de correspondance)**, 2005. Regulation by external K⁺ in a maize inward Shaker channel targets transport activity in the high concentration range. *Plant Cell* 17: 1532-1548.

Hosy E, Duby G, **Véry A-A**, Costa A, Sentenac H, Thibaud J-B, 2005. A procedure for localisation and electrophysiological characterisation of ion channels heterologously expressed in a plant context. *Plant Methods* 1: 14.

Vulgarisation

Horeau C, Lacombe B, Thibaud J-B, **Véry A-A**, 2000. L'étude des canaux ioniques: le patch-clamp. *Biofutur* 201 "Le technoscope" pp 1-10.

Mémoires

DEA de Sciences Agronomiques, option Nutrition Minérale, Université Montpellier II, Oct. 1990. "Approches électrophysiologiques du transport de K^+ chez les végétaux: microélectrodes spécifiques et patch-clamp".

Thèse, spécialité Sciences Agronomiques, ENSA-Montpellier, Déc. 1994. "Transport membranaire du potassium chez les végétaux: approches électrophysiologiques".

Communications orales

Véry A-A, Bosseux C, Thibaud J-B, Sentenac H, 1993. Identification et expression de systèmes de transport de K^+ chez les végétaux supérieurs. 4^{ème} colloque "Canaux Ioniques", Carry-le-Rouet, France (30 Sept. - 02 Oct.).

Lepetit M, Basset M, Conejero G, Gaymard F, Sentenac H, Thibaud J-B, **Véry A-A**, 1993. Molecular characterization of the *Arabidopsis* K^+ channel AKT1. NATO Congress on Plant Molecular Biology, Mallorca, Espagne (10-19 Mai).

Goudet C, **Véry A-A**, Milat M-L, Thibaud J-B, Sentenac H, 1998. Beticolins, a family of non peptidal fungal toxins forming channel-like structures. 11th International Workshop on Plant Membrane Biology, Cambridge, Royaume Uni (9-14 Août).

Véry A-A, Miedema H, Bothwell JHF, Brownlee C, Davies JM, 2000. Hyperpolarisation-activated calcium channels at the tip of growing root hairs. SEB meeting. Exeter, Royaume Uni (27-31 Mars).

Véry A-A, Davies JM, 2000. Hyperpolarisation-activated calcium channels in *Arabidopsis* root hairs. XIème colloque "Canaux Ioniques", La Londe-les-Maures, France (10-13 Septembre).

Berthomieu P, Conéjéro G, Nublat A, Brackenbury W, Savio C, Cellier F, Gosti F, Simonneau T, **Véry A-A**, Casse F, 2003. Genetic and functional analyses of *AtHKT1* in *Arabidopsis* shows that Na^+ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. 7th International Congress of Plant Molecular Biology, Barcelona, Spain (23-28 Juin).

Véry A-A, Berthomieu P 2003. Structure/function analyses in a Na^+ transporter from *Arabidopsis*. XIVème colloque "Canaux Ioniques", Presqu'île de Giens, France (21-24 Septembre).

EVALUATION DE LA RECHERCHE

Evaluation d'articles ou de projets:

Je suis sollicitée en moyenne une fois par an pour évaluer un article ou un projet de recherche (6 évaluations effectuées dans les 6 dernières années).

2000: évaluation d'1 article pour PNAS

2001: évaluation d'1 projet pour la "National Science Foundation" (USA)

2003: évaluation d'1 article pour PNAS

2004: évaluation de 2 articles pour Plant Physiol

2005: évaluation d'1 article pour Plant J

Participation à des jurys:

1 participation à un jury de thèse en 2001, comme examinatrice, en temps qu'encadrante (thèse de Yan-Hua Su)

ENCADREMENT

Chercheurs:

1996 (1,5 mois): Helen Watts, post-doc dans le groupe de Neil Gow à l'Université d'Aberdeen, Royaume Uni.

"Formation au patch-clamp sur levures de Candida albicans"

Je co-signe avec H Watts et N Gow un article dans Microbiology (SGM) ("Watts *et al.*, 1998") sur ce travail.

2004-2006 (1,5 ans): Christiane Koziolk, post-doc dans l'équipe "Canaux Ioniques" à B&PMP (UMR 5004, Montpellier).

"Formation à la technique du patch-clamp: caractérisation d'un canal Shaker d'Arabidopsis par patch-clamp sur des protoplastes de tabac transformés transitoirement"

Etudiants en thèse:

2000-2001 (1 an): Yan-Hua Su, étudiant à B&PMP dans l'équipe "Canaux Ioniques" (directeur de thèse: Claude Grignon).

"Encadrement en électrophysiologie: caractérisation fonctionnelle dans l'ovocyte de xénope d'un canal Shaker de maïs"

Je fais partie du jury de soutenance de thèse de Yan-Hua Su en 2001 en tant qu'encadrante et co-signe avec Yan-Hua un article sur son travail de thèse, en dernier auteur avec charge de correspondance ("Su *et al.* 2005, Plant Cell).

Actuellement, Yan-Hua travaille (Research Assistant) en physiologie animale sur des canaux sodiques et calciques dans le Département de Biologie de l'Université de Pennsylvanie (groupe du Dr Ren, Philadelphia, USA). Yan-Hua a effectué 2 autres post-docs: un premier contrat dans le groupe de Wolf Frommer (Université de Tübingen, Allemagne) sur la caractérisation de transporteurs d'acides aminés chez *Arabidopsis*, puis un contrat dans le groupe de Philip Rea (Université de Pennsylvanie, Philadelphia, USA). Yan-Hua a déjà publié plusieurs articles sur ses travaux post-doctoraux.

2000-2001 (1 an): Karine Mouline, étudiante à B&PMP dans l'équipe "Canaux Ioniques" (directeur de thèse: Hervé Sentenac).

"Caractérisation phénotypique d'un mutant d'Arabidopsis, "knock-out" pour un canal potassique exprimé dans le grain de pollen". Tests de germination du pollen in vitro. Evaluation du pouvoir germinatif du pollen.

Je co-signe (avec le statut de co-premier auteur) avec Karine Mouline un article sur ce travail dans Genes Dev ("Mouline *et al.*, 2002").

Après sa thèse, Karine a effectué un post-doc à Bamako (Mali; contrat IRD) dans le domaine de la génétique des populations.

2005- (en cours): Mehdi Jebnoun, étudiant effectuant une thèse en co-tutelle, dans l'équipe "Canaux Ioniques" à B&PMP et au Laboratoire d'Adaptation des Plantes aux Stress Abiotiques, à l'INRST, à Hammam Lif, en Tunisie (directeurs de thèse: Hervé Sentenac & Chedly Abdelly).

"Caractérisation de transporteurs HKT de riz". Le programme implique des analyses électrophysiologiques, moléculaires (e.g., analyse des profils d'expression), génétiques (recherche, caractérisation moléculaire et analyse phénotypique de mutants KO), et physiologiques (transport de K^+ et Na^+ , résistance au sel).

Etudiants en DEA:

1991 (3 mois): Alexis Guérin-Laguette, en stage au Laboratoire Rhizosphère et Symbiose (UMR 1222, Agrom/INRA) à Montpellier, sous la direction de Claude Plassard.

"Mise au point de l'étude des échanges de H^+ et K^+ dans une association mycorhizienne à l'aide de microélectrodes ion-sélectives"

Je cosigne avec Alexis Guérin-Laguette et Claude Plassard un article dans Plant Cell Environ au titre de l'encadrement du stage de DEA d'Alexis: "Plassard *et al.*, 2002".

Après son DEA, Alexis Guérin-Laguette a effectué une thèse au Laboratoire de Rhizosphère et Symbiose sous la direction de Claude Plassard.

2001 (6 mois): Eric Hosy, en stage à B&PMP dans l'équipe "Canaux Ioniques" sous la direction de Jean-Baptiste Thibaud.

"Etude d'un mutant d'Arabidopsis affecté dans le fonctionnement stomatique et patch clamp sur cellules de garde"

Je co-signe avec Eric Hosy, au titre de l'encadrement de son stage de DEA, un article dans PNAS: "Hosy et al., 2002".

Après son DEA, Eric Hosy a effectué une thèse dans l'équipe "Canaux Ioniques" sous la direction de Jean-Baptiste Thibaud. Il est actuellement en post-doc dans un laboratoire d'électrophysiologie animale du CEA (Grenoble).

2005 (totalité du stage de DEA; thèse en cours) Linda Jeanguenin, en stage à B&PMP dans l'équipe "Canaux Ioniques", sous la direction de Hervé Sentenac.

"Caractérisation phénotypique d'un mutant "knock-out" pour un Shaker d'Arabidopsis: analyse du transport xylémique de K⁺, en relation avec les fluctuations de l'humidité atmosphérique."

2005 Jeannette Kley (titulaire de l'équivalent d'un DEA en Allemagne), en stage à B&PMP dans l'équipe "Canaux Ioniques", dans le cadre d'un contrat européen Leonardo da Vinci. Je suis directement responsable de l'encadrement de Jeannette Kley.

"Clonage et caractérisation fonctionnelle de canaux Shaker de riz"

Etudiants en licence:

1992 (1,5 mois): Magalie Guiraud, étudiante à l'Université Montpellier II, en stage au Laboratoire de Biochimie et Physiologie Végétales (URA 573) de Montpellier; responsables du stage: Bruno Touraine et Jean-Baptiste Thibaud.

"Mise au point de microélectrodes sélectives de NO₃⁻, pour l'étude du transport de NO₃⁻ chez la racine de maïs"

1998 (2 mois): Edward Eason, étudiant en 3^{ème} année à l'Université de Cambridge, Royaume Uni, en stage dans le Département des Sciences Végétales sous la responsabilité de Julia Davies.

"Localisation in vivo de canaux calciques dans les poils absorbants de la racine d'Arabidopsis, à l'aide d'une dihydropyridine fluorescente - Caractérisation in vivo de ces canaux"

2005 (2 mois): Anne Janvier, étudiante à l'ENS Lyon, en stage à B&PMP dans l'équipe "Canaux Ioniques" sous la responsabilité de Hervé Sentenac.

"Caractérisation dans l'ovocyte de xénope de transporteurs HKT d'orge mutants"

Autres étudiants:

2001, 2002, 2004 (1 mois): Elodie Arconada, Frédérick Chaudé, Guillaume Greil, étudiants en 2^{ème} année à l'Agro Montpellier effectuant un module "stage en laboratoire" de découverte de la recherche.

Travaux effectués

Résumé du parcours scientifique

A ce jour, l'essentiel de mon activité de recherche a concerné l'analyse électrophysiologique des canaux ioniques et transporteurs membranaires chez les plantes, et les fonctions que ces systèmes de transport remplissent dans la physiologie de l'organisme entier.

Je suis ingénieur agronome. J'ai choisi de travailler dans la recherche académique. En 1990, étudiante en DEA à Montpellier, je décide d'effectuer mon stage dans le laboratoire de Fabrice Homblé à Bruxelles pour apprendre la technique du patch-clamp, encore relativement "confidentielle" dans le monde végétal. J'effectue ma thèse à Montpellier, sous la direction de Jean-Baptiste Thibaud. Les premiers canaux potassiques identifiés chez les végétaux sont clonés pendant ma thèse. Je développe la technique du voltage-clamp à deux électrodes dans l'ovocyte de xénope pour caractériser ces canaux et j'effectue une étude des caractéristiques fonctionnelles de l'un d'eux, sur la base d'une modélisation biophysique. A l'issue de ma thèse, je décide de continuer à travailler dans le domaine de l'électrophysiologie, mais de quitter la biophysique pour aborder des questions de physiologie. Je pars en Angleterre où je vais effectuer deux post-docs dans des Laboratoires spécialistes du patch-clamp *in planta*, à York puis à Cambridge. En 1999, après plus de 4 années en Angleterre, je saisis l'opportunité présentée par l'ouverture d'un poste d'IE CNRS à Montpellier dans l'équipe de Jean-Baptiste Thibaud et Hervé Sentenac (B&PMP, UMR 5004) pour poursuivre mes activités de recherche en France.

De façon plus précise, les activités de recherche aux différents stades de mon cursus ont été les suivantes. En DEA, à Bruxelles, je mets en évidence une relation stœchiométrique entre le transport de l'ion K^+ et le transport de molécules d'eau dans un canal végétal de grande conductance, fournissant de l'information sur la géométrie du pore du canal. Au cours de ma thèse, en utilisant l'ovocyte de xénope, je développe les premières analyses quantitatives et modélisations sur les canaux potassiques Shaker qui viennent d'être clonés chez *Arabidopsis*. Je travaille sur le canal KAT1 de la cellule de garde, qui deviendra par la suite un modèle pour analyser la relation structure-fonction des canaux de cette famille. En Angleterre, au cours de mon premier contrat post-doctoral à York, j'étudie la réponse à Na^+ des stomates de deux espèces d'Aster, une halophyte et une glycophyte, et démontre que l'entrée de Na^+ dans la cellule de garde conduit, chez la halophyte uniquement et *via* un processus impliquant une signalisation calcique, à l'inhibition d'un canal K^+ entrant, ce qui exerce un retro-contrôle protecteur sur l'arrivée de Na^+ dans les feuilles en limitant l'ouverture stomatique et, finalement, participe à l'adaptation de la plante à la forte concentration de Na^+ dans le milieu. Au cours du second contrat post-doctoral, à Cambridge, j'étudie le rôle des canaux calciques dans le processus de croissance cellulaire polarisée en utilisant comme modèles l'hyphe mycélienne et le poil absorbant racinaire. Je mets en

évidence, chez le poil absorbant, une conductance calcique dépendante du voltage active préférentiellement à l'extrémité apicale en croissance et impliquée probablement dans l'installation du gradient calcique cytosolique apical qui détermine la polarisation de la croissance. A Montpellier, au sein de l'équipe *Canaux Ioniques* de l'UMR 5004, je travaille essentiellement à l'analyse de l'activité et de la fonction *in planta* de canaux potassiques de type Shaker. Je participe à des opérations de développement méthodologiques, j'assure l'encadrement d'étudiants sur des approches électrophysiologiques, je conduis des projets dans le cadre de collaborations au sein de l'UMR ou à l'extérieur de l'UMR, mais je suis également directement responsable, de façon autonome, de la conduite de certains projets de l'équipe. De ce fait, je signe des publications en tant que premier auteur ou auteur en charge de correspondance.

Mes travaux sont décrits dans 18 publications parues dans des journaux à comité de lecture (facteur d'impact moyen: 7,3; Cf. l'analyse bibliométrique au début de ma liste de publication). J'ai également contribué à un article de vulgarisation dans la revue Biofutur. Je signe la moitié de mes publications (i.e., 9/18) avec le statut de premier auteur (facteur d'impact moyen: 8,7). Je signe un tiers de mes publications (6/18) avec le statut d'auteur en charge de correspondance (facteur d'impact moyen: 9,5).

Dans le rapport d'activité qui suit ce résumé, je choisis de détailler 6 de mes publications, permettant de couvrir l'ensemble de mon cursus depuis le DEA. Chaque publication est présentée par une planche indépendante, regroupant de façon simplifiée une iconographie et des éléments de discussion éclairant le contexte du travail et les principaux résultats. Chacune de ces 6 planches (appelable par un lien hypertexte) est précédée d'un texte plus détaillé, formant les 6 premières parties ci-dessous (numérotées de 1 à 6). Une septième partie évoque de façon synthétique différents travaux ayant donné lieu à publication, mais non présentés dans les 6 premières.

1. Etude du couplage entre le transport de K^+ et le transport d' H_2O dans un canal de Chara

(DEA, Université Libre de Bruxelles, direction Fabrice Homblé, 1990)

[planche 1](#) [suite du texte](#)

La technique du patch-clamp, développée au début des années 80 dans le monde animal (Hamill *et al.*, 1981), est encore relativement confidentielle dans le monde végétal en 1990, lorsque je démarre mon DEA. Très peu de Laboratoires travaillant sur les végétaux sont équipés et ont l'expertise pour cette technique. Fabrice Homblé a appris cette technique lors d'un post-doc au Canada chez Jack Dainty (Homblé *et al.*, 1987) et a monté un poste de patch à l'Université Libre de Bruxelles. Je pars apprendre cette technique dans son Laboratoire pendant mon stage de DEA.

Chara est une espèce végétale modèle à cette époque, pour les études sur les transports d'ions. Une partie importante des premières analyses de patch clamp chez les végétaux est effectuée chez cette algue. F Homblé me propose une étude originale sur un canal K^+ de *Chara corallina* récemment identifié: analyser le couplage entre le transport de K^+ et le transport de molécules d'eau dans ce canal. Ce canal de grande conductance (130 pS en présence de KCl 150 mM) est en activité sur la membrane vacuolaire des cellules internodales. L'étude est effectuée à l'échelle du canal unique sur des patches excisés de membrane (planche 1A).

Je commence par examiner chez ce canal quelques propriétés classiquement étudiées: affinité pour K^+ et sensibilité de l'activité au voltage. Le couplage entre le transport de K^+ et le transport d'eau dans le canal est analysé pour deux concentrations de K^+ , une concentration "saturante" (300 mM), à laquelle la conductance du canal est proche de sa valeur maximale, et une concentration plus faible (150 mM). Le principe de l'analyse de ce couplage est le suivant: l'expérience débute dans des conditions ioniques et osmotiques symétriques de part et d'autre de la membrane. Le potentiel où le courant est nul dans le canal est donc de zéro mV. J'impose alors un gradient de potentiel osmotique en ajoutant un soluté non électriquement chargé (du sorbitol) sur l'une des faces de la membrane, et je regarde si le potentiel à courant nul dans le canal change. J'observe que ce potentiel n'est plus de zéro mV, ce qui indique qu'un flux d'eau dû au gradient de potentiel osmotique traverse le canal et entraîne des ions K^+ . Chez le canal vacuolaire de Chara, l'ajout de sorbitol 650 mM dans le bain en présence de KCl 150 ou 300 mM déplace le potentiel à courant nul vers des potentiels plus positifs. Ce déplacement est d'une dizaine de mV quand la concentration de KCl est 300 mM (planche 1B).

Plusieurs auteurs ont proposé des modélisations pour calculer à partir du déplacement de potentiel à courant nul, le nombre de molécules d'eau couplées au transport d'un ion dans le canal (Levitt *et al.*, 1978; Rosenberg et Finkelstein, 1978). Un couplage entre transport d'ion et transport d'eau est prévisible dans des pores possédant une région étroite où les ions (déshydratés) et les molécules d'eau sont contraints de se déplacer en file indienne. D'autres modélisations montrent que ce couplage est possible aussi dans des pores plus larges de faible longueur (Levitt, 1990). Le déplacement de potentiel à courant nul induit par le gradient de potentiel osmotique dans le canal de Chara est assez important. Les calculs prévoient qu'une trentaine de molécules d'eau

accompagnent (draînent) un ion K^+ . L'hypothèse d'un couplage K^+ /eau dans le canal dû à un cheminement des ions et des molécules d'eau en file indienne, dans un rapport 1:30, conduirait à une région étroite sur toute la longueur du canal (i.e., toute la largeur de la membrane), ce qui est peu probable vu la forte conductance du canal. Dans le cadre de l'hypothèse inverse, à savoir que la trentaine de molécules d'eau est répartie autour de l'ion K^+ , le modèle de Levitt (1990) prévoit que la région la plus étroite du pore (supposé cylindrique) présente un diamètre de 3 nm (planche 1C).

1 article en second (dernier) auteur dans Biophys J en 1992

Ce type de travail est illustratif de la façon dont l'analyse de la relation structure-fonction d'un canal est abordée au début des années 90. Le canal de Chara que j'ai ainsi contribué à caractériser sur le plan fonctionnel n'est pas identifié au niveau moléculaire. Les connaissances actuelles dans le domaine de la relation structure-fonction des canaux potassiques, incluant à la fois des analyses fonctionnelles, mutationnelles et cristallographiques, concernent essentiellement des canaux à pore étroit et filtre de sélectivité présentant le motif poinçon GYG. La perméation de K^+ dans ce type de pore se fait "en file indienne" et implique une déshydratation totale de l'ion lors de la traversée du filtre de sélectivité (Zhou et al., 2001).

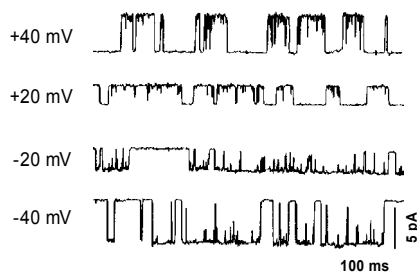
[planche 1](#) [suite du texte](#)

planche 1[retour au texte](#) [suite du texte](#)**DEA, Université Libre de Bruxelles****Homblé F & Véry A-A 1992, Biophys J 63: 996-999*****Coupling of water and potassium ions in K^+ channels of the tonoplast of Chara***

En 1990, étudiante en DEA à Montpellier, je choisis d'effectuer mon stage dans le laboratoire de Fabrice Homblé (ex post-doc chez Jack Dainty) à Bruxelles pour apprendre la technique du patch-clamp. A cette date, cette technique est encore relativement "confidentielle" dans le monde végétal.

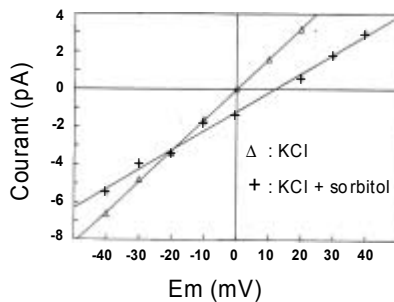
Le travail conduit au cours de mon DEA met en évidence l'existence d'un couplage stœchiométrique entre le transport de molécules d'eau et d'ions K^+ dans un canal vacuolaire de Chara, et permet d'obtenir ainsi de l'information sur la structure de ce canal.

A Enregistrement par patch clamp de l'activité d'un canal potassique vacuolaire de Chara de grande conductance et non régulé par le voltage



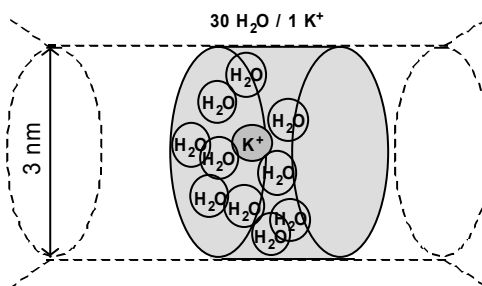
(A) Enregistrements de courant par la technique du patch-clamp en configuration "inside out", sur membrane vacuolaire ("gouttelettes protoplasmiques"). Les solutions de pipette et le bain contiennent KCl 300 mM. L'analyse de la distribution des durées d'ouverture et de fermeture du canal à différents potentiels de membrane indique que l'activité du canal n'est pas régulée par le voltage (non montré). Le calcul de la conductance unitaire du canal ($G=I/E$, à partir de ce type d'enregistrement) fournit une valeur de 180 pS dans ces conditions expérimentales.

B L'effet d'un gradient de potentiel osmotique sur le transport de K^+ montre l'existence d'un couplage entre transport d'ions K^+ et transport de molécules d'eau dans le canal



(B) Le courant à travers le canal est enregistré en présence de KCl 300 mM de part et d'autre de la membrane (triangles). Un gradient de potentiel osmotique est ensuite créé par l'ajout de 650 mmole.L⁻¹ de sorbitol sur une face de la membrane (dans le bain). L'enregistrement des courants (croix) révèle que ce gradient osmotique provoque un déplacement du potentiel à courant nul dans le canal. Ce résultat démontre l'existence d'un couplage entre un flux de molécules d'eau et un flux d'ions K^+ dans le canal: le flux d'eau à travers le canal (dû au gradient de potentiel osmotique) "draine" des ions K^+ .

C Analyse quantitative: déductions concernant la géométrie du pore du canal



(C) L'analyse de la valeur du déplacement du potentiel à courant nul en fonction de l'ampleur du gradient de potentiel osmotique fournit de l'information sur la "stœchiométrie" du couplage entre les flux d'eau et de K^+ , ce qui renseigne sur la géométrie du pore dans sa région la plus étroite. Le schémas en regard illustre cette information: 30 molécules d'eau "accompagnent" 1 ion K^+ , et la région la plus étroite du pore présente un diamètre de 3 nm (Cf. texte principal). Le nombre d'ions K^+ présents simultanément dans la région étroite du pore (et donc la longueur de la région étroite) ne sont pas déterminables dans ce type d'expériences.

[retour au texte](#) [suite du texte](#)

2. Caractérisation dans l'ovocyte de xénope d'un des premiers canaux clonés chez les végétaux

(Thèse, Montpellier, direction Jean-Baptiste Thibaud, 1993-1994)

[planche 2](#) [suite du texte](#)

Le clonage chez *Arabidopsis* des premiers canaux végétaux, *KAT1* et *AKT1*, est publié en 1992 (Anderson *et al.*, PNAS 89, 3736-3740; Sentenac *et al.*, Science 256, 663-665). Exprimés dans la levure, *KAT1* et *AKT1* permettent un influx de K^+ . L'analyse de leur séquence indique qu'ils appartiennent à la famille des canaux K^+ Shaker, initialement identifiés chez la drosophile (Papazian *et al.*, 1987; Schwartz *et al.*, 1988) (planche 2A). Une caractérisation fonctionnelle de *KAT1* dans l'ovocyte de xénope est publiée l'année de son clonage (Schachtman *et al.*, 1992). Elle montre que *KAT1* est un canal de type entrant, sélectif de K^+ . Une caractérisation plus détaillée de *KAT1* est cependant nécessaire pour soutenir une étude de la relation structure-fonction du canal. Notamment, la rectification entrante de *KAT1* n'a pas été analysée. Le sens de cette rectification pose question: tous les Shaker animaux alors identifiés présentent une rectification sortante (Jan et Jan, 1992a). Chez ces Shaker animaux, le mécanisme et les bases moléculaires de cette rectification sont connus: la rectification résulte d'une sensibilité au voltage de la probabilité de l'état ouvert du canal. Les acides aminés basiques du quatrième segment transmembranaire de chaque sous-unité du canal sont le siège moléculaire de cette sensibilité au voltage (Papazian *et al.*, 1991; McCormac *et al.*, 1991). Un déplacement de ces charges dans la membrane lors d'un changement de polarisation entraîne un changement de conformation du canal qui modifie la probabilité de l'état ouvert du canal. *KAT1* possède comme les Shaker animaux des acides aminés basiques dans son quatrième segment transmembranaire. Aussi bien pour les électrophysiologistes animalistes que végétalistes (Jan et Jan, 1992b; Hoshi, 1995), une question essentielle se pose: la rectification entrante chez *KAT1* s'explique-t-elle comme la rectification sortante des Shaker animaux par une sensibilité au voltage de la probabilité de l'état ouvert?

Les 2 ADNc *KAT1* et *AKT1* (clonés par H Sentenac) sont au Laboratoire en 1992. F Gaymard et C Bosseux introduisent ces ADNc dans un vecteur de transcription optimisé pour l'expression dans l'ovocyte de xénope. Avec J-B Thibaud, je mets en place au Laboratoire le voltage clamp sur ovocyte de xénope, pour caractériser ces canaux.

Malheureusement, *AKT1* ne semble pas s'exprimer de façon fonctionnelle sur la membrane de l'ovocyte de xénope (l'équipe caractérisera ce canal par la suite en l'exprimant dans le système cellule d'insecte-baculovirus). Seul *KAT1* peut donc être étudié dans l'ovocyte. Je m'intéresse aux propriétés de conduction (sélectivité ionique, pharmacologie, affinité pour K^+) et au mécanisme de rectification du canal (régulation de l'activité par le voltage? Rectification intrinsèque?). *Mon objectif est de produire une analyse "quantitative" de ces propriétés.*

La sélectivité ionique du canal est estimée par deux méthodes: la conductance relative du canal en présence de différents cations dans le milieu, et la perméabilité relative des cations dans

le canal (analyse des potentiels à courant nul dans le canal en présence de différents cations; formalisme de Goldman-Hodgkin-Katz). La séquence de sélectivité obtenue pour KAT1 avec les deux méthodes est la même, mais des différences existent dans certains cas au niveau des valeurs obtenues. Par exemple, la conductance relative en présence de Rb^+ , G_{Rb}/G_K , est très proche de la perméabilité relative P_{Rb}/P_K . Par contre G_{Na}/G_K est un ordre de grandeur supérieure à P_{Na}/P_K . Ces résultats suggèrent que la sélectivité Rb^+/K^+ résulte principalement d'une vitesse de cheminement de Rb^+ dans le canal plus faible que celle de K^+ . Na^+ en revanche subirait une discrimination importante à l'entrée de la partie étroite du canal. Cs^+ dans le milieu provoque un blocage dépendant du voltage des courants KAT1 entrants, ce qui indique que Cs^+ pénètre dans le canal jusqu'à un site où il bloque le pore. L'ajout de tétraéthylammonium (TEA) dans le milieu bloque les courants KAT1 de façon non dépendante du voltage. Le TEA ne pénètre donc pas dans le pore du canal. Il se fixe au niveau de la bouche externe du canal. La sensibilité de KAT1 aux inhibiteurs est dépendante du niveau d'expression du canal. Il est possible qu'à fort niveau d'expression, des interactions aient lieu entre les canaux voisins, et que ces interactions modifient certaines propriétés "individuelles" du canal.

J'analyse également la sensibilité au voltage de l'activité de KAT1. J'utilise pour cela deux méthodes. La première méthode, classique (utilisation du formalisme de Boltzmann pour l'analyse des courants de désactivation), permet de montrer que l'essentiel de la rectification de KAT1 est due à une sensibilité au voltage de la probabilité de l'état ouvert. Elle permet d'obtenir les paramètres caractéristiques de l'activation du canal: la charge équivalente de commande de l'ouverture du canal et le potentiel de demi-activation. L'autre méthode est basée sur l'analyse des courants stationnaires (planche 2B). En plus des paramètres d'activation du canal par le voltage (planche 2C), cette méthode permet d'obtenir des informations sur la conductance du canal: une conductance macroscopique correspondant à la conductance unitaire de corde multipliée par le nombre de canaux activables sur la membrane est déterminée. Les données de conductance obtenues pour différentes concentrations externes de K^+ permettent en particulier d'estimer l'affinité apparente du canal pour K^+ (planche 2D). Dans ce type d'analyses, les courants stationnaires sont généralement modélisés par une loi d'Ohm. Nous montrons qu'une modélisation des courants stationnaires par une équation de Goldman-Hodgkin-Katz (planche 2C) est préférable lorsque la concentration externe de K^+ est faible: elle conduit à une meilleure estimation des paramètres d'activation du canal.

Finalement, l'activation de KAT1 peut être correctement décrite par un modèle simple d'activation par le voltage. Il est donc probable que comme chez les Shaker animaux, le quatrième segment transmembranaire chez KAT1 joue le rôle de senseur de voltage. Des mouvements similaires du senseur de voltage auraient des effets opposés sur l'activation du canal chez KAT1 et chez les Shaker animaux. Les bases moléculaires du sens de rectification chez les canaux Shaker restent à ce jour inconnues.

1 article en 1^{er} auteur dans Eur J Physiol (ex Pflügers Arch) en 1994

1 article en 1^{er} auteur dans Plant J en 1995

Le canal KAT1, qui est exprimé dans la cellule de garde d'Arabidopsis (Véry et Sentenac, 2002), deviendra le canal modèle pour les analyses des relations structure-fonction chez les canaux K⁺ végétaux de type Shaker. La caractérisation que j'ai effectuée servira de base à ces analyses. L'article publié en 1995 dans Plant J compte plus de 90 citations.

[planche 2](#) [suite du texte](#)

planche 2

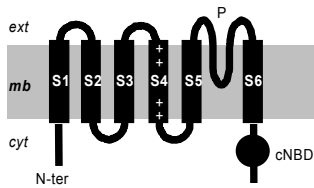
Thèse, Montpellier

Véry A-A et al. 1995 Plant Journal 7: 321-332

Expression of a cloned plant K⁺ channel in Xenopus oocytes: analysis of macroscopic currents[retour au texte](#)[suite du texte](#)

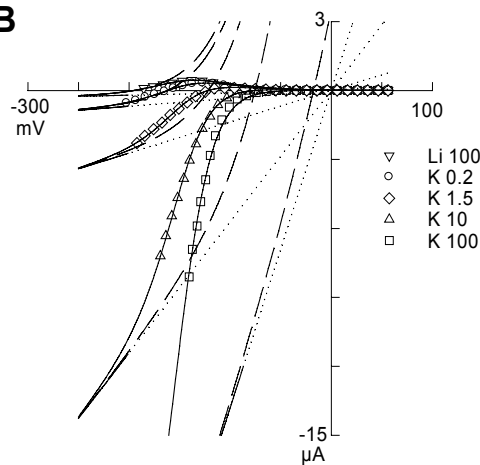
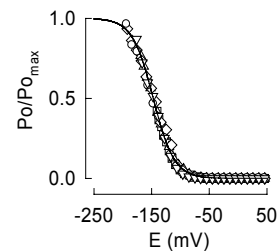
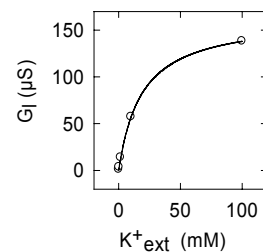
Ce travail correspond à la première analyse de la sensibilité du canal Shaker KAT1 d'*Arabidopsis* au voltage (différence de potentiel électrique transmembranaire). Une modélisation nouvelle est proposée pour obtenir les paramètres décrivant la sensibilité du canal au voltage à partir des courbes courant stationnaire - voltage. L'article publié dans *Plant J* a été cité plus de 90 fois dans des revues à comité de lecture.

Modèle structural du polypeptide Shaker KAT1 d'*Arabidopsis*, un des premiers canaux potassiques clonés chez les végétaux

A

(A) Les premiers canaux Shaker ont été clonés chez la drosophile. Les polypeptides Shaker présentent une région hydrophobe constituée de 6 segments transmembranaires (S1 à S6). S4 possède des résidus chargés positivement et fonctionne comme un senseur de voltage. La région entre S5 et S6, appelée P, forme le pore du canal. Le canal fonctionnel a une structure tétramérique. Les 4 régions P sont assemblées au centre de la structure pour former un pore hydrophile et le filtre de sélectivité. Le polypeptide KAT1 (677 aa, 78 kDa) possède cette structure. L'analyse de sa séquence révèle également un site de liaison des nucléotides cycliques (cNBD) dans sa région C-terminale.

Caractérisation fonctionnelle de KAT1 après expression dans l'ovocyte de xénope: analyse quantitative et proposition d'une modélisation nouvelle des courants stationnaires pour l'étude de l'activation du canal

B**C****D**

(B-D) Caractérisation fonctionnelle du canal KAT1. Des ARNc KAT1 obtenus par transcription *in vitro* sont injectés dans les ovocytes. Des expériences de voltage-clamp à deux électrodes sont effectuées trois à cinq jours plus tard sur les ovocytes. B: Modélisation des courants KAT1 à l'état stationnaire (courbes courant-voltage). Les courants sont enregistrés en présence de différentes concentrations de K⁺ (Cf. symboles) sur la face externe du canal. Les courants KAT1 stationnaires (I; symboles) sont ajustés (courbes en trait plein) à l'aide d'une équation de Goldman-Hodgkin-Katz (courbes en tirets), modélisant le courant à travers l'ensemble des canaux KAT1 activables sur la membrane, et d'une équation de Boltzmann, modélisant la fraction de canaux KAT1 à l'état ouvert (Po/Po_{max}) en fonction du potentiel de membrane:

$$I = (G_l \cdot E \cdot (1 - \exp(F \cdot (E - E_{rev}) / R \cdot T)) / (1 - \exp(F \cdot E / R \cdot T))) \cdot (1 / (1 + \exp(z_g \cdot F \cdot (E - E_{a50}) / R \cdot T)))$$

G_l, la «conductance entrante limite» (pente des droites en pointillés, dérivée de l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz quand le potentiel de membrane (E) tend vers l'infini), z_g, la charge électrique impliquée dans l'activation du canal, et E_{a50}, le potentiel de demi-activation du canal, sont les paramètres ajustables. E_{rev} est le potentiel pour lequel le courant est nul dans le canal, F, R, T ont leur signification habituelle.

Cette modélisation permet d'extraire, à partir des courants stationnaires, la dépendance vis à vis du voltage de l'activation du canal (Po/Po_{max} = f(E); panneau C; Po est la probabilité de l'état ouvert et Po_{max} la valeur maximale de cette probabilité), ainsi que la dépendance vis à vis de la concentration externe de K⁺ de la conductance entrante de KAT1 (D; K_M ≈ 20 mM).

[retour au texte](#)[suite du texte](#)

3. Analyse de la réponse à NaCl des stomates de deux espèces d'Aster, une halophyte et une glycophyte: recherche des canaux impliqués dans cette réponse.

(Université de York, UK, Laboratoire de Dale Sanders, 1995-1996; en collaboration avec le groupe de Terry Mansfield, Université de Lancaster, UK)

[planche 3](#) [suite du texte](#)

En 1995, le groupe de Terry Mansfield, qui s'intéresse au fonctionnement des stomates chez les plantes, travaille depuis quelques années sur une halophyte, *Aster tripolium*, qui pousse dans les marais salés autour de Lancaster. Il observe que la réponse des stomates à NaCl chez cette halophyte est différente de celle connue chez les glycophytes classiquement étudiées comme *Commelina communis* (Perrera *et al.*, 1994). Chez *C. communis*, K^+ ou Na^+ peuvent être accumulés par les cellules de garde et conduire à l'ouverture stomatique. Toutefois, l'absorption de Na^+ par les cellules de garde a un effet néfaste sur le fonctionnement des stomates: les stomates ouverts en présence de Na^+ ne se ferment pas en réponse à l'obscurité ou l'apport d'acide abscissique (Jarvis et Mansfield, 1980). Chez la halophyte *Aster tripolium*, K^+ peut être accumulé par les cellules de garde et conduire à l'ouverture stomatique, comme chez les glycophytes. Par contre, les stomates de cette espèce halophyte ne s'ouvrent pas quand Na^+ remplace K^+ dans l'apoplasme des cellules de garde. De plus, l'ajout de Na^+ en présence de K^+ entraîne la fermeture partielle des stomates (Perera *et al.*, 1994; planche 3A). L'hypothèse de travail du groupe de Terry Mansfield est que ce comportement particulier des stomates vis à vis de Na^+ fait partie des mécanismes qui permettent la tolérance au sel chez *Aster tripolium* (Perera *et al.*, 1994): en effet, la fermeture partielle des stomates réduit la transpiration, et donc l'arrivée de sel dans l'apoplasme foliaire par le flux xylémique. Les équipes de Terry Mansfield (à Lancaster) et Dale Sanders (à York), engagent une collaboration sur ce projet de recherche, et me confient la responsabilité de la conduite des approches électrophysiologiques.

Je cherche à identifier le mécanisme ionique responsable de la fermeture des stomates par Na^+ chez *Aster tripolium*. Je choisis d'examiner si les canaux K^+ de la cellule de garde chez *Aster tripolium* ont une sensibilité particulière à Na^+ . Dans le cadre de cette hypothèse, deux mécanismes sont susceptibles d'expliquer la fermeture des stomates: soit Na^+ active des flux K^+ sortants, soit il inhibe des flux K^+ entrants.

L'étude est effectuée à l'aide de la technique du patch clamp sur des protoplastes de cellules de garde, à l'échelle de la cellule entière ou du canal unique (patch excisé en configuration "outside out"). Je choisis de comparer deux espèces d'Aster: *Aster tripolium* et la glycophyte *Aster amellus* dont la réponse des stomates au sel est la même que celle de *Commelina communis* (planche 3A). Les canaux des Asters n'ont jamais été caractérisés. Je commence par dresser un bilan des conductances K^+ présentes dans les cellules de garde des deux espèces d'Aster: quels sont les différents types de canaux permettant l'influx/l'efflux de K^+ ? Quel est le niveau d'activité relatif des types entrants et sortants chez chacune des deux espèces? Je m'intéresse également à

leur sélectivité vis à vis de Na^+ : peuvent-ils constituer une voie d'entrée de Na^+ dans la cellule de garde (les canaux responsables de l'entrée de Na^+ dans les cellules de garde n'ont été identifiés chez aucune espèce au moment de cette étude)? Enfin, quelle est leur sensibilité à Na^+ ?

Comme chez *Vicia faba* où les conductances responsables des flux entrants ou sortants de K^+ dans les cellules de garde sont déjà bien caractérisées à l'échelle cellulaire (Schroeder, 1988; Blatt, 1992; Assmann, 1993), la conductance majeure responsable des flux entrants de K^+ chez les 2 espèces d'*Aster* est une conductance rectifiante activée par l'hyperpolarisation membranaire, et la conductance majeure responsable des flux sortants de K^+ est une conductance également rectifiante, activée par la dépolarisation membranaire. L'activité relative de la conductance entrante et de la conductance sortante, en absence de Na^+ est la même chez les deux espèces d'*Aster*. Ces deux conductances, entrante et sortante, sont très sélectives de K^+ vis à vis de Na^+ chez les 2 espèces, et ne peuvent donc pas constituer une voie d'entrée de Na^+ dans la cellule de garde. De plus, leur sensibilité directe à Na^+ est la même chez les deux espèces: pas de blocage de la conductance entrante par Na^+ externe et interne, blocage voltage dépendant (significatif seulement à des potentiels très dépolarisés) de la conductance sortante par Na^+ interne. Une étude à l'échelle du canal unique indique que les canaux responsables de chacune de ces deux conductances sont très semblables chez les deux espèces (même conductance, même sélectivité). En plus des deux conductances majeures d'influx et d'efflux de K^+ , une conductance K^+ de plus faible intensité, peu voltage dépendante, est identifiée dans les cellules de garde des deux espèces. Cette conductance est peu sélective de K^+ vis à vis de Na^+ . A l'échelle microscopique, des canaux cationiques perméables à K^+ et à Na^+ dont l'activité ne dépend pas du potentiel de membrane sont observés chez les deux espèces (planche 3B). Leurs caractéristiques et leur densité sont similaires chez les deux espèces. *Finalement, l'ensemble de cette étude montre que les deux espèces d'Aster possèdent des répertoires de canaux K^+ /cationiques très semblables. Ni la nature des canaux K^+ /cationiques, ni le niveau d'expression relative de ces canaux chez les deux espèces d'Aster ne peuvent donc expliquer la différence de sensibilité de leurs stomates à Na^+ .*

Dans ce contexte, j'avance l'hypothèse que Na^+ régule différemment chez les deux espèces au moins un de ces canaux K^+ /cationiques, de façon indirecte via une voie de signalisation. Cela me conduit à poser les questions suivantes: quel est l'effet sur le courant K^+ d'une incubation de plusieurs heures des protoplastes dans un milieu contenant Na^+ ? Quel est l'effet sur le courant d'une présence prolongée (20-30 min) de Na^+ dans le cytoplasme de la cellule de garde? Les deux types d'expériences donnent le même résultat: chez l'espèce glycophyte, *Aster amellus*, Na^+ n'a aucun effet à long terme sur les courants K^+ (planche 3C). Par contre, chez la halophyte *Aster tripolium*, une forte inhibition du courant K^+ entrant est observée (planche 3C). Elle résulte en partie d'un décalage du seuil d'activation du courant vers des potentiels plus négatifs. Finalement, je mets en évidence que cette régulation chez la halophyte implique un signal calcique en montrant que le fait de tamponner la concentration libre de Ca^{2+} dans le cytoplasme des protoplastes (à 50 nM) supprime l'inhibition du courant entrant par Na^+ (planche 3C).

En conclusion, ces résultats suggèrent que la présence de Na^+ dans le cytoplasme des cellules de garde induit de façon spécifique chez la halophyte (*Aster tripolium*) une voie de signalisation impliquant probablement une augmentation de la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} , qui conduirait à une inhibition de la conductance potassique entrante (Schroeder et Hagiwara, 1989). D'autres conductances pourraient être affectées par ce signal (activation par exemple des conductances anioniques sortantes; Hedrich, 1994), et contribuer en déplaçant encore davantage la balance des flux entrants et sortants en faveur des sorties d'ions, à la réduction de l'ouverture stomatique.

1 article de revue sur invitation en 2^{ème} auteur dans Ann Bot en 1997

1 article en 1^{er} auteur avec charge de correspondance dans Plant J en 1998

[planche 3](#) [suite du texte](#)

planche 3

Post Doc 1, Université de York (UK)

Véry A-A et al. 1998, Plant J 14: 509-521

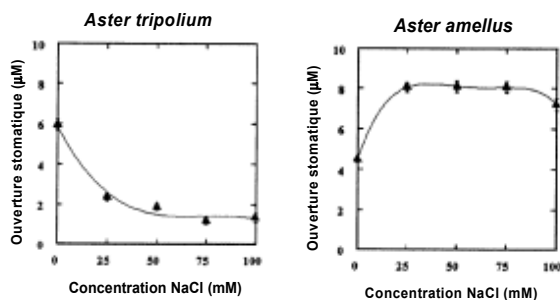
Guard cell cation channels are involved in Na⁺-induced stomatal closure in a halophyte

[retour au texte](#) [suite du texte](#)

A l'issue de ma thèse, je dispose d'une bonne expérience en analyse électrophysiologique. Je connais bien le système ovocyte de xénope mais je n'ai pas la maîtrise de l'électrophysiologie sur cellule végétale (protoplaste). Je choisis pour mon premier post-doc d'intégrer l'équipe de Dale Sanders à York, renommée au début des années 90 dans le domaine de l'électrophysiologie "in planta". Le sujet qui m'est confié concerne la cellule de garde et sa capacité, chez des plantes halophytes, à fonctionner correctement même en présence d'une forte concentration de Na⁺. Ce sujet se situe dans le cadre d'une collaboration entre Dale Sanders à York et Terry Mansfield à Lancaster. Je suis pleinement responsable du projet et de la gestion de la collaboration. Je signe la publication dans Plant J sur ce travail avec le statut de "corresponding author". Je participe aussi à l'écriture d'un article de revue avec le groupe de T Mansfield.

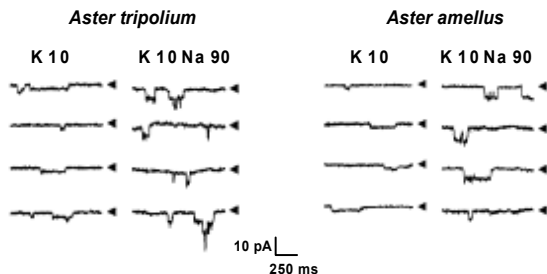
A Une halophyte, *Aster tripolium*, ferme ses stomates en présence de NaCl

(M Robinson & T Mansfield, Lancaster, UK)



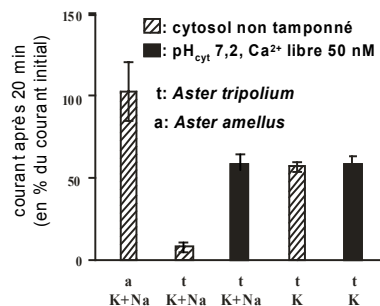
(A) Comparaison de la réponse des stomates à NaCl chez *Aster tripolium*, une halophyte, et chez *Aster amellus*, une glycophyte. Les mesures d'ouverture stomatique sont effectuées sur des épidermes pelés incubés 3h à la lumière, en absence de CO₂ dans une solution contenant KCl 10 mM et une concentration variable de NaCl (indiquée en abscisse).

B Identification d'une voie d'entrée de Na⁺ dans les cellules de garde d'*Aster*



(B) Identification de canaux cationiques perméables à Na⁺ dans les cellules de garde d'*Aster tripolium* et *Aster amellus*. Technique du patch-clamp sur protoplastes de cellules de garde. Les courants sont enregistrés à -85 mV, en présence de K⁺ 10 mM ou de K⁺ 10 mM + Na⁺ 90 mM dans le milieu externe.

C Na⁺_{cyt} induit une signalisation qui régule la conductance K⁺ entrante de la cellule de garde chez *Aster tripolium*: une explication possible à la réponse des stomates à NaCl



(C) Régulation par Na⁺ cytosolique de la conductance K⁺ entrante de la cellule de garde chez l'espèce halophyte. Technique du patch-clamp en configuration cellule entière sur protoplastes de cellules de garde. Na⁺, à une concentration de 100 mM est introduit dans le cytosol par la pipette de patch. La solution de pipette contient également K⁺ à une concentration de 100 mM. L'effet de Na⁺ cytosolique sur la conductance K⁺ entrante est déterminé en comparant le niveau de courant 20 min après l'introduction de Na⁺ dans le cytosol avec le niveau de courant initial. Une comparaison est également effectuée avec des cellules où Na⁺ n'a pas été introduit dans le cytosol (solution de la pipette contenant K⁺ 100 mM).

[retour au texte](#) [suite du texte](#)

4. Caractérisation de canaux calciques impliqués dans la croissance polarisée des hyphes mycéliennes et des poils absorbants racinaires.

(Université de Cambridge, UK, groupe de Julia Davies, 1996-1999)

[planche 4](#) [suite du texte](#)

Mon post-doc dans le Laboratoire de Dale Sanders m'a familiarisé avec les approches de physiologie des transports membranaires (analyse de systèmes de transport dans des membranes natives pour expliquer une réponse au niveau cellulaire) et donné le goût pour ce type d'approches. Je souhaite pour un deuxième contrat continuer dans la même direction. Julia Davies, une ancienne post-doc de Dale Sanders, vient d'être nommée maître de conférence à l'Université de Cambridge en physiologie fongique. Elle me propose un projet visant à identifier chez *Neurospora crassa*, avec les outils de l'électrophysiologie, des canaux calciques dont l'activité joue un rôle essentiel dans la croissance polarisée des hyphes. Brièvement, les hyphes mycéliennes sont des systèmes pluricellulaires arborescents. L'élongation de la cellule apicale, préalable à sa division, ou l'élongation d'un bourgeonnement secondaire, impliquent une exocytose de néo-membrane spécifiquement apicale. Comme chez d'autres systèmes à "croissance apicale" (tube pollinique, poil absorbant, embryon des algues fucoïdes), des gradients ioniques cytoplasmiques jouent un rôle dans le contrôle du développement. Par exemple, chez le tube pollinique, des variations spatiales de concentration de calcium cytoplasmique, à l'extrême apex, contrôlent la direction de la croissance (Malhó et Trewavas, 1996). Des gradients cytoplasmiques de Ca^{2+} à l'apex sont également observés dans les hyphes mycéliennes (Jackson et Heath, 1993). Les fortes concentrations de calcium apicales sont probablement nécessaires à l'exocytose "dirigée", puisque la croissance est stoppée lorsque le gradient apical de calcium cytosolique est dissipé. Le projet de Julia Davies a pour objectif de caractériser les canaux calciques de la membrane plasmique susceptibles d'intervenir dans la création des gradients apicaux de Ca^{2+} . Ces canaux sont-ils localisés préférentiellement à l'extrême apex? Sont-ils uniformément synthétisés mais actifs seulement à l'apex? La réponse à ces questions constitue le premier objectif que nous nous fixons.

L'analyse de l'activité des canaux Ca^{2+} dans différentes régions de l'hyphe (apex ou région subapicale) nécessite de développer une technique de patch clamp *in situ*. L'installation d'un laser sur le poste de patch permet de découper localement *in situ* la paroi de la cellule, après plasmolyse, et d'accéder alors à la membrane d'une région déterminée. Cette technique a été récemment développée par Colin Brownlee à Plymouth pour étudier le rôle des canaux dans le développement du zygote de *Fucus* (Taylor et Brownlee, 1992). Nous montons un poste similaire et mettons au point la technique pour l'obtention et le patch de sphéroplastes de membrane apicale chez *Neurospora*. Les canaux des champignons sont très peu caractérisés, parce que le patch sur leurs cellules est particulièrement difficile (cellules petites et/ou protoplastes de mauvaise qualité, présentant des restes de paroi). En plus de conductances calciques, j'identifie

quelques canaux, cationiques ou anioniques, dans les sphéroplastes de membrane apicale d'hyphes de *Neurospora*. Nous décrivons la technique et les canaux identifiés dans un article publié dans Appl Environ Microbiol. La généralisation du recours au laser pour l'obtention de membrane "propre" pour le patch chez les champignons pourrait permettre une caractérisation plus extensive de leur systèmes de transport.

Même avec la technique du laser, le patch sur sphéroplaste de membrane apicale chez *Neurospora* reste difficile. Cela résulte probablement du fait que les hyphes mycéliennes ont une croissance particulièrement rapide. En liaison avec cette importante vitesse de croissance, les hyphes possèdent à leur apex une importante activité de synthèse de paroi. Les sphéroplastes de membrane apicale reforment de la paroi en quelques minutes après leur isolement. Ils ne peuvent donc être utilisés pour le patch à moins de traiter les hyphes avec un inhibiteur d'exocytose pendant l'isolement des sphéroplastes. Ce traitement n'est peut-être pas anodin pour notre étude de cartographie de l'activité des canaux Ca^{2+} le long des hyphes en croissance. Je propose à Julia Davies de transférer le projet sur le poil absorbant racinaire, un autre modèle de cellule à croissance apicale présentant beaucoup de similitudes avec les hyphes mycéliennes pour ce qui est du rôle de Ca^{2+} à l'apex dans la croissance (planche 4A), et qui possède l'avantage d'avoir une moindre vitesse de croissance comparé à *Neurospora* (croissance 10 fois moins rapide).

La caractérisation sur le poil absorbant est effectuée avec la même stratégie: des sphéroplastes de membrane apicale ou subapicale sont isolés par "microdissection" laser de la paroi du poil (planche 4B), et les conductances Ca^{2+} sont analysées dans ces sphéroplastes. La conductance Ca^{2+} principale dans les sphéroplastes de membrane apicale isolés sur des jeunes poils en croissance est sensible au voltage, activée par l'hyperpolarisation de la membrane (planche 4C). *C'est une conductance d'un type non encore décrit dans des cellules différenciées de plantes.* J'effectue une caractérisation détaillée des propriétés de cette conductance (sélectivité, pharmacologie), et j'identifie le canal impliqué. Des analyses comparatives sont effectuées sur des sphéroplastes de membrane subapicale. Elles révèlent que cette conductance Ca^{2+} est également présente dans les régions subapicales, mais que son seuil d'activation est déplacé vers des potentiels plus négatifs (planche 4C). Sur des sphéroplastes de membrane apicale issus de poils matures (qui ont fini leur croissance), l'activité des conductances Ca^{2+} est similaire à celle enregistrée dans les régions subapicales. L'ensemble de ces analyses suggère que la conductance Ca^{2+} est présente tout le long du poil, mais elle est différemment régulée dans les régions en croissance et les régions non en croissance: son seuil d'activation n'est compatible avec un rôle dans l'absorption de Ca^{2+} *in vivo* (i.e., seuil d'activation moins négatif que le potentiel de membrane du poil; Lew, 1996) qu'à l'apex des jeunes poils en croissance (planche 4C). Enfin, les propriétés pharmacologiques de la conductance Ca^{2+} identifiée et les niveaux de courant enregistrés sont en accord avec l'hypothèse que cette conductance est la principale conductance responsable *in vivo* des influx de Ca^{2+} à l'apex des poils en croissance.

En conclusion, ce travail caractérise une des premières conductances calciques activables par l'hyperpolarisation décrites chez les plantes (Véry et Sentenac, 2002), et ouvre de nouvelles perspectives pour analyser le phénomène de croissance cellulaire apicale et son contrôle par le calcium cytoplasmique.

1 article en 1^{er} auteur avec charge de correspondance dans Appl Environ Microbiol en 1998

1 article en 1^{er} auteur avec charge de correspondance dans PNAS en 2000

[planche 4](#) [suite du texte](#)

planche 4

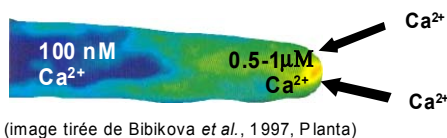
[retour au texte](#) [suite du texte](#)

Post Doc 2, Université de Cambridge
 Véry A-A & Davies JM 2000, PNAS 97: 9801-9806

Hyperpolarisation-activated calcium channels at the tip of Arabidopsis root hairs

Je rencontre Julia Davies au cours de mon post-doc chez Dale Sanders. Julia obtient un poste d'enseignante à Cambridge. Elle me propose de la suivre pour développer un projet pour lequel elle a obtenu un financement, sur le rôle de canaux calciques dans la croissance apicale des hyphes mycéliennes (modèle: *Neurospora*). Il est connu que le phénomène de croissance apicale (chez l'hyphe mycélienne, le poil absorbant racinaire ou le tube pollinique) implique la mise en place d'un gradient polarisé de concentration cytoplasmique de Ca^{2+} à l'apex en croissance. Pour avoir accès à la membrane plasmique de l'extrémité de l'hyphe en croissance, je dois développer une méthodologie, basée sur l'association d'un poste de patch-clamp à un poste de micro-dissection laser. Un premier article (dont je suis le premier auteur et le "corresponding author") est publié dans *Appl. Environ. Microbiol.* Parallèlement, je propose à Julia d'utiliser la méthodologie mise au point sur *Neurospora* pour étudier un autre modèle de cellule à croissance polarisée: le poil absorbant racinaire d'*Arabidopsis*. La caractérisation des canaux calciques exprimés par cette cellule, au niveau fonctionnel et spatial est publiée dans PNAS. Je signe cet article avec le statut de premier auteur et "corresponding author".

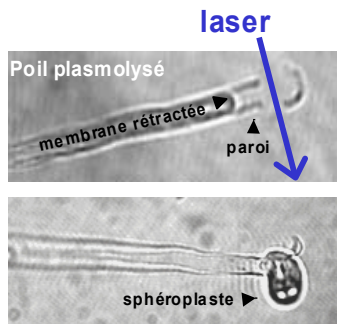
A Le poil absorbant, un modèle de cellule à croissance apicale



(image tirée de Bibikova et al., 1997, Planta)

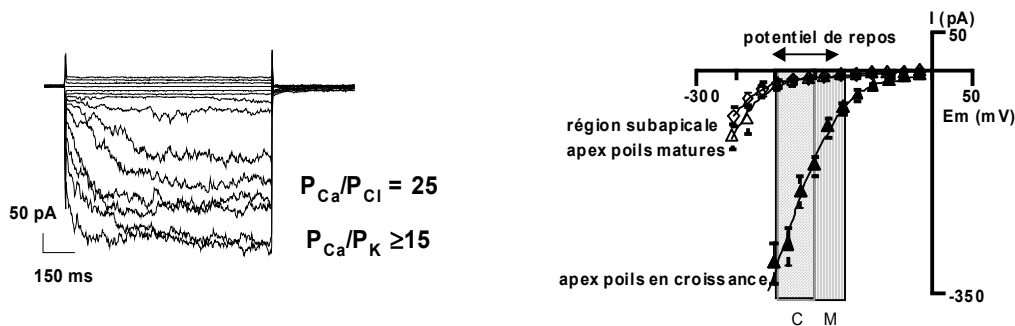
(A) Le poil absorbant racinaire, une cellule à croissance apicale. De fortes concentrations de Ca^{2+} libre cytosolique à l'apex du poil sont nécessaires à son élongation. Ces fortes concentrations de Ca^{2+} cytosolique résultent d'un influx localisé de Ca^{2+} à l'apex du poil en croissance.

B Mise au point de l'isolement localisé de membrane par "microdissection" laser



B) : Isolement de sphéroplastes de membrane apicale de poils absorbants d'*Arabidopsis*. Le poil est plasmolysé *in situ* pour rétracter la membrane de la paroi à l'apex. La paroi à l'apex est alors découpée à l'aide d'un laser. Une déplasmolyse modérée du poil permet d'extruder au niveau du site de découpe un sphéroplaste de membrane apicale. Des sphéroplastes de membrane subapicale peuvent également être obtenus, avec une déplasmolyse plus forte.

C Identification d'une conductance calcique active à l'apex des poils en croissance



(C) Identification par patch-clamp après dissection laser d'une conductance calcique activée par l'hyperpolarisation à l'apex des poils absorbants en croissance. Panneau de gauche: exemple de courants calciques enregistrés sur un sphéroplaste de membrane apicale isolé chez un jeune poil en croissance. La solution externe contient $CaCl_2$ 10 mM. La concentration de Ca^{2+} libre dans la pipette est 520 nM. Les potentiels de membrane imposés varient de +44 à -216 mV par pas de -20 mV. Panneau de droite: comparaison de l'activité de la conductance calcique dans les régions apicale et subapicale chez des jeunes poils en croissance, et dans la région apicale, chez des poils en croissance et des poils matures. Les plages de potentiel de membrane rapportées *in situ* sur des poils en croissance "C" ou matures "M" suggèrent qu'un influx de calcium à travers cette conductance calcique a lieu *in vivo* seulement à l'apex des poils en croissance.

[retour au texte](#) [suite du texte](#)

5. SPIK, un canal entrant d'*Arabidopsis* essentiel pour la fertilité du pollen.

(Montpellier UMR 5004, équipe de J-B Thibaud & H Sentenac, 2000-2001) [planche 5](#) [suite du texte](#)

*En 1999, après plus de 4 années de formation post-doctorale en Angleterre, j'intègre en tant qu'IE CNRS l'équipe Canaux Ioniques dirigée par Jean-Baptiste Thibaud et Hervé Sentenac à Montpellier dans l'UMR 5004, pour poursuivre mes activités de recherche en France. J'y apporte mon expérience en électrophysiologie in planta (cellules de garde, poil absorbant, ...), un domaine que l'équipe n'a pas encore commencé à investir. Je dispose aussi d'une expérience dans la conduite autonome et la responsabilité de projets de recherche, acquise au cours de mes deux contrats post-doctoraux, à York et Cambridge (attestée par le statut d'auteur en charge de correspondance pour 3 articles, dans Plant J, Appl Environ Microbiol et PNAS). Dans ce contexte, Jean-Baptiste Thibaud et Hervé Sentenac me confient la responsabilité de la conduite de projets de recherche et de l'encadrement d'étudiants en DEA et thèse, en plus de mon travail de mises au point méthodologiques et de développement de l'équipement en électrophysiologie. Le premier projet qui m'est confié, sur la base de mon expérience dans l'analyse électrophysiologique des cellules à croissance apicale, concerne le canal potassique Shaker SPIK du grain de pollen d'*Arabidopsis*. Le travail sur ce canal conduira à une publication dans la revue Genes and Development, dont je suis co-premier auteur avec une doctorante, Karine Mouline.*

Le travail sur le canal SPIK (pour Shaker Pollen Inward K⁺ channel) s'inscrit dans le cadre de ce qui constitue l'objectif général de l'équipe à cette période: caractériser de façon systématique tous les membres de la famille Shaker d'*Arabidopsis*. Frédéric Gaymard, Karine Mouline, Jossia Boucherez et Guillaume Pilot ont démarré le travail sur SPIK avant mon arrivée dans l'équipe. A mon arrivée, l'ADNc est cloné, la localisation de l'expression de *SPIK* dans le pollen est déterminée (planche 5A), un mutant knock-out par insertion d'ADN-T (lignée *spik-1*) a été isolé dans la collection de l'INRA de Versailles et la position de l'insertion dans le gène est cartographiée.

Mon travail sur le projet SPIK va se situer à 2 niveaux:

- (i) Encadrement de Karine Mouline (en thèse) pour la caractérisation phénotypique du mutant knock-out (en particulier les expériences sur la croissance des tubes polliniques)
- (ii) Caractérisation électrophysiologique de l'activité du canal SPIK en système d'expression hétérologue et *in planta*

(i) Caractérisation phénotypique du mutant. La germination *in vitro* de pollen de génotype *spik-1* fait apparaître un défaut important de développement du tube pollinique: le pollen germe

normalement mais la plupart des tubes dégénèrent rapidement (planche 5B). Les quelques tubes qui réussissent à se développer s'allongent moins que ceux qui se développent chez le pollen sauvage (planche 5B). Une analyse quantitative montre que le déficit de développement du tube pollinique chez le pollen *spik-1* par rapport au pollen sauvage est le même pour des concentrations de K^+ dans le milieu de germination comprises entre 50 μ M et 1 mM (i.e., une plage de concentrations susceptible de comprendre les concentrations rencontrées par les tubes polliniques *in vivo*).

La fertilité, *in vivo*, du pollen *spik-1* par rapport à celle du pollen sauvage, est examinée en analysant la descendance de plantes hétérozygotes *SPIK/spik-1*. Une proportion de plantes de génotype sauvage supérieure à 25% dans cette descendance indique que le pollen *spik-1* est moins compétitif que le pollen sauvage. Une analyse quantitative sur trois générations successives, indique que la perte de fécondité du pollen *spik-1* est de 40%.

(ii) Analyses électrophysiologiques et modélisation. Les premières expériences indiquent que SPIK ne s'exprime pas sous une forme fonctionnelle dans l'ovocyte de xénope. J'analyse les propriétés de SPIK dans des cellules COS par la technique du patch-clamp. Une caractérisation classique est effectuée, comprenant la sélectivité du canal, la sensibilité au voltage, l'affinité apparente vis à vis du potassium, la conductance unitaire, la régulation par le pH et le calcium externes et un peu de pharmacologie. L'objectif de cette caractérisation en système hétérologue est d'établir une "carte d'identité" suffisamment précise de SPIK pour pouvoir ensuite identifier son activité dans le pollen et comprendre son rôle dans le développement du tube pollinique. En résumé, les données dans les cellules COS indiquent notamment que SPIK est un canal K^+ de type entrant (planche 5C), de faible affinité pour K^+ ($K_M \approx 15$ mM), dont le seuil d'activation est indépendant de la concentration externe de K^+ .

Des analyses de patch clamp sur la membrane du grain de pollen sauvage révèlent la présence d'une conductance K^+ activée par l'hyperpolarisation de la membrane, dont la cinétique d'activation et la dépendance vis à vis du voltage sont très semblables à celles obtenues pour SPIK dans les cellules COS (planche 5D). Cette conductance est absente de la membrane des grains de pollen de la lignée *spik-1*, ce qui confirme qu'elle est liée à l'expression de SPIK (planche 5D). Elle représente la voie principale d'entrée de K^+ dans les grains de pollen lorsque la membrane est fortement hyperpolarisée (potentiel plus négatif que -160 mV en présence de K^+ 50 mM dans le milieu externe; planche 5D).

Des données sur la polarisation membranaire des tubes polliniques en croissance sont nécessaires pour analyser le rôle de SPIK dans le développement des tubes. La polarisation membranaire est-elle suffisante pour que SPIK soit lui-même directement impliqué dans l'absorption de K^+ au niveau des tubes? Ou SPIK intervient-il dans le contrôle de la polarisation membranaire et joue alors un rôle indirect dans le transport de K^+ via d'autres systèmes de transport ou même dans le transport d'autres ions ou métabolites importants pour le

développement du tube? *Aucune information n'existe alors dans la bibliographie sur la polarisation des tubes polliniques en croissance chez Arabidopsis.* Les données de polarisation que j'obtiens sur des tubes qui se développent sur un milieu contenant KCl 1 mM suggèrent que SPIK conduit lui-même un influx de K^+ significatif dans les tubes dans ces conditions de milieu (planche 5E). En se basant sur le niveau du courant SPIK enregistré sur les protoplastes de pollen en présence de K^+ 50 mM, sur la relation entre la concentration externe de K^+ et le courant dans le canal déterminée dans les cellules COS, sur la polarisation membranaire du tube pollinique en présence de K^+ 1 mM, la géométrie du tube et sa vitesse de croissance, on peut estimer que SPIK intervient pour au moins la moitié du courant nécessaire pour maintenir la concentration interne de K^+ constante pendant la croissance du tube.

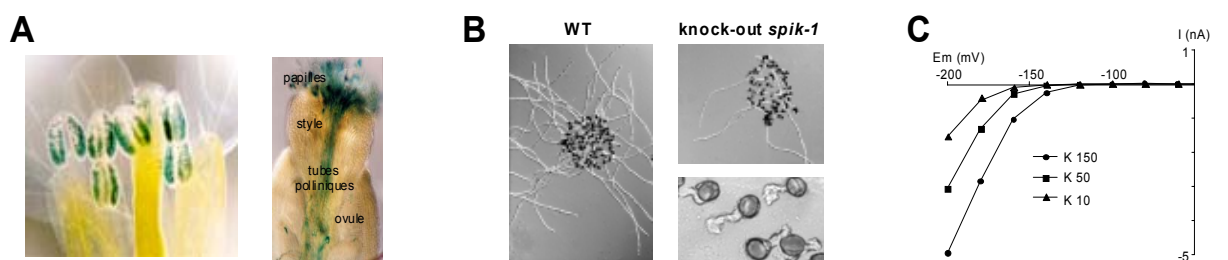
1 article en co-1^{er} auteur dans Genes & Dev en 2002

Sur le plan technique, l'article présentant ce travail constitue la première publication incluant des analyses de patch-clamp in planta effectuées dans l'équipe Canaux Ioniques. D'autre part, l'acquisition des mesures de potentiel électrique transmembranaire sur le tube pollinique en croissance chez Arabidopsis représente une "première" sur le plan méthodologique.

[planche 5](#) [suite du texte](#)

planche 5[retour au texte](#) [suite du texte](#)**Montpellier, IE dans l'équipe Canaux Ioniques, UMR 5004****Mouline K, Véry A-A (co-premier auteurs) et al., 2002 Genes & Dev 16: 339-350****Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K⁺ channel in Arabidopsis**

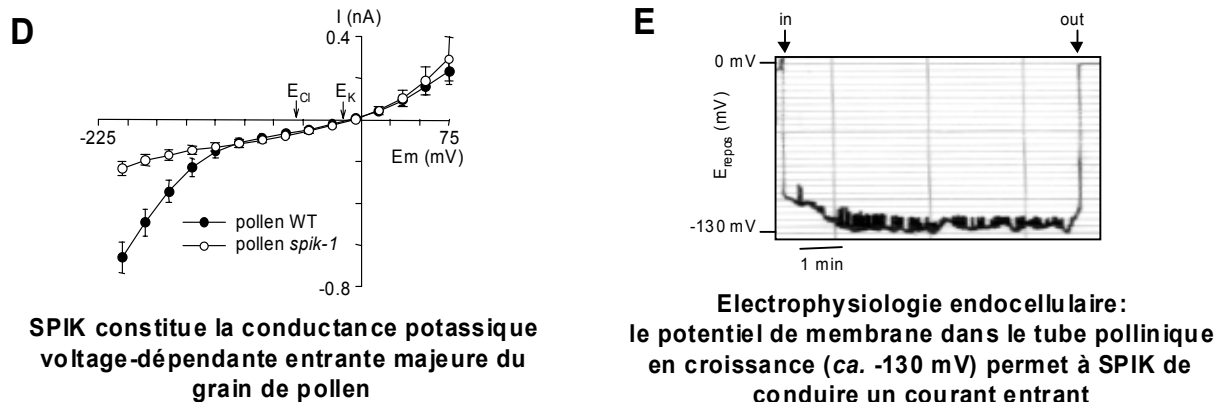
Ce travail correspond au premier projet qui m'est confié après mon recrutement dans l'équipe Canaux Ioniques. J'encadre le travail de Karine Mouline (doctorante) pour l'analyse phénotypique du mutant KO *spik*, et en particulier les tests de germination du pollen et de croissance *in vitro* du tube pollinique (panneau B). Je réalise l'ensemble des analyses électrophysiologiques de l'article, ce qui implique deux mises au point délicates, le patch-clamp sur protoplastes de grain de pollen d'*Arabidopsis* (panneau D), et la mesure chez *Arabidopsis* par électrophysiologie endocellulaire du potentiel de membrane de tubes polliniques en croissance (panneau E). L'analyse de l'ensemble des données électrophysiologiques conduit à conclure que SPIK joue un rôle dans l'allongement du tube pollinique probablement en permettant un influx de K⁺ assurant le maintien de la turgescence du tube.



SPIK: un Shaker d'*Arabidopsis* exprimé dans le grain de pollen et le tube pollinique en croissance

SPIK est important pour l'allongement du tube pollinique

Caractérisation de SPIK dans des cellules COS: un canal de type entrant



SPIK constitue la conductance potassique voltage-dépendante entrante majeure du grain de pollen

Electrophysiologie endocellulaire: le potentiel de membrane dans le tube pollinique en croissance (ca. -130 mV) permet à SPIK de conduire un courant entrant

(A) Localisation de l'expression de SPIK par analyse histochimique sur des lignées exprimant le gène rapporteur GUS en fusion avec le promoteur de SPIK.

(B) Tests de germination de pollen *in vitro* sur un milieu gélosé contenant 0.1 mmole.L⁻¹ de K⁺. Comparaison du pollen sauvage et du pollen de la lignée *spik-1* (knock-out).

(C) Caractérisation fonctionnelle de SPIK en système hétérologue. Exemple de relations courant-voltage obtenues à l'aide de la technique du patch-clamp sur une cellule COS exprimant SPIK, en présence de 150, 50, ou 10 mmole.L⁻¹ de KCl dans le milieu externe.

(D) Analyse de l'activité de SPIK *in planta*. Patch clamp sur protoplastes de grains de pollen provenant de plantes sauvages ou de la lignée *spik-1*. La concentration de KCl dans le milieu externe est 50 mM.

(E) Mesure du potentiel de membrane d'un tube pollinique de génotype sauvage, développé *in vitro* sur un milieu gélosé contenant K⁺ 1 mM. Le potentiel d'équilibre de K⁺ dans ces tubes est estimé entre -110 et -120 mV (concentration de K⁺ cytosolique estimée entre 80 et 120 mM). Le "potentiel d'activation" de SPIK (5% de l'activité maximale) estimé à partir des expériences dans les cellules COS et sur protoplastes de pollen est -115 mV. L'analyse de ces données conduit à conclure que SPIK participe de façon significative à un influx de K⁺ dans le tube pollinique en croissance.

[retour au texte](#) [suite du texte](#)

6. Un nouveau type fonctionnel parmi les canaux Shaker végétaux identifié chez le maïs.

(Montpellier UMR 5004, équipe de J-B Thibaud & H Sentenac, 2000-2004) [planche 6](#) [suite du texte](#)

Des programmes de transfert vers le maïs des connaissances moléculaires acquises sur les *Shaker* chez *Arabidopsis* sont développés à partir du milieu des années 90 dans l'équipe *Canaux Ioniques* et dans d'autres équipes (exemple Philippar *et al.*, 1999). Le maïs est choisi comme modèle de plante à intérêt agronomique, en raison de ses fortes capacités de transport de K^+ liées à sa croissance rapide et de l'existence de données (électro)physiologiques nombreuses sur le transport de K^+ chez cette espèce. Rapidement, des homologues des *Shaker* identifiés chez *Arabidopsis* sont retrouvés chez le maïs. Les *Shaker* de maïs ont-ils les mêmes propriétés et les mêmes rôles que ceux d'*Arabidopsis*?

ZmK2.1, un homologue des *Shaker KAT1/KAT2* d'*Arabidopsis* est isolé dans une banque d'ADNc de maïs par Yan-Hua Su (en thèse dans l'équipe) et Helen North (en contrat post-doctoral). Ils déterminent par northern blots que *ZmK2.1* est exprimé, comme *KAT1* et *KAT2*, dans les tissus aériens.

A mon arrivée dans l'équipe, je suis chargée d'encadrer Yan-Hua Su (alors au milieu de sa thèse), pour la caractérisation fonctionnelle de *ZmK2.1*. *ZmK2.1* est exprimé dans l'ovocyte de xénope et caractérisé à l'aide de la technique du voltage-clamp à 2 électrodes. Yan-Hua effectue une analyse détaillée de ses propriétés: sélectivité, affinité apparente pour K^+ , sensibilité au voltage, sensibilité au pH, à Ca^{2+} externe, et à des inhibiteurs classiques. Il met en évidence une propriété originale chez ce canal: l'activité de *ZmK2.1* est régulée par la concentration externe de K^+ . Ce canal, de type entrant, n'est pas actif à des concentrations submillimolaires de K^+ , contrairement à ses homologues d'*Arabidopsis* (planche 6).

Je participe à la correction de la thèse de Yan-Hua et fait partie de son jury de soutenance en 2001.

L'effet de la concentration externe de K^+ sur l'activité de *ZmK2.1* n'a pas pu être analysé en détail par Yan-Hua, une conductance endogène de l'ovocyte de xénope activée par l'expression de *ZmK2.1* gênant les analyses à faible concentration externe de K^+ . Je termine cette étude dans un autre système d'expression hétérologue, les cellules COS, à l'aide de la technique du patch-clamp. D'autres cations que K^+ sont-ils capables d'activer ce canal? Aucune activité n'est enregistrée quand K^+ est remplacé par Na^+ ou NH_4^+ , ce qui suggère que *ZmK2.1* est activé spécifiquement par K^+ *in vivo*. Je détermine l'affinité apparente de l'activation du canal par K^+ externe, et je montre que cette régulation de l'activité par K^+ est indépendante de la régulation de l'activité du canal par le voltage (planche 6). L'ensemble de ces résultats suggère que la bouche externe de *ZmK2.1* comprend un site sélectif de K^+ , dont l'occupation dépend de la concentration externe de K^+ , impliqué dans la régulation par K^+ de l'activité du canal.

L'activité de canaux de type ZmK2.1 peut-elle être identifiée dans des cellules de maïs? D'autres types de canaux K^+ sont-ils actifs dans ces cellules? En particulier, y a-t-il compensation par des canaux non régulés par K^+ externe de l'absence d'activité à faible concentration externe de K^+ chez les canaux de type ZmK2.1 dans ces cellules? J'effectue des analyses sur des protoplastes de cellules de garde de maïs, à l'aide de la technique du patch clamp. Des canaux de type ZmK2.1, sont identifiés dans ces protoplastes. Des canaux K^+ voltage dépendants non régulés par K^+ externe sont également présents dans ces protoplastes. J'effectue des expériences de RT-PCR semi quantitative pour préciser la nature moléculaire des canaux de type ZmK2.1 identifiés par patch-clamp dans les cellules de garde. L'expression de *ZmK2.1* dans les épidermes foliaires est faible. Par contre, un homologue de *ZmK2.1*, *KZM2*, encore non caractérisé au niveau fonctionnel, est fortement exprimé dans les épidermes. *KZM2* pourrait être responsable de l'essentiel de la conductance K^+ régulée par K^+ externe dans les cellules de garde de maïs.

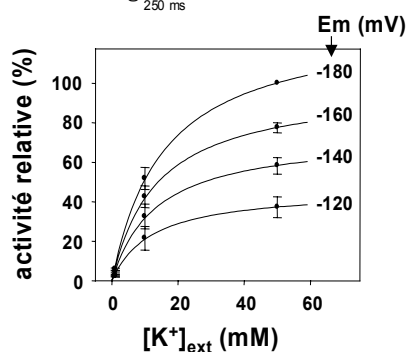
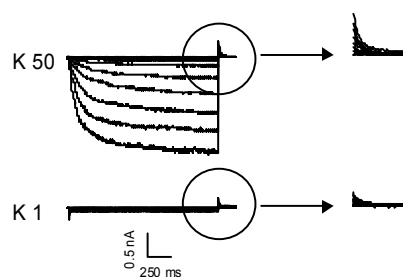
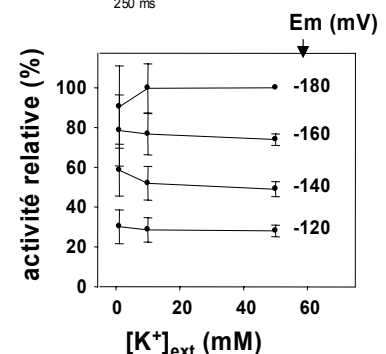
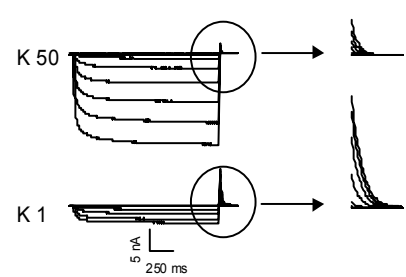
1 article en dernier auteur avec charge de correspondance dans Plant Cell en 2005

La publication de ce travail représente pour moi une étape importante. D'une part, il s'agit de la première publication que je signe avec le double statut de dernier auteur et d'auteur en charge de correspondance. D'autre part, et surtout, c'est la première publication que je signe à l'intérieur de laquelle ma contribution personnelle sur le plan expérimental concerne, outre les études électrophysiologiques, des expériences de biologie moléculaire: préparation d'ARN, analyses par RT-PCR de l'expression de canaux, analyses de séquence, clonage. J'ai depuis poursuivi, au sein de l'équipe, cet investissement dans l'apprentissage des techniques de base de la biologie moléculaire.

[planche 6](#) [suite du texte](#)

planche 6[retour au texte](#) [suite du texte](#)**Montpellier, IE dans l'équipe Canaux Ioniques, UMR 5004****Su Y-H, ... & Véry A-A, 2005, Plant Cell 17: 1532-1548***Regulation by external K^+ in a maize inward Shaker channel targets transport activity in the high concentration range*

Dans ce travail, j'encadre Yan-hua Su (doctorant) dans l'analyse électrophysiologique du canal exprimé dans l'ovocyte de xénope. Cette analyse révèle un comportement original du canal, évoquant une sensibilité au potassium externe, non encore décrite dans les canaux Shakers entrants caractérisés à ce jour. Du fait de l'activation de conductances endogène aux hyperpolarisations, il n'est pas possible d'aller plus loin dans l'analyse en utilisant l'ovocyte comme système d'expression. Dans ce contexte, j'exprime le canal dans des cellules COS en culture et j'analyse de façon quantitative la sensibilité du canal à la concentration externe de K^+ , en conduisant en parallèle le même type d'analyses sur le canal "référence" KAT1 d'*Arabidopsis*. Je complète ces analyses par une étude du profil d'expression du canal de maïs, par RT-PCR et par une analyse de la conductance potassique entrante de la cellule de garde de maïs.

ZmK2.1**KAT1**

La figure présente l'analyse de la sensibilité à la concentration externe de K^+ chez le canal ZmK2.1 de maïs (panneaux de gauche), et chez le canal KAT1 d'*Arabidopsis* (panneaux de droite). KAT1 et ZmK2.1 sont exprimés dans des cellules COS. L'activité des canaux est analysée à l'échelle de la cellule entière à l'aide de la technique du patch-clamp. Panneaux du haut: traces de courant enregistrées en présence de 50 ou 1 mmole.L⁻¹ de K^+ sur la face externe du canal. Le protocole de voltage imposé comprend une étape d'activation, où la membrane est hyperpolarisée pour favoriser l'ouverture des canaux KAT1 ou ZmK2.1, et une étape de désactivation où la membrane est dépolarisée, pour fermer progressivement les canaux ouverts à l'étape d'activation. Le potentiel d'activation varie avec un pas de -20 mV à chaque épisode, le potentiel de désactivation est à chaque épisode 0 mV. L'amplitude initiale des courants de désactivation (entourés par des cercles) enregistrés à un même potentiel est proportionnelle au nombre de canaux ouverts à la fin de l'étape d'activation. Elle est donc utilisée pour analyser la relation entre l'activité des canaux et le potentiel de membrane. Elle met en évidence un déficit d'activité chez ZmK2.1 par rapport à KAT1 en présence de K^+ 1 mM dans le milieu externe. Panneaux du bas: quantification de l'effet de la concentration externe de K^+ sur l'activité du canal chez KAT1 et ZmK2.1. L'activité relative du canal est déterminée à différentes concentrations externes de K^+ en divisant les courants instantanés de désactivation par la force d'entraînement de K^+ à 0 mV ($-E_K$) dans les différentes conditions de milieu. L'activité relative de ZmK2.1 augmente avec la concentration externe de K^+ en suivant une cinétique Michaelienne. Le K_M apparent, proche de 15 mM, est indépendant du niveau d'activation du canal par le voltage. Chez KAT1, par contre, l'activité relative est indépendante de la concentration de K^+ (panneau du bas à droite).

[retour au texte](#) [suite du texte](#)

7. Autres activités depuis mon recrutement dans l'équipe *Canaux Ioniques à Montpellier*

Sur le plan méthodologique, j'ai participé à l'installation de deux postes de patch-clamp dans l'équipe contribuant ainsi au renforcement des capacités d'analyse électrophysiologique *in planta* de l'équipe. Un de ces postes permet de coupler analyse électrophysiologique et localisation sub-cellulaire des canaux (*via* l'utilisation d'un marqueur GFP ou d'autres marqueurs fluorescents). Je signe une publication parue en 2005 dans la nouvelle revue *Plant Methods* (Hosy *et al.*, 2005) qui décrit notamment cette mise au point méthodologique.

J'ai eu la responsabilité de la rédaction (avec le statut de premier auteur et d'auteur en charge de correspondance) de deux articles de revue, dans *Trends in Plant Science* (Véry et Sentenac, 2002) et dans *Annual Review of Plant Biology* (Véry et Sentenac, 2003).

J'ai participé à l'encadrement d'Eric Hosy, étudiant en DEA puis doctorant dans l'équipe (thèse soutenue en 2004; directeur de thèse: J-B Thibaud), sur des aspects méthodologiques (patch-clamp sur cellules de garde d'*Arabidopsis*) et je suis co-auteur à ce titre d'un article publié dans la revue *PNAS* (Hosy *et al.*, 2003).

Dans le cadre d'une collaboration avec Pierre Berthomieu dans notre UMR, sur un projet concernant la fonction du transporteur de Na⁺ AtHKT1 d'*Arabidopsis*, j'ai été responsable de l'analyse électrophysiologique de ce transporteur et de mutants de ce transporteur identifiés par Pierre. A ce titre, je suis co-auteur de la publication correspondante (Berthomieu *et al.*, 2003), parue dans *EMBO J*.

Au cours de l'année universitaire précédente, j'ai eu la responsabilité de l'encadrement direct de plusieurs étudiants, de l'Université ou l'Agro de Montpellier (Linda Jeanguenin, Mehdi Jebnoun), l'ENS Lyon (Anne Janvier), l'Université de Potsdam (Jeannette Kley), au niveau Licence (Anne Janvier), DEA (Linda Jeanguenin et Jeannette Kley) (*Cf. curriculum vitae*) ou thèse (Mehdi Jebnoun). Actuellement, j'encadre 2 doctorants: Linda Jeanguenin et Mehdi Jebnoun (directeur de thèse: Hervé Sentenac). Linda travaille sur un programme qui concerne la fonction du Shaker à activité régulatrice AtKC1 chez *Arabidopsis*. AtKC1 présente un adressage conditionnel du réticulum à la membrane plasmique, où il régule l'activité d'autres Shaker en formant avec eux des canaux hétéromériques. Mehdi (thèse en co-tutelle avec l'Université de Tunis; Pr. Chedly Abdelly) étudie la fonction des homologues d'AtHKT1 chez le riz.

Références

- Anderson JA *et al.*, 1992. PNAS 89: 3736-3740
- Assmann SM, 1993. Annu Rev Cell Biol 9: 345-375
- Bibikova TN *et al.*, 1997. Planta 203: 495-505
- Blatt MR, 1992. J Gen Physiol 99: 615-644
- Hamill OP *et al.*, 1981. Pflügers Arch 391: 85-100
- Hedrich R 1994 Current topics in membranes and transport 42: 1-33
- Homblé F, Ferrier J, Dainty J, 1987. Plant Physiol 83: 433-437
- Hoshi T, 1995. J Gen Physiol 105: 309-328
- Jackson SL et Heath IB, 1993. Microbiol Rev 57: 367-382
- Jan LY et Jan YN, 1992a. Annu Rev Physiol 54: 537-555
- Jan LY et Jan YN, 1992b. Cell 69: 715-718
- Jarvis RG et Mansfield TA, 1980. Plant Cell Environ 3: 279-283
- Levitt DG *et al.*, 1978. Biochem Biophys Acta 512: 436-451
- Levitt DG, 1990. J Chem Physiol 92: 6953-6957
- Lew RR, 1996. Plant Physiol 112:1089-1100
- Malhó R et Trewavas AJ, 1996. Plant Cell 8: 1935-1949
- McCormac K *et al.*, 1991. PNAS 88: 2931-2935
- Papazian DM *et al.*, 1987. Science 237: 749-753
- Papazian DM *et al.*, 1991. Nature 349: 305-310
- Perrera LKRR *et al.*, 1994. Plant Cell Environ 17: 335-340
- Philippak K *et al.*, 1999. PNAS 96: 12186-12191
- Rosenberg PA et Finkelstein A, 1978. J Gen Physiol 72: 327-340
- Schachtman DP *et al.*, 1992. Science 258: 1654-1658
- Schwartz TL *et al.*, 1988. Nature 331: 137-142
- Schroeder JI, 1988. J Gen Physiol 92: 667-683
- Schroeder JI et Hagiwara S, 1989. Nature 338: 427-430
- Sentenac H *et al.*, 1992. Science 256: 663-665
- Taylor AR et Brownlee C, 1992. Plant Physiol 99: 1686-1688
- Véry AA et Sentenac H, 2002. Trends Plant Sci 7: 321-332
- Zhou Y *et al.*, 2001. Nature 414: 43-48

Projet de recherche:

Rôle des transporteurs HKT dans l'homéostasie potassique et sodique et la résistance au stress salin chez le riz

Résumé du projet

Je propose un programme qui a pour objectif de préciser la fonction des transporteurs de la famille HKT dans l'homéostasie potassique et sodique de la plante. Les données disponibles actuellement sur la fonction moléculaire de ces systèmes révèlent une activité de transport de sodium et, parfois, de potassium, avec probablement dans certains cas une activité de type symport $\text{Na}^+\text{-K}^+$ permettant l'énergisation d'un transport de K^+ à haute affinité. Parallèlement, des analyses génétiques récentes indiquent que ces fonctions de transport jouent un rôle crucial dans la tolérance de la plante au stress salin.

L'espèce modèle que je choisis pour ce programme est le riz, en particulier parce que cette plante présente un nombre important de transporteurs HKT par rapport à *Arabidopsis* (respectivement 9 gènes et 1 gène). Il faut noter aussi qu'un travail récent vient de révéler qu'un QTL important de résistance au stress salin chez le riz, jouant un rôle dans le contrôle de l'homéostasie potassique foliaire, correspond au gène *OsHKT8* (Ren *et al.*, 2005).

L'analyse des mécanismes d'adaptation au stress salin chez les plantes constitue le cadre général de mon premier travail post-doctoral. Il s'agit d'un sujet important à la fois pour le physiologiste et pour l'agronome. Toujours intéressée par cette thématique après mon retour à Montpellier, je collabore (sur les aspects électrophysiologiques) à un projet dirigé par Pierre Berthomieu dans notre UMR. Nous montrons qu'*AtHKT1*, l'unique gène de la famille *HKT* chez *Arabidopsis*, code un transporteur de Na^+ exprimé spécifiquement dans le phloème et impliqué dans la charge de ce cation dans la sève phloémienne. Ce phénomène permet à la plante de rediriger vers les racines les ions Na^+ transportés par le xylème vers les feuilles et ainsi de s'adapter à la présence de Na^+ dans son environnement en contrôlant le niveau d'accumulation foliaire de cet ion (Berthomieu *et al.*, 2003). Ces résultats intéressent particulièrement la communauté internationale mais Pierre Berthomieu doit abandonner ce domaine de recherche (en prenant la direction d'une équipe dans notre UMR).

Le projet que je propose, au sein de mon équipe, a pour objectif de redémarrer un programme de recherche sur les mécanismes de résistance des plantes au stress salin en prenant comme angle d'attaque l'analyse de la fonction des 9 membres de la famille HKT chez le riz.

Je propose de développer une stratégie de biologie intégrée, en étudiant de façon systématique les différents HKT de riz et en utilisant de façon conjointe différentes approches, fonctionnelles, moléculaires et génétiques: caractérisation électrophysiologique de l'activité des transporteurs en système hétérologue et *in planta*, étude de leur expression au niveau tissulaire par la stratégie gène rapporteur (lignées transgéniques obtenues en collaboration avec l'équipe d'Emmanuel Guiderdoni au CIRAD), localisation sub-cellulaire par expression transitoire dans des protoplastes et analyse par imagerie GFP et/ou électrophysiologie, production et caractérisation phénotypique de mutants perte de fonction. Cette stratégie est détaillée plus loin, après la présentation des données bibliographiques et éléments stratégiques supportant le projet.

Des analyses électrophysiologiques conduites après expression dans l'ovocyte de xénope de 3 HKT de riz m'ont d'ores et déjà permis de révéler une diversité fonctionnelle étonnante et intrigante chez cette espèce. D'autre part, j'ai également déjà obtenu, et commencé à purifier, des lignées de riz mutantes perte de fonction pour 3 gènes HKT. Ce travail est conduit par Mehdi Jebnoun, un doctorant que j'encadre, et bénéficie d'une collaboration avec l'équipe d'Emmanuel Guiderdoni.

A court terme, je donne cependant la priorité aux analyses fonctionnelles et électrophysiologiques. Je considère que mon expérience dans ce domaine correspond à un atout majeur, par rapport à la plupart des groupes concurrents au niveau international. Dans ce contexte, la diversité fonctionnelle que j'ai déjà observée chez 3 HKT (en cours de caractérisation dans l'ovocyte de xénope) conforte l'intérêt que je porte à ce projet et ma confiance dans la possibilité de le mener à bien et de contribuer à la compréhension des mécanismes de tolérance au sel impliquant le contrôle des transports membranaires de K^+ et Na^+ et l'homéostasie potassique et sodique.

1. Origine du projet

En 2002, Pierre Berthomieu, qui travaille dans notre UMR sur les mécanismes de résistance au stress salin chez *Arabidopsis* à l'aide d'approches de génétique, a identifié parmi plusieurs mutants "EMS" suraccumulant Na^+ dans les parties aériennes, deux mutants alléliques dans le gène *AtHKT1*. Il me propose de collaborer avec lui pour analyser dans l'ovocyte de xénope les propriétés de transport des transporteurs produits par les lignées mutantes. C'est pour moi le premier contact expérimental avec cette famille de transporteurs intrigants, identifiés depuis bientôt dix ans mais chez lesquels à la fois le mécanisme de fonctionnement et les hypothèses quant au rôle dans la plante restent très controversés. Je me passionne pour *AtHKT1* et, en plus de la caractérisation des transporteurs mutants dans le cadre du projet de Pierre, je fais quelques mois d'expériences (par curiosité) sur le transporteur sauvage pour essayer de comprendre son fonctionnement (sélectivité et énergisation du transport), avant de reprendre le travail en cours sur les canaux Shaker.

Le travail de Pierre Berthomieu marque la communauté s'intéressant à la famille HKT. Il apporte enfin des éclaircissements sur l'un de ces systèmes, AtHKT1, et son rôle dans la tolérance de la plante au stress salin. Cependant, le rôle de la famille des transporteurs HKT chez les plantes reste largement incompris. Par exemple, le premier membre de cette famille cloné chez les plantes, TaHKT1, qui présente des propriétés de transport et un patron d'expression dans la plante (le blé) différents de ceux d'AtHKT1, a une fonction très controversée (Rubio *et al.*, 1995; Walker *et al.*, 1996; Laurie *et al.*, 2002; Haro *et al.*, 2005). Il est pourtant le membre de la famille qui a été le plus étudié (plus d'une dizaine d'articles en 2002, dont 1 dans Nature et 2 dans Science).

En 2005, plus personne au Laboratoire ne travaille sur le transport de Na⁺ et les mécanismes de résistance au stress salin. Mon équipe regrette que cette thématique soit abandonnée dans l'UMR. D'autre part, elle souhaite commencer à développer des études sur le riz, une espèce agronomique majeure en plein essor au niveau de la recherche internationale, chez laquelle de nombreux outils de génomiques deviennent disponibles, en particulier à Montpellier grâce au CIRAD et à l'IRD. Je suis intéressée par l'analyse des mécanismes de tolérance au stress salin chez les plantes, un sujet sur lequel j'ai déjà travaillé à deux reprises, avec Pierre Berthomieu et lors de mon premier post-doc à York (Véry *et al.*, 1998). C'est l'occasion pour moi de reprendre le travail sur les HKT. Le riz qui compte neuf HKT, contrairement à *Arabidopsis* qui n'en a qu'un, apparaît comme un très bon modèle pour progresser dans l'étude de ces systèmes.

2. Données bibliographiques

2.1. Rôles de K⁺ et Na⁺ dans la cellule

Les molécules constitutives des organismes vivants contiennent 25 fois plus d'atomes d'oxygène que d'atomes d'azote (Lehninger, 1975). En raison de la différence d'abondance relative de ces deux éléments, la charge électrique des bio-molécules, à pH physiologique, est globalement négative. Des cations inorganiques sont donc nécessaires pour assurer la neutralité électrique. K⁺ est le cation majoritaire dans toute cellule vivante. Chez les plantes, il peut représenter plus de 10% de la masse de matière sèche totale. Il est le principal cation impliqué dans la neutralisation des anions inorganiques, des acides organiques et des macromolécules anioniques (acides nucléiques, phospholipides...). Il est le seul cation respectant, même à forte concentration, la structure des protéines (i.e., il est moins chaotropique que les autres cations). Il est de ce fait le cation prépondérant du cytosol, où sa concentration est de l'ordre de 0.1 mole.L⁻¹.

En liaison avec son abondance dans le cytoplasme, K⁺ est impliqué dans plusieurs grandes fonctions cellulaires. Outre son rôle dans la neutralisation de la charge électrique nette des bio-molécules, il participe à la polarisation électrique de la cellule, et au contrôle du potentiel osmotique (Clarkson et Hanson, 1980). En liaison avec cette dernière fonction chez les végétaux, K⁺ est impliqué dans le contrôle de la pression de turgescence, dans l'élongation cellulaire et dans les fonctions connexes au niveau de la plante entière (e. g. ouverture des stomates, nasties,

tropismes). Enfin, K^+ joue un rôle direct ou indirect important dans la régulation d'activités enzymatiques, la synthèse des protéines, la photosynthèse et l'homéostasie du pH cytoplasmique.

Na^+ est davantage chaotropique que K^+ , et toxique à forte concentration pour l'activité cellulaire. La concentration de Na^+ dans le cytosol est maintenue à une valeur inférieure à celle de K^+ , dans les cellules animales comme dans les cellules végétales (Cheeseman, 1988). Dans les cellules animales, la concentration de Na^+ est régulée de façon étroite à une valeur proche de 10^{-2} mole. L^{-1} (Darnell *et al.*, 1990). Dans les cellules végétales, la concentration de Na^+ ne semble pas être soumise à une homéostasie aussi étroite. Lorsque la plante se développe en présence de Na^+ , le seuil au delà duquel la concentration de ce cation devient toxique dans le cytoplasme n'est pas clair. Par contre, il est important de noter que si la cellule végétale ne peut pas remplacer K^+ par Na^+ dans son cytosol, elle peut le faire, et utiliser Na^+ comme osmoticum, dans ses vacuoles.

Il est probable que l'accumulation de potassium et l'exclusion de sodium ont représenté, chez les premiers organismes vivants dans l'eau de mer, le moyen le plus direct permettant d'énergiser la membrane cellulaire (création de différences de potentiels électrochimiques de Na^+ et K^+ par rapport au milieu extérieur). Ce mode d'énergisation se retrouve dans le monde animal, mais est absent (ou marginal?) chez les végétaux supérieurs où une pompe à H^+ est le principal acteur de l'énergisation de la membrane cellulaire.

2.2. Transports de K^+ et Na^+ et résistance au sel

La salinité du sol est l'une des principales contraintes environnementales auxquelles l'agriculture moderne est confrontée. La quasi totalité des espèces cultivées est sensible au sel. Chaque année, 10 millions d'hectares de terres cultivées sont abandonnés en raison de l'accumulation de sels résultant de l'irrigation (Szabolcs, 1994).

La tolérance des plantes au sel est le résultat de processus complexes impliquant à la fois des réactions métaboliques (e.g., synthèse d'osmoprotectants) et des phénomènes de transport (Yeo, 1998). Lors d'une exposition prolongée d'une plante au sel, Na^+ est transporté via le flux de transpiration des racines vers les feuilles. Son accumulation dans le cytoplasme ou dans l'apoplasme foliaire, où il conduit à une rapide déshydratation des cellules, est létale pour la plante. Une compartimentation efficace de Na^+ dans les vacuoles est un moyen pour la plante de résister au stress salin. Cela a été récemment démontré en surexprimant des antiports Na^+/H^+ vacuolaires (Apse *et al.* 1999; Zhang et Blumwald, 2001). Les espèces chez qui la compartimentation de Na^+ dans les vacuoles est peu performante doivent faire appel à d'autres mécanismes pour résister à NaCl. La limitation de l'entrée de Na^+ dans la racine peut être l'un d'entre eux. Par ailleurs, une relation entre l'aptitude à limiter le transport de Na^+ vers les feuilles et la tolérance au sel a été établie chez plusieurs espèces. La régulation du niveau d'accumulation de Na^+ dans les parties aériennes implique plusieurs mécanismes. Le premier est l'exclusion progressive de Na^+ du symplasme le long de la voie radiale racinaire, de l'épiderme au xylème. Les vaisseaux du xylème en différenciation jouent un rôle important dans la rétention de Na^+ au niveau des apex racinaires

(Huang et Van Steveninck, 1988). Un autre mécanisme est la "ré-extraction" des ions Na^+ de la sève xylémique ascendante par un échange K^+/Na^+ au niveau du parenchyme xylémique (Kramer, 1983). Un troisième mécanisme est la réexportation, vers le bas de la plante par le phloème, du Na^+ soustrait du courant ascendant de sève brute au niveau des parties aériennes (Berthomieu *et al.*, 2003), parfois suivie d'une excrétion dans le milieu extérieur.

Alors qu'une absorption massive de Na^+ est néfaste pour la plupart des plantes cultivées, une absorption modérée de Na^+ peut être bénéfique pour la plante. Par exemple, elle permet à la plante au début d'un stress salin d'ajuster rapidement son potentiel osmotique. Egalement, dans le cas où l'absorption de K^+ est faible (faibles teneurs en K^+ dans le sol par exemple), la contribution de Na^+ à l'établissement de la pression de turgescence peut probablement être déterminante. En conclusion, l'optimisation de l'absorption de Na^+ par la plante est plus complexe que simplement minimiser l'absorption de ce cation.

Un large ensemble de données expérimentales indique que la balance entre absorption de Na^+ et absorption de K^+ joue un rôle important dans les processus de tolérance à Na^+ : une augmentation des capacités d'absorption et d'accumulation de K^+ est souvent corrélée avec une augmentation de la tolérance à Na^+ (Cf. la revue de Maathuis et Amtmann, 1999). Les flux de K^+ (absorption, compartimentation, translocation) doivent donc être analysés, conjointement à ceux de Na^+ , dans les études concernant les mécanismes de tolérance à Na^+ .

2.3. Les systèmes de transport de K^+

Des analyses sur la cinétique d'absorption de K^+ en fonction de la concentration externe de K^+ dans la racine d'orge ont abouti dans les années 60 à l'hypothèse de l'existence de deux mécanismes de transport de K^+ : un mécanisme à haute affinité saturant avec un K_M de 10-40 μM , et un mécanisme à faible affinité saturant avec un K_M proche de 10 mM (Epstein *et al.*, 1963). L'absorption à haute affinité est active (absorption de K^+ contre le gradient de potentiel électrochimique de K^+). Les données électrophysiologiques obtenues sur racines suggèrent que des symports H^+-K^+ sont responsables de ce transport de K^+ à haute affinité (Maathuis et Sanders, 1996). L'absorption à faible affinité est passive et fait intervenir des canaux.

Plusieurs familles de canaux et de transporteurs sont identifiés au niveau moléculaire chez les végétaux (Mäser *et al.*, 2001).

Les canaux Shakers. La famille la mieux caractérisée est la famille des canaux Shaker. Les canaux Shaker existent aussi chez les animaux, chez qui les premiers membres de cette famille ont été identifiés, chez les champignons et chez les bactéries. Ces canaux sont formés de quatre sous-unités, qui s'organisent autour d'un pore central. La région hydrophobe de chaque sous-unité comprend six segments transmembranaires (STM). Une boucle membranaire entre le cinquième et le sixième STM (appelée P) participe à la constitution de la paroi du pore central (Cf. rapport sur les travaux, planche 2A). Chez *Arabidopsis*, la famille Shaker compte neuf membres, chez le riz, dix membres (Pilot *et al.*, 2003). Les propriétés fonctionnelles et la localisation de l'expression de

quasiment tous les Shaker d'*Arabidopsis* sont connues. Ce sont des canaux régulés par le voltage, actifs sur la membrane plasmique. Ils sont spécialisés, pour la plupart d'entre eux, soit dans l'absorption soit dans la sécrétion de K^+ par la cellule. Ils sont très sélectifs de K^+ vis à vis de Na^+ . Des informations sur les relations structure/fonction de ces canaux existent, notamment grâce aux analyses effectuées sur leurs homologues animaux. Des études par mutagénèse ont identifié le filtre de sélectivité au sein de la boucle P (le motif TxGYG), et le siège moléculaire de la sensibilité au voltage (la série d'acides aminés chargés positivement du quatrième STM). Le rôle dans la plante de plusieurs Shaker d'*Arabidopsis* a été analysé par génétique inverse. Ces études suggèrent que ces canaux jouent un rôle important dans l'absorption de K^+ par la racine et les transports de K^+ à longue distance, par exemple, la charge en K^+ de la sève xylémique, le contrôle du flux de sève xylémique via la régulation de l'ouverture stomatique et de la transpiration, le transport de K^+ par la sève phloémienne (Véry et Sentenac, 2003). Au niveau cellulaire, ils sont importants pour la régulation du potentiel osmotique. Ils représentent dans la plupart des types cellulaires une conductance K^+ majeure en présence de concentrations millimolaires de K^+ dans l'apoplasme.

Les canaux KCO. Les KCO (ou TPK) constituent l'autre famille de canaux K^+ identifiés chez les végétaux. Ces canaux, comme les Shakers, sont très sélectifs de K^+ . Ils ne sont pas régulés par le voltage. L'activité de plusieurs d'entre eux a été repérée sur la membrane vacuolaire (Czempinski *et al.*, 2002; Frans Maathuis, communication personnelle).

Les transporteurs. Une famille d'antiports H^+/K^+ et deux familles de transporteurs, les KUP/HAK et les HKT, sont également identifiées. Les KUP/HAK forment une famille nombreuse: 13 membres chez *Arabidopsis*, 17 membres chez le riz (Véry et Sentenac, 2003). Une partie de ces transporteurs sont des systèmes à haute affinité qui fonctionnent probablement comme symport H^+-K^+ , mais certains membres de la famille semblent constituer des systèmes de transport à faible affinité. Tous ces KUP/HAK sont assez peu caractérisés au niveau fonctionnel, en raison de difficultés à les exprimer en systèmes hétérologues (quelques rares membres s'expriment dans la levure, quelques membres dans *E. coli*). Dans la plante, ils sont présents dans de nombreux types cellulaires et semblent pouvoir être rencontrés à la fois sur la membrane plasmique et sur la membrane vacuolaire.

Les transporteurs HKT. Ces transporteurs forment une famille dont le nombre de membres semble particulièrement variable selon l'espèce: 1 membre chez *Arabidopsis*, 9 membres chez le riz. Ils possèdent des homologues chez les champignons (les TRK) et chez les bactéries. Leur structure globale prédite, en se basant sur des analyses de séquence, s'apparente à celle de canaux K^+ "à 2 STM" qui existent par exemple chez les bactéries: la région hydrophobe des polypeptides HKT comprend 4 répétitions de 1 STM-1 P- 1 STM, les quatre boucles P bordant un pore central (Durell et Guy 1999). Il existe des HKT perméables à K^+ et des HKT non perméables à ce cation. Par contre, tous semblent perméables à Na^+ . Un seul HKT parmi ceux perméables à

K^+ a été caractérisé de façon détaillée. Il s'agit du premier HKT cloné chez les végétaux, TaHKT1 (du blé). La caractérisation fonctionnelle de ce transporteur dans la levure et l'ovocyte de xénope indique que ce transporteur est un système de transport de K^+ à haute affinité qui fonctionne comme un symport Na^+-K^+ (Schachtman *et al.*, 1994, Rubio *et al.*, 1995). Le rôle dans la plante de ce système de transport reste inconnu. La localisation de l'expression de ce système au niveau du cortex racinaire et le fait que le niveau de transcrits *TaHKT1* est augmenté en situation de croissance sur milieu pauvre en K^+ suggèrent que TaHKT1 pourrait jouer un rôle important dans l'absorption racinaire de K^+ à haute affinité. L'analyse de plantes transgéniques surexprimant *TaHKT1* n'a cependant pas permis de mettre en évidence un rôle de ce système dans le transport de K^+ (Laurie *et al.*, 2002).

2.4. Transporteurs HKT et résistance au sel

Comme indiqué ci-dessus, tous les transporteurs HKT caractérisés jusqu'à présent chez les végétaux sont perméables à Na^+ . Certains d'entre eux semblent exclusivement perméables à Na^+ , les autres sont également perméables à K^+ . Le rôle de ces transporteurs dans le transport *in planta* de K^+ n'a pas encore été précisé. Par contre, plusieurs études ont mis en évidence un rôle de ces systèmes dans le transport *in planta* de Na^+ (Laurie *et al.*, 2002; Berthomieu *et al.*, 2003; Ren *et al.*, 2005; Sunarpi *et al.*, 2005) et ont révélé que des HKT sont impliqués dans la tolérance des plantes à NaCl. Les données bibliographiques correspondantes sont résumées ci-dessous.

AtHKT1, l'unique membre de la famille HKT présent chez *Arabidopsis* transporte exclusivement Na^+ (Uozumi *et al.*, 2000). Son expression a été identifiée dans les tissus vaculaires de la racine et des parties aériennes, au niveau du phloème et du parenchyme xylémique (Berthomieu *et al.*, 2003; Sunarpi *et al.*, 2005). Il est actif sur la membrane plasmique (Sunarpi *et al.*, 2005). Des plantes mutantes chez qui l'activité d'AtHKT1 est nulle ou fortement réduite montrent une hypersensibilité à NaCl (Berthomieu *et al.*, 2003; Sunarpi *et al.*, 2005). Une suraccumulation de Na^+ dans les feuilles en réponse au stress salin est constatée chez ces mutants. L'origine de cette suraccumulation de Na^+ n'est pas complètement élucidée. Elle s'explique en partie par une diminution de la recirculation de Na^+ des feuilles vers la racine par le phloème (Berthomieu *et al.*, 2003). Une augmentation de l'arrivée de Na^+ dans les feuilles via la sève xylémique chez ces mutants semble également contribuer à la suraccumulation observée (Sunarpi *et al.*, 2005). AtHKT1 pourrait donc être impliqué dans la maintenance de faibles concentrations de Na^+ dans les feuilles à la fois en permettant une réabsorption du Na^+ de la sève xylémique au niveau du parenchyme bordant les vaisseaux et en chargeant en Na^+ la sève phloémienne pour permettre sa recirculation vers les racines.

Un QTL de tolérance au stress salin chez le riz a récemment été identifié comme correspondant à un membre de la famille HKT, *OsHKT8* (Ren *et al.*, 2005). Une variété de riz tolérante au sel et une variété sensible ont été croisées. Un QTL, dans la descendance F2, se traduisant par la maintenance ("homéostasie") de fortes concentrations de K^+ dans les feuilles lors

d'un stress salin, a été repéré. La cartographie de ce QTL montre qu'il s'agit d'*OsHKT8*, qui provient de la variété tolérante et confère le phénotype de maintenance de l'homéostasie potassique. *OsHKT8* est exprimé dans les tissus vasculaires des racines et des parties aériennes, principalement au niveau du parenchyme xylémique. Il transporte Na^+ exclusivement, à la fois chez la variété tolérante et la variété sensible à NaCl . Toutefois, ses capacités de transport sont supérieures chez la variété tolérante. L'analyse de la composition en Na^+ et K^+ de la sève xylémique est compatible avec l'hypothèse qu'*OsHKT8* joue un rôle dans la maintenance de l'homéostasie potassique dans les feuilles en "dessalant" la sève xylémique.

2.5. La famille HKT du riz

Comme indiqué ci-dessus, alors que la famille HKT d'*Arabidopsis* ne comprend qu'un seul gène, la famille HKT du riz en comprend neuf (Garcia-deblás *et al.*, 2003).

L'analyse des séquences polypeptidiques des transporteurs codés par ces gènes montre une divergence assez importante: à part 2 paires de transporteurs très homologues (*OsHKT3/OsHKT9* et *OsHKT1/OsHKT2* présentant respectivement 93 et 91% d'identité), le pourcentage d'identité entre les différents transporteurs se situe entre 40 et 50%. Il faut noter que deux gènes, *OsHKT2* et *OsHKT5*, ne codent probablement pas des transporteurs fonctionnels chez le cultivar séquencé par le consortium international, Nipponbare (importantes délétions ou codons stop dans l'"ORF"). Un transporteur *OsHKT2* fonctionnel est par contre identifié chez un autre cultivar (Horie *et al.*, 2001).

Quelques données concernant l'expression de ces transporteurs dans la plante sont déjà disponibles. Elles ont principalement été obtenues par RT-PCR à partir d'ARNs extraits soit de racines soit de parties aériennes (Horie *et al.*, 2001; Garcia-deblás *et al.*, 2003). Une localisation plus précise par hybridation *in situ* ou analyse de plantes transformées avec une fusion *promoteur::GUS* a été rapportée pour deux HKT, *OsHKT1* et *OsHKT8* (Golldack *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2005). L'ensemble de ces analyses indique que la localisation de l'expression est variable au sein de la famille: certains transporteurs sont exprimés plutôt dans la racine, d'autres plutôt dans la feuille. Différents types tissulaires sont concernés par leur expression: épiderme, parenchyme xylémique, phloème. De plus, les données disponibles montrent que la régulation de l'expression de ces gènes lors d'un stress salin est variable: par exemple, l'expression d'*OsHKT1* et *OsHKT2* est réprimée, celle d'*OsHKT8* activée (Horie *et al.*, 2001, Ren *et al.*, 2005).

Au niveau fonctionnel, quelques données existent aussi. Elles concernent principalement *OsHKT1*. *OsHKT1* est l'un des plus proches homologues chez le riz du premier HKT caractérisé, *TaHKT1* (du blé), qui est un transporteur de K^+ et Na^+ (*OsHKT1* et *TaHKT1* présentent 67% d'identité). *OsHKT1* a été caractérisé par trois équipes. Les résultats sont contradictoires: exprimé dans l'ovocyte de xénope, *OsHKT1* est décrit comme un système de transport cationique, peu discriminant vis à vis des différents cations alcalins (Golldack *et al.*, 2002), ou comme un transporteur très sélectif de Na^+ (Horie *et al.*, 2001). Exprimé dans la levure, il est décrit soit

comme un système de transport perméable à K^+ (Gollack *et al.*, 2002), soit comme un système de transport de Na^+ bloqué par K^+ (Garcia-deblás *et al.*, 2003). Quelques données fonctionnelles concernent d'autres HKT de riz: exprimés dans l'ovocyte de xénope, OsHKT2 semble fonctionner comme un transporteur de K^+ et Na^+ (Horie *et al.*, 2001) et OsHKT8 comme un transporteur sélectif de Na^+ (Ren *et al.*, 2005). OsHKT4, exprimé dans la levure, est décrit comme un transporteur de Na^+ à faible affinité, bloqué par K^+ (Garcia-deblás *et al.*, 2003).

En conclusion, l'ensemble des données disponibles sur la famille HKT de riz suggère qu'il existe une importante diversité au sein de la famille au niveau des propriétés fonctionnelles, de la localisation et de la régulation de l'expression. Les différents membres n'ont donc probablement pas tous le même rôle dans la plante.

3. Intérêt du modèle riz et de la famille HKT du riz pour le projet

Le riz a été choisi comme espèce modèle des monocotylédones, au niveau international, en raison de la petite taille de son génome et de la relative facilité qu'il présente à être transformé. L'important développement par la communauté internationale de ressources génomiques chez cette espèce (en particulier, génome complètement séquencé, collection d'ADNc, collections de mutants d'insertion étiquetés) en font un modèle très intéressant. Dans ce domaine, la communauté Montpellieraine, au CIRAD et à l'IRD, s'est fortement impliquée dans le développement de ce type de ressource sur le riz, et le programme que je propose bénéficie d'une collaboration avec l'équipe d'Emmanuel Guiderdoni au CIRAD. Enfin, concernant la question de la sensibilité au sel, le riz offre une grande variabilité de réponse (cultivars sensibles ou tolérants; Cf. l'article de revue de Flowers et Yeo, 1981).

Les HKT sont les seuls systèmes d'influx de Na^+ identifiés au niveau moléculaire chez les végétaux. La caractérisation du seul HKT (exclusivement perméable à Na^+) existant chez *Arabidopsis* a permis de mettre en évidence un mécanisme nouveau impliqué dans la tolérance de la plante à NaCl: la détoxification des feuilles en Na^+ par recirculation de Na^+ vers les racine via le phloème. Sept à neuf (suivant les cultivars) HKT sont présents chez le riz. Les données disponibles indiquent déjà que certains d'entre eux n'ont pas les mêmes propriétés fonctionnelles ni la même localisation tissulaire que celui d'*Arabidopsis*. Il est donc probable que la caractérisation de ces HKT mettra en évidence d'autres rôles dans la plante que celui d'AtHKT1. De nombreuses études ont porté sur le rôle toxique de Na^+ dans la plante lors d'un stress salin et l'élucidation des mécanismes de tolérance à ce stress. Le rôle de Na^+ à plus faible concentration est beaucoup moins connu. Par exemple, Na^+ peut-il être utilisé pour énergiser l'absorption active de K^+ ? Les données fonctionnelles obtenues sur TaHKT1 dans l'ovocyte de xénope et la levure semblent appuyer cette hypothèse. Toutefois, aucun indice *in planta* de ce type d'énergisation du transport de K^+ n'a été obtenu pour le moment. L'analyse du rôle dans la plante des différents HKT de riz permettra probablement de progresser à la fois dans la compréhension des mécanismes de résistance au stress salin et dans celle du rôle non toxique de Na^+ dans la plante. Enfin, le rôle des

HKT dans le transport de K^+ dans la plante reste incompris. Jouent-ils un rôle significatif dans le transport de K^+ à haute affinité? La présence d'au moins un HKT perméable à K^+ parmi les HKT de riz offre une perspective d'avancer sur cette question.

En résumé, je propose un programme de recherche sur la fonction de la famille HKT chez le riz d'une part parce qu'il me semble très opportun de développer, à Montpellier, des approches de physiologie moléculaire des transports membranaires sur le riz, maintenant que des ressources importantes existent pour cette espèce, et d'autre part parce que l'étude de la famille HKT chez le riz ouvre de nouvelles perspectives pour répondre à des questions fondamentales concernant l'interaction des transports de K^+ et Na^+ chez les plantes, en relation avec la tolérance au stress salin.

4. Projet

4.1. Objectifs et stratégies

De façon synthétique, les objectifs généraux du projet peuvent être présentés de la façon suivante:

- (i) Comprendre le fonctionnement et le rôle dans la plante des transporteurs HKT, une famille de systèmes de transport encore très peu caractérisée
- (ii) Préciser le rôle de Na^+ dans la plante, en précisant les conditions (non toxiques) dans lesquelles la plante peut transporter cet ion, éventuellement à des fins d'énergisation du transport de K^+ , et l'utiliser en tant qu'osmoticum vacuolaire à la place de K^+
- (iii) Identifier de nouveaux mécanismes de tolérance au stress salin
- (iv) Progresser dans l'analyse du transport de K^+ à haute affinité et des interactions entre transport de K^+ et transport de Na^+

Le fait que la famille HKT chez *Arabidopsis* ne possède qu'un seul membre a été limitant pour la compréhension des rôles que peut jouer cette famille dans la plante. La famille HKT semble exceptionnellement restreinte chez *Arabidopsis*: plusieurs HKT dans le génome sont identifiés chez différentes espèces, aussi bien chez les monocotylédones que les dicotylédones (Garcia-deblás *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2003; Véry et Sentenac, 2003). Le riz, qui possède neuf gènes HKT apparaît comme un meilleur modèle pour appréhender la signification de la diversité au sein de ces transporteurs et leurs rôles chez les végétaux.

La stratégie que je propose est:

- (i) de développer une approche de biologie intégrée, en étudiant de façon systématique les différents HKT de riz et en combinant de façon classique: la caractérisation fonctionnelle des transporteurs à l'aide des techniques d'électrophysiologie, l'étude de leur expression au niveau tissulaire et sub-cellulaire, et la caractérisation phénotypique de mutants perte de fonction,

(ii) de mettre en œuvre des collaborations dans les domaines où nous manquons d'expertise et de moyens, c.a.d. principalement les approches de génétique sur le riz (production de lignées transgéniques pour les études d'expression, purification de mutants perte de fonction).

4.2. Positionnement du projet au niveau international, groupes concurrents et atouts de notre équipe

Depuis le clonage du premier membre de la famille HKT chez le blé, publié par le groupe de Julian Schroeder dans la revue *Nature* (Schachtman et Schroeder, 1994), sa caractérisation initiale comme transporteur à haute affinité de type symport H^+-K^+ , suivie d'une analyse plus détaillée faisant apparaître une perméabilité à Na^+ et une activité compatible avec l'hypothèse d'un symport Na^+-K^+ publiée dans la revue *Science* (Rubio *et al.*, 1995), la famille HKT est l'objet d'un intérêt croissant de notre communauté scientifique, pour deux raisons: (i) l'intérêt fondamental que représente la compréhension du mode de fonctionnement, en tant que tel, de ces systèmes de transport, et (ii) le rôle important que ces systèmes peuvent jouer dans l'homéostasie potassique (Ren *et al.*, 2005) et sodique (Berthomieu *et al.*, 2003) de la plante et la tolérance au stress salin. Outre l'équipe de Julian Schroeder qui travaille (pour une partie) encore sur la famille HKT, les autres groupes concurrents sont japonais (groupes de Kazuya Yoshida et Nobuyuki Uozumi: Horie *et al.*, 2001; Uozumi *et al.*, 2000; Sunarpi *et al.*; 2005), américain (groupe de Hans Bohnert; Su *et al.*; 2003), australien (groupe de Mark Tester; Cf. bourses "2006 Honour Opportunities" proposées par l'"Australian Center for Plant Genomics"), espagnol (groupe d'Alonso Rodriguez-Navarro; Garcideblás *et al.*, 2003; Haro *et al.*, 2005), et plus récemment chinois (groupe de Hong-Xuan Lin; Ren *et al.*, 2005).

L'étude de la famille des canaux potassiques Shaker, depuis plus d'une dizaine d'années, montre bien que ce type d'analyse moléculaire et fonctionnelle des transports membranaires chez les plantes représente un domaine d'investigation suffisamment vaste pour permettre l'implication de nombreuses équipes de recherche, en concurrence ou en collaboration.

Pour conduire ce projet, je bénéficie actuellement de l'implication d'un Doctorant, Mehdi Jebnoun, dans le cadre d'une thèse en co-tutelle et d'une collaboration avec l'Université de Tunis (Pr. Chedly Abdely, INRST).

J'ai également établi une collaboration très profitable à Montpellier avec l'équipe d'Emmanuel Guiderdoni (CIRAD), qui nous aide d'ores et déjà pour l'isolement des lignées de riz perte de fonction pour les gènes *HKT*, et qui pourrait s'impliquer directement dans la production de lignées transgéniques exprimant différentes constructions (par exemple, gènes rapporteurs chimériques promoteur *HKT::GUS*).

Enfin, j'ai établi une collaboration avec l'équipe d'Alonso Rodriguez-Navarro (Université Polytechnique de Madrid) qui nous a fourni les ADNc de certains HKT de riz en vue de leur caractérisation fonctionnelle. En parallèle, nous assurons pour ce groupe la caractérisation électrophysiologique dans l'ovocyte de xénope de différents variants d'un HKT d'orge.

Outre ces collaborations, un atout majeur dont je dispose pour progresser dans le programme que je propose sur les transporteurs HKT de riz est mon expérience personnelle dans le domaine des analyses électrophysiologiques et fonctionnelles. Les données disponibles dans ce domaine à ce jour sont encore clairement insuffisantes et parfois contradictoires (Horie *et al.*, 2001; Gollmack *et al.*, 2002; Garciadeblás *et al.*, 2003). A court terme, je donne la priorité à ce type d'analyse. L'objectif sera de progresser dans la compréhension du fonctionnement des transporteurs HKT (par exemple dans l'analyse et la modélisation de l'énergisation des éventuels transporteurs à haute affinité de K^+) et d'identifier précisément les différents types fonctionnels. L'obtention de ce type d'information constitue une condition préalable à l'analyse précise de la fonction de ces transporteurs dans la plante.

4.3. Caractérisation fonctionnelle

4.3.1. Caractérisation fonctionnelle en système hétérologue

Cette partie du projet est démarrée depuis un an.

L'analyse de la bibliographie sur la caractérisation fonctionnelle de transporteurs HKT provenant de différentes espèces végétales indique que ces systèmes de transport semblent de façon générale bien s'exprimer dans l'ovocyte de xénope. Nous avons donc choisi de tenter la caractérisation des HKT de riz dans ce système d'expression.

Données acquises:

Avec Mehdi Jebnoun (Doctorant que j'encadre, Cf. ci-dessus § 4.2), nous avons déjà recueilli l'ensemble des ADNc codant les HKT du cultivar Nipponbare (fournis par le groupe d'Alonso Rodriguez-Navarro à Madrid, ou commandés au "Rice Genome Ressource Center" au Japon) et commencé le sous-clonage de ces ADNc dans un vecteur optimisé pour l'expression dans l'ovocyte de xénope. *OsHKT1*, *OsHKT3*, *OsHKT4* et *OsHKT6* sont sous-clonés, ils ont été transcrits *in vitro* et la caractérisation dans l'ovocyte par la technique du voltage clamp à deux électrodes des transporteurs produits est en cours.

L'expression d'*OsHKT1*, *OsHKT4* et *OsHKT6* dans l'ovocyte induit des courants clairement différents de ceux observés sur des ovocytes témoins. Par contre, les premières expériences sur *OsHKT3* ne permettent pas de certifier que ce transporteur est fonctionnel dans l'ovocyte. Si l'impossibilité de caractériser ce système de transport dans l'ovocyte se confirme, nous tenterons de le caractériser dans un autre système d'expression hétérologue, animal ou végétal, utilisé dans l'équipe: par exemple les cellules COS ou les protoplastes de mésophylle de tabac (Cf. Mouline *et al.*, 2002; Hosy *et al.*, 2005).

De façon intéressante, *OsHKT1*, *OsHKT4* et *OsHKT6* montrent des propriétés fonctionnelles très différentes (Figure 1). *OsHKT1* semble perméable à la fois à K^+ et à Na^+ . Il permet un influx et un efflux d'ions. Le transport de Na^+ à travers ce système est fortement bloqué par la présence de

K^+ dans le milieu externe. OsHKT4 n'est perméable qu'à Na^+ , et c'est un système d'influx exclusivement. Il faut noter que c'est le premier système de transport rectifiant identifié dans la famille HKT. D'autre part, en accord avec les données rapportées sur ce système après expression dans la levure (Garcia-deblás *et al.*, 2003), nous observons qu'OsHKT4 transporte Na^+ avec une affinité nettement plus faible que celle des autres HKT caractérisés jusqu'à présent. OsHKT6, comme OsHKT4 transporte Na^+ uniquement, mais contrairement à OsHKT4, il permet à la fois un influx et un efflux de Na^+ . Contrairement à OsHKT1, OsHKT6 est insensible à la concentration externe de K^+ . La mise en évidence de cette importante diversité fonctionnelle chez trois HKT de riz est particulièrement intéressante pour la suite du projet. Elle offre en particulier un cadre très valorisant pour des analyses électrophysiologiques et fonctionnelles détaillées.

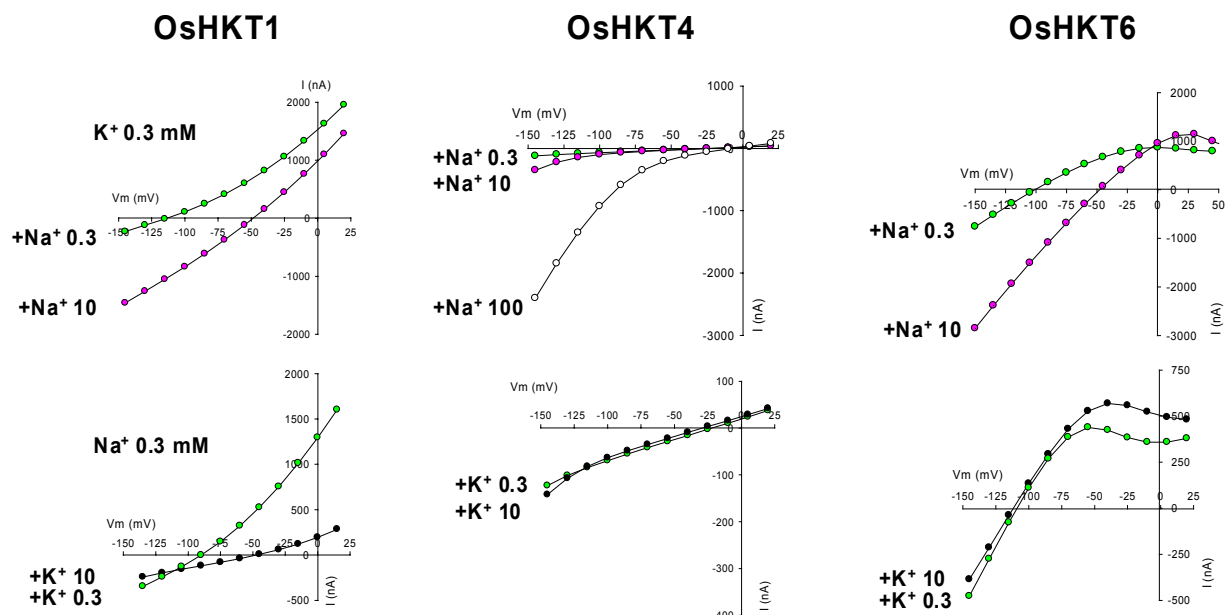


Figure 1: La caractérisation dans l'ovocyte de xénope de trois HKT de riz montre une importante diversité fonctionnelle

Les ARNc des trois transporteurs, transcrits *in vitro*, sont injectés dans les ovocytes de xénope. La caractérisation des propriétés fonctionnelles des transporteurs produits par l'ovocyte est effectuée un à deux jours après l'injection, à l'aide de la technique du voltage-clamp à deux électrodes. Les solutions expérimentales baignant les ovocytes contiennent $MgCl_2$ 6 mM, $CaCl_2$ 1,8 mM, Mes 10 mM, mannitol 240 mM, et des concentrations variables de K-glutamate et Na-glutamate (0,3,10 ou 100 mM). Le pH est ajusté à 5,5 avec du BTP. Dans les panneaux du haut, la concentration de K^+ est fixée à 0,3 mM, dans les panneaux du bas la concentration de Na^+ est fixée à 0,3 mM.

OsHKT1 est perméable à Na^+ et K^+ . C'est un système d'influx et d'efflux. OsHKT4 et OsHKT6 sont perméables à Na^+ seulement. OsHKT4 est un système d'influx uniquement, OsHKT6 permet l'influx et l'efflux de Na^+ .

Poursuite du programme: caractérisation systématique des HKT de riz

Le programme que je propose prévoit la caractérisation fonctionnelle systématique de tous les membres de la famille (incluant la poursuite de la caractérisation d'OsHKT1, OsHKT4 et OsHKT6).

La caractérisation comprendra pour chacun des transporteurs une analyse détaillée des propriétés de conduction. A quels ions sont-ils perméables: sont-ils bien tous perméables à Na^+ ? Lesquels sont perméables à K^+ ? Existe-t-il d'autres ions que ces systèmes peuvent transporter (H^+ , Ca^{2+} ...)? Dans quel sens les ions peuvent-ils être transportés: dans les deux sens, entrant et sortant, ou dans l'un des deux sens seulement? Quelle est l'affinité du transport pour chacun des

ions transportés? Le cas échéant, comment se fait l'énergisation du transport à haute affinité? Chez les systèmes perméables à plusieurs ions (K^+ et Na^+ par exemple), quelles sont les interactions entre les ions perméants: y a-t-il couplage des transports? Y a-t-il inhibition du transport d'un ion perméant par l'autre? Peut-on identifier des inhibiteurs pour ces systèmes de transport (spécifique du système ou au moins de la famille)?

Les données issues de cette caractérisation seront ensuite utilisées à deux niveaux dans le développement du projet:

- (i) Elle serviront de base à l'analyse des relations structure-fonction sur ces systèmes de transport (Cf. § ci-dessous).
- (ii) Elles seront utilisées (conjointement aux données de localisation de l'expression) pour élaborer des hypothèses quant au rôle physiologique de ces transporteurs, qui permettront de guider les études phénotypiques effectuées sur les mutants perte de fonction.

4.3.2. Analyses de la relation structure-fonction des HKT

Des analyses de la relation structure-fonction seront effectuées sur ces systèmes de transport. Elles seront limitées (au moins à moyen terme) à deux questions ponctuelles: les bases moléculaires de la sélectivité ionique et l'origine de la rectification (chez OsHKT4 par exemple).

L'intérêt de ces analyses sera double:

- (i) Mieux connaître ces systèmes de transport.
- (ii) Pouvoir effectuer par la suite des prédictions sur les propriétés de membres de la famille non caractérisés en se basant sur l'analyse de leur séquence.

Quelques informations existent déjà sur les bases moléculaires de la sélectivité ionique chez les transporteurs HKT. Un premier déterminant de la sélectivité Na^+/K^+ a été identifié chez ces transporteurs (Mäser *et al.*, 2002): une glycine très conservée dans chacune des quatre boucles P est corrélée à une perméabilité à K^+ . Chez les transporteurs uniquement perméables à Na^+ , la glycine de la première boucle P est remplacée par une sérine (Figure 2). L'importance de ce résidu de la première boucle P dans la sélectivité Na^+/K^+ a été confirmée par des expériences de mutagenèse dirigée effectuées sur TaHKT1 et AtHKT1 (remplacement de la glycine en sérine chez TaHKT1 et inversement chez AtHKT1). Sur cette base, OsHKT1 qui possède une sérine à cette position, devrait être uniquement perméable à Na^+ . Nos premiers résultats ainsi que certains résultats publiés sur ce transporteur indiquent au contraire qu'OsHKT1 est également perméable à K^+ . Le résidu identifié par Mäser *et al.* n'est donc probablement pas le seul à déterminer la perméabilité à K^+ des transporteurs HKT.

Nous examinerons par mutagenèse dirigée le rôle dans la sélectivité ionique de ces transporteurs de quelques résidus voisins de celui identifié par Mäser *et al.* (dans les quatre boucles P). Le choix des résidus sur lesquels porterons nos études sera établi par l'analyse des

alignements de séquences après l'étude de la sélectivité des transporteurs sauvages disponibles. Un résidu intéressant à tester apparaît cependant d'ores et déjà: les alignements de séquence montrent que tous les transporteurs perméables à K^+ , possédant la glycine dans la première boucle P, présentent une leucine immédiatement après la glycine; les transporteurs non perméables à K^+ , possédant une sérine à la place de la glycine, présentent une méthionine immédiatement après la sérine (Figure 2). OsHKT1, qui est perméable à K^+ mais qui possède une sérine à la place de la glycine présente une leucine immédiatement après la sérine. Le rôle de cette leucine dans la perméabilité potassique d'OsHKT1 sera examiné.

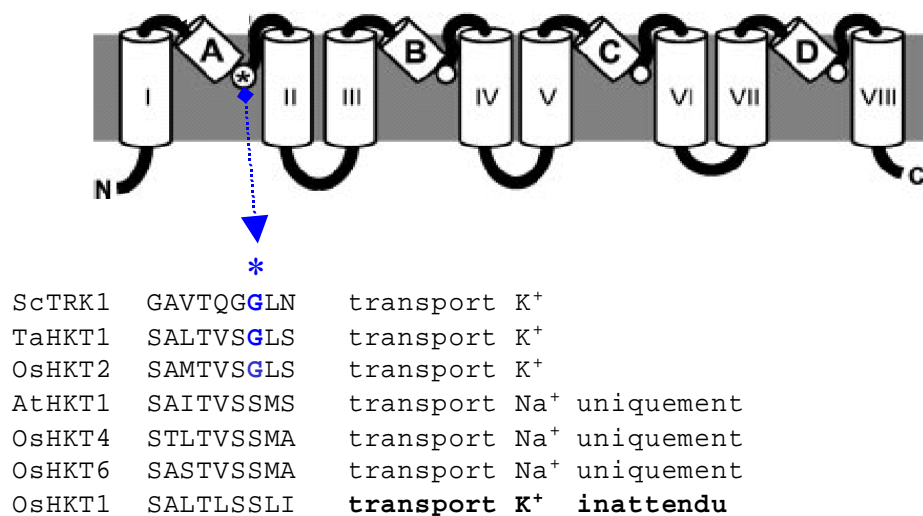


Figure 2: Déterminants moléculaires de la perméabilité à K^+ chez les HKT.

L'hypothèse que la présence d'une glycine à la position indiquée par le symbole * dans la première boucle pore détermine la perméabilité à K^+ des transporteurs HKT/TRK a été proposée par Mäser *et al.* (2002). Nos résultats montrent qu'OsHKT1, qui possède une sérine au lieu d'une glycine à cette position est pourtant perméable à K^+ , ce qui suggère que d'autres déterminants moléculaires que celui identifié par Mäser *et al.* peuvent être responsables de la perméabilité à K^+ chez les HKT.

L'étude des bases moléculaires de la rectification sera basée sur le même principe: i.e., la caractérisation préalable d'un maximum de membres pour identifier les types fonctionnels (les transporteurs qui rectifient et ceux qui ne rectifient pas) et les causes probables de la rectification, puis des alignements de séquence pour faire émerger des hypothèses moléculaires à tester. Les données actuelles ne permettent pas raisonnablement de faire des hypothèses quant aux bases moléculaires de la rectification de ces systèmes, un seul membre rectifiant ayant été identifié pour le moment. La seule hypothèse vraisemblable que nous pouvons faire, c'est que les bases moléculaires de la rectification sont différentes chez les HKT de celles des canaux K^+ Shaker: il n'y a pas de segment transmembranaire homologue au segment senseur de voltage des Shaker chez les HKT.

4.3.3. *Electrophysiologie in planta*

L'activité des HKT de riz sera recherchée *in planta* dans les cellules où ils sont exprimés. Cette étude sera effectuée à l'aide de la technique du patch clamp sur des protoplastes issus de ces cellules (le cas échéant sur des membranes vacuolaires provenant de ces protoplastes; Cf. § "localisation subcellulaire" ci-dessous). L'identification de l'activité de chaque transporteur se fera en comparant les courants enregistrés sur des plantes sauvages avec ceux enregistrés sur des lignées mutantes perte de fonction (Cf. par exemple Mouline *et al.*, 2002 où j'ai procédé à ce type d'analyse pour étudier l'activité d'un canal Shaker d'*Arabidopsis*). Je commencerai cette étude par les HKT exprimés dans des tissus pour lesquels l'obtention de protoplastes et l'identification de leur provenance sont aisés: c'est le cas d'OshKT1, par exemple, qui est fortement exprimé dans l'épiderme racinaire. A plus long terme, la caractérisation *in planta* des OshKT exprimés dans des tissus posant problème pour l'obtention de protoplastes (les tissus vasculaires par exemple: parenchyme xylémique, phloème, ...) pourra être envisagée en faisant appel à une stratégie de marquage du tissu d'intérêt à la GFP: expression d'une construction *promoteur HKT::GFP* si le promoteur *HKT* permet une expression suffisante, sinon utilisation d'un promoteur plus fort induisant le même patron d'expression (Ivashikina *et al.*, 2003).

De façon générale, l'analyse de l'activité des HKT dans leur membrane native permettra de répondre aux questions suivantes:

- (i) Quelle est la part des HKT dans le courant cationique total de la cellule où ils sont exprimés? Représentent-ils la seule conductance Na^+ de ces cellules, la conductance Na^+ majoritaire? Leur activité de transport de K^+ (le cas échéant) est-elle significative comparée à celle des autres canaux/transporteurs perméables à K^+ de la cellule? Comment varie l'activité de ces HKT et celle des autres systèmes de transport de Na^+ et K^+ , en fonction des conditions de culture des plantes (stress salin, carence en K^+ par exemple)?
- (ii) Les propriétés fonctionnelles de ces HKT *in planta* sont-elles bien, dans leur grandes lignes, celles attendues après caractérisation de ces transporteurs dans les systèmes d'expression hétérologue? Des études récentes suggèrent en effet que l'activité *in planta* de certains HKT pourrait être différente de celle observée dans la levure et l'ovocyte: par exemple, il est possible que TaHKT1 ne transporte pas de façon significative K^+ dans la racine de blé (Haro *et al.*, 2005).

L'activité de transporteurs HKT n'a jamais été mise en évidence *in planta*. La disponibilité chez le cultivar Nipponbare de lignées d'insertion dans plusieurs gènes *HKT* (à l'heure actuelle dans six gènes; Cf. § ci-dessous "caractérisation de mutants perte de fonction") est un atout important pour ce type d'analyses.

4.4. Localisation subcellulaire

La connaissance de la localisation subcellulaire des transporteurs HKT est essentielle pour la compréhension de leur rôle dans la plante. Elle nous sera également très utile pour guider les analyses électrophysiologiques de l'activité des transporteurs *in planta* (Cf § ci-dessus).

Pour le moment, la localisation de deux HKT a été mise en évidence sur la membrane plasmique: il s'agit d'AtHKT1 et de McHKT1 (Sunarpi *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2003). Il n'est pas exclu que d'autres HKT soient actifs sur d'autres membranes, comme par exemple la membrane vacuolaire.

L'étude de la localisation subcellulaire des HKT de riz se fera par marquage des transporteurs à la GFP. Nous utiliserons pour cette étude une stratégie dont nous avons l'habitude dans l'équipe pour l'analyse de la localisation subcellulaire des canaux Shaker (Hosy *et al.*, 2005). Cette stratégie est basée sur l'utilisation de protoplastes de mésophylle de tabac comme système d'expression transitoire, et sur le recours à deux approches indépendantes. D'une part, des protoplastes sont transformés avec l'ADNc fusion *HKT::GFP* (inséré derrière un promoteur fort) et la localisation subcellulaire de la protéine fusion produite est analysée par microscopie confocale. D'autre part, des expériences de patch-clamp sont effectuées sur des protoplastes exprimant le même transporteur non fusionné à la GFP mais co-exprimé avec la GFP comme marqueur de transformation (Hosy *et al.*, 2005). La vérification par patch-clamp de la localisation subcellulaire obtenue par microscopie confocale permet de s'affranchir des artefacts possibles lors d'une surexpression de protéines en fusion avec la GFP.

4.5. Analyse de la fonction des HKT dans la plante

4.5.1. Localisation tissulaire et régulation de l'expression

L'identification de la localisation tissulaire de l'expression des HKT est indispensable pour notre projet. Cette information sera utilisée conjointement à celle de la localisation subcellulaire et aux données fonctionnelles pour élaborer des hypothèses sur le rôle que jouent ces systèmes de transport dans la plante.

L'analyse de la localisation tissulaire de l'expression de ces systèmes se fera à l'aide d'une stratégie "gène rapporteur" (i.e., construction de plantes transgéniques exprimant le gène rapporteur *GUS* en fusion avec le promoteur du gène du transporteur et révélation histochimique de l'activité *GUS*), profitant du fait que la séquence des promoteurs est disponible. Nous bénéficierons de l'aide directe du groupe d'Emmanuel Guiderdoni (à Montpellier au CIRAD) pour préparer les lignées de riz transgéniques exprimant les gènes rapporteurs.

Des études visant à examiner l'effet des conditions de culture (teneur en K^+ , stress salin) sur la localisation de l'expression et sur le niveau d'expression des HKT seront effectuées. Elles donneront des informations précieuses pour l'analyse du rôle de ces systèmes dans la nutrition K^+ de la plante et sa réponse au stress salin. On sait déjà que l'expression de tous les *HKT* de riz

n'est pas régulée de la même manière par le sel. L'analyse des éventuels changements de patron de localisation de l'expression en réponse aux changements de conditions de culture se fera sur les lignées transformées "GUS". L'analyse des variations du niveau d'expression sera effectuée par northern blots ou RT-PCR quantitative à partir d'ARNs de racines et de feuilles.

4.5.2. Caractérisation de mutants perte de fonction

Les hypothèses sur le rôle de ces systèmes, émises sur la base des données fonctionnelles et de localisation, seront testées en effectuant des analyses phénotypiques comparatives, sur des plantes sauvages et des mutants perte de fonction.

Cette partie du projet est déjà initiée, en collaboration avec le groupe d'Emmanuel Guiderdoni. J'ai recherché des mutants d'insertion pour chacun des gènes *HKT* dans les collections existantes. Des insertions dans six gènes *HKT* ont été trouvées dans une collection de lignées mutantes par insertion de transposons *Tos17*, gérée au NIAS au Japon (Miyao *et al.*, 2003).

Avec Mehdi Jebnoun (doctorant que j'encadre dans l'équipe, *Cf.* ci-dessus), nous avons commandé dans la collection du NIAS des lignées mutantes pour trois des gènes *HKT* pour lesquels nous avons déjà démarré les analyses fonctionnelles par expression dans l'ovocyte, *OsHKT1*, *OsHKT3* et *OsHKT4* (*Cf.* ci-dessus). Il faut noter qu'il n'existe pas de mutant pour le moment pour le quatrième *HKT* (*HKT6*), que nous avons commencé à caractériser dans l'ovocyte. Trois lignées d'insertion par gène ont été commandées, pour permettre éventuellement de débiter la caractérisation phénotypique avant élimination complète des transposons surnuméraires.

Pour la culture des mutants et leur purification (par rétrocroisements successifs), nous sommes aidés par le groupe d'Emmanuel Guiderdoni: nous profitons de leurs installations et de leur savoir faire dans ce domaine (Sallaud *et al.*, 2004). Nous avons entrepris le génotypage des plantes issues des grains envoyés par le NIAS (descendance F2 ou F3 obtenue par autofécondation de la lignée étiquetée).

Les plantes sauvages et les mutants d'insertion (purifiés ou partiellement purifiés; *Cf.* ci dessus) seront soumis à différentes conditions de culture (standard, carence en K^+ , stress salin) et leur phénotype analysé en termes de:

- (i) capacité à réaliser un cycle de reproduction et croissance (production de biomasse foliaire et racinaire) en fonction de la concentration de K^+ et Na^+ dans le milieu,
- (ii) teneur des tissus/organes en ions K^+ et Na^+ ,
- (iii) concentration des sèves xylémiennes et phloémiennes en Na^+ et K^+ .

4.6. Conclusion

Mon projet concerne une famille de transporteurs (les *HKT*) susceptibles de jouer des rôles importants dans l'homéostasie potassique et sodique de la plante. Les *HKT* représentent les seuls

systèmes d'influx de Na^+ et l'une des deux familles de transporteurs de K^+ identifiés au niveau moléculaire chez les végétaux.

Après l'identification du premier membre de la famille (TaHKT1) chez le blé, de nombreux groupes travaillant sur le transport de K^+ ou l'adaptation au stress salin chez les végétaux se sont rapidement intéressés à ces transporteurs qui s'exprimaient bien dans les systèmes d'expression hétérologue classiques (levure, ovocyte de xénope), et semblaient présenter, au moins pour certains d'entre eux, des propriétés de transport inattendues (perméabilité à K^+ et Na^+ avec couplage des deux transports). Toutefois, le fait qu'un certain nombre de ces groupes n'étaient pas spécialistes de l'électrophysiologie et/ou des systèmes d'expression hétérologue, a abouti à la production de caractérisations fonctionnelles souvent sommaires et quelquefois contradictoires, ce qui a handicapé l'appréhension du rôle de ces systèmes dans la plante. Un autre handicap jusqu'à récemment était qu'il n'y a qu'un seul membre dans la famille HKT d'*Arabidopsis*, ce qui limitait fortement les possibilités d'étude de ces systèmes par des approches génétiques.

Le développement récent d'outils moléculaires et génétiques chez le riz, et le fait que la famille HKT de riz est beaucoup plus fournie que celle d'*Arabidopsis* (neuf gènes au lieu d'un), font de cette espèce un modèle très intéressant pour l'étude du fonctionnement et du rôle de ces systèmes dans la plante.

Mon projet fait appel à une approche de biologie intégrée sur la famille des HKT de riz: analyses fonctionnelles, étude de l'expression, caractérisation de mutants perte de fonction. J'ai noué des collaborations, notamment locales, pour me permettre de mener à bien les parties de mon projet sur lesquelles je manque pour le moment d'expertise ou de moyens, c'est à dire essentiellement les aspects de génétique sur le riz. Toutefois, je souhaite mettre l'accent, au moins à moyen terme sur la caractérisation fonctionnelle de ces systèmes: seule une caractérisation détaillée permettra de comprendre leur fonctionnement. Je fais le pari qu'une connaissance approfondie des propriétés fonctionnelles de ces systèmes sera un atout majeur dans le cadre d'une compétition internationale pour la compréhension du rôle de ces systèmes dans la plante.

Je considère donc que l'expérience que j'ai acquise en électrophysiologie rend pertinente ma volonté de promouvoir ce projet. Cette opinion est confortée par la diversité fonctionnelle que j'ai déjà observée chez 3 HKT après expression dans l'ovocyte de xénope, et les hypothèses de travail que cette diversité permet d'avancer. Ce projet devrait fournir une meilleure compréhension des mécanismes de transport membranaire de K^+ et Na^+ , de l'homéostasie potassique et sodique, et finalement de l'adaptation des plantes au stress salin. Enfin, en termes de formation d'étudiants en master et thèse, je considère que ce projet offre un cadre très propice à l'acquisition de connaissances théoriques et pratiques dans différentes disciplines complémentaires, biologie et physiologie moléculaire, biophysique, pour une approche de biologie intégrée.

Références

- Apse MP *et al.*, 1999. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285: 1256-1258.
- Berthomieu P *et al.*, 2003. Functional analysis of AtHKT1 in *Arabidopsis* shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBO J.* 22: 2004-2014.
- Cheeseman JM, 1988. Mechanism of salinity tolerance in plants. *Plant Physiol.* 87: 547-550.
- Clarkson DT, Hanson JB, 1980. The mineral nutrition of higher plants. *Annu Rev. Plant Physiol.* 31: 239-298.
- Czempinski K *et al.*, 2002. Vacuolar membrane localization of the *Arabidopsis* 'two-pore' K⁺ channel KCO1. *Plant J.* 29: 809-820.
- Darnell JE *et al.*, 1990. *Molecular cell biology*. Scientific American Books: distributed by WH Freeman, New York.
- Durell SR, Guy HR, 1999. Structural models of the KtrB, TrkH, and Trk1,2 symporters based on the structure of the KcsA K⁺ channel. *Biophys. J.* 77: 789-807
- Epstein E *et al.*, 1963. Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. *PNAS* 49: 684-692.
- Flowers TJ, Yeo AR, 1981. Variability in the resistance of sodium chloride salinity within rice (*Oryza sativa* L.) varieties. *New Phytol.* 88: 363-373.
- Garciadeblás B *et al.*, 2003. Sodium transport and HKT transporters: the rice model. *Plant J.* 34: 788-801.
- Golldack D *et al.*, 2002. Characterization of a HKT-type transporter in rice as a general alkali cation transporter. *Plant J.* 31: 529-542.
- Haro R *et al.*, 2005. HKT1 mediates sodium uniport in roots. Pitfalls in the expression of HKT1 in yeast. *Plant Physiol.* 139: 1495-1506.
- Horie T *et al.*, 2001. Two types of HKT transporters with different properties of Na⁺ and K⁺ transport in *Oryza sativa*. *Plant J.* 27: 115–128.
- Hosy E *et al.*, 2005. A procedure for localisation and electrophysiological characterisation of ion channels heterologously expressed in a plant context. *Plant Methods* 1: 14.
- Huang CX, Van Steveninck RFM, 1988. Effect of moderate salinity on patterns of potassium, sodium, and chloride accumulation in cells near the root tip of barley: role of differentiating metaxylem vessels. *Physiol. Plant.* 73: 525-533.
- Ivashikina N *et al.*, 2003. Isolation of AtSUC2 promoter-GFP-marked companion cells for patch-clamp studies and expression profiling. *Plant J.* 36: 931-945.
- Kramer D, 1983. the possible role of transfer cells in the adaptation of plants to salinity. *Physiol. Plant.* 58: 549-555.
- Laurie S *et al.*, 2002. A role for HKT1 in sodium uptake by wheat roots. *Plant J.* 32: 139-149.
- Lehninger AL, 1975. *Biochemistry; the molecular basis of cell structure and function*. Worth Publishers, New York.
- Maathuis FJM, Amtmann A, 1999. K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: The basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios. *Ann. Bot.* 84: 123-133.

- Maathuis FJM, Sanders D, 1996. Mechanisms of potassium absorption by higher plant roots. *Physiol. Plant.* 96: 158-168.
- Mäser P *et al.*, 2001. Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126: 1646-1667.
- Mäser P *et al.*, 2002. Glycine residues in potassium channel-like selectivity filters determine potassium selectivity in four-loop-per-subunit HKT transporters from plants. *PNAS* 99: 6428-6433.
- Mouline K *et al.*, 2002. Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K⁺ channel in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 16: 339-350.
- Pilot G *et al.*, 2003. Five-group distribution of the Shaker-like K⁺ channel family in higher plants. *J. Mol. Evol.* 56: 418-434.
- Ren ZH *et al.*, 2005. A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nature Genet.* 37: 1141-1146.
- Rubio F *et al.*, 1995. Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science* 270: 1660-1663.
- Schachtman DP, Schroeder JI, 1994. Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* 370: 655-658.
- Su H *et al.*, 2005. Expression of the cation transporter McHKT1 in a halophyte. *Plant mol. Biol.* 52: 967-980.
- Sunarpi *et al.*, 2005. Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na⁺ unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Plant J.* 44: 928-938.
- Szabolcs I, 1994. Soils and salinisation. In M. Pessarak eds, *Plant and crop stress*. New York-Basel-Hong Kong: 3-11.
- Uozumi N *et al.*, 2000. The *Arabidopsis* HKT1 gene homolog mediates inward Na⁺ currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol.* 122: 1249-1259.
- Véry A-A *et al.*, 1998. Guard cell cation channels are involved in Na⁺-induced stomatal closure in a halophyte. *Plant J.* 14: 509-521.
- Véry A-A, Sentenac H, 2003. Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 575-603.
- Walker NA *et al.*, 1996. High-affinity potassium uptake in plants. *Science* 273: 977-979.
- Yeo A, 1998. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *J. Exp. Bot.* 49: 915-929.
- Zhang H-X, Blumwald E, 2001. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat. Biotech.* 19: 765-768.