



HAL
open science

LES CANAUX ANIONIQUES DE LA MEMBRANE PLASMIQUE CHEZ ARABIDOPSIS THALIANA: CARACTÉRISATION FONCTIONNELLE ET MISE EN PLACE D'OUTILS POUR L'IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE

Jean Colcombet

► **To cite this version:**

Jean Colcombet. LES CANAUX ANIONIQUES DE LA MEMBRANE PLASMIQUE CHEZ ARABIDOPSIS THALIANA: CARACTÉRISATION FONCTIONNELLE ET MISE EN PLACE D'OUTILS POUR L'IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Pierre et Marie Curie, 2001. Français. NNT : . tel-04374112

HAL Id: tel-04374112

<https://hal.inrae.fr/tel-04374112>

Submitted on 5 Jan 2024

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.

**Université Pierre et Marie Curie
U.F.R. Sciences de la Vie**

THÈSE

présentée pour obtenir
**Le GRADE de DOCTEUR EN SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ de PARIS VI
PIERRE ET MARIE CURIE**

Par
Jean COLCOMBET

Sujet
**LES CANAUX ANIONIQUES DE LA MEMBRANE PLASMIQUE
CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA*:
CARACTÉRISATION FONCTIONNELLE ET MISE EN PLACE
D'OUTILS POUR L'IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE**

Soutenue le 7 décembre 2001

Devant les MEMBRES du JURY:

**Cyrille FORESTIER
Jean-Marie FRACHISSE
Alain GOJON
Enrico MARTINOIA
Emile MIGINIAC
Ken TAKEDA**

*Rapporteur
Directeur de thèse*

*Rapporteur
Président*

Remerciements

Je tiens à remercier tous ceux qui ont fait que ces trois années de thèse ont été pour moi des années enrichissantes à la fois scientifiquement et humainement. Ma reconnaissance va au delà de ces quelques traditionnelles phrases et je regrette que cette soutenance à venir soit synonyme de départ de ce groupe de personnes.

Merci tout d'abord à Jean Guern puis à Hélène Barbier-Brygoo pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe. Je les remercie tous les deux pour m'avoir épaulé puis accompagné durant ces 4 années. Jean Guern m'a fait profiter de ses vastes connaissances et je garde un excellent souvenir des discussions que nous avons eues. Je remercie Hélène de m'avoir convaincu que la recherche était un domaine dans lequel je me plirai. Merci pour sa gentillesse, sa bonne humeur, ses conseils et sa disponibilité, ainsi que pour le gigot de sept heures et le Montbazillac.

Au quotidien, j'ai beaucoup travaillé avec Jean-Marie Frachisse. Je le remercie pour m'avoir conseillé, pondéré et efficacement canalisé (normal!) dans mon travail quotidien, pour avoir passé son HDR et supporté mes mauvaises humeurs.

Je remercie Françoise "Corleone" pour sa percutante bonne humeur, sa compétence et son acharnement, pour ses 3 filles, ses commentaires sur ma tisane irakienne et ma coupe de cheveux, les tornades blanches sur ma (mes) paillasse(s), les bonbons Mentos, sa franchise et sa sagesse.

Merci aussi à Sébastien, collègue, copain, coauteur et correspondant américain, pour ce qu'il m'a appris (beaucoup), son ouverture d'esprit mais aussi le jogging (demain), l'Ernest Rémy et le gâteau à la banane.

Merci à Armen, réductrice d'entropie dans le cahot du labo d'électrophy. Je regrette son départ peu après mon arrivée, et espère avoir encore de nombreuses occasions de manger des feuilles de vigne farcies en sa compagnie.

Je lève un verre (d'ApfelSchorle) à ma cothésarde Marion pour m'avoir emmené à la chasse aux canaux dans les champs de patates de Golm. Nous sommes hélas revenus bredouille mais l'exil soude les amitiés et j'espère que la nôtre durera au delà des CLCs et des kilomètres. Je lève un verre (et pas d'eau!) à Anne, ses bactéries incompetentes, son PEG récalcitrant, ses avis tranchés et sa joyeuse compagnie.

Et merci à tous les autres, sans qu'aucunes choses n'auraient pu être telles qu'elles ont été (c'est à dire biens): la famille des "stressés osmotiques", les "CLC girls", le groupuscule "ABIS-JPG-RTV*" et les exilés de Montpellier. Un remerciement particulier pour Blandine et ses dossiers dans lesquels je retrouve ce que j'ai perdu... * "Range Ton Verre..."

Au sein de l'ISV, merci à ceux qui m'ont aidé. Amitiés à mes collègues de RER, avec qui j'ai baillé à l'allée et couru au retour.

J'ai une pensée reconnaissante pour ceux qui ont infléchi mon parcours étudiantin vers le jardinage, dans l'ordre d'apparition: ma grand mère et mes parents, Solange Lavigne et Gaston Pic, Geneviève Ephréthikine et Claudie Isnard, puis, toutes les personnes déjà citées plus haut...

Enfin je remercie particulièrement Elise, Mondane, François et Thomas, tous les quatre victimes du protocole et anormalement sédimentés en fin de page.

Je remercie les différentes personnes qui ont répondu à mes mails et m'ont fourni, qui souches, qui constructions, qui solutions: Thomthom et Fredo pour la résolution d'équations, Richard Baerends pour la série de plasmides pHIPXx et les souches d'Hansenula, Roberto Gaxiola pour les CLC0, a, c et d, Alfred George pour le CLC1, Nigel Crawford pour les souches de Pichia, Jürg Felix pour certains éliciteurs et protocoles, François Bouteau pour les essais de la flagelline en voltage-clamp. Merci à Marina pour son travail sur la production des protoplastes boudeurs.

Enfin, je remercie les membres du jury -Emile Miginiac, Enrico Martinoia, Cyrille Forestier, Alain Gojon et Ken Takeda- d'avoir accepté de se pencher sur mon travail de thèse.

SOMMAIRE

A- ABREVIATIONS	1
B- CONSTANTES	1
Chapitre I: INTRODUCTION.....	2
A- Homéostasie des anions dans la plante.....	3
<u>1- Les anions ne sont pas gérés par les cellules végétales comme ils le sont dans les cellules animales</u>	3
<i>a- Contenu anionique des systèmes végétaux</i>	3
<i>b- Osmolarité et métabolisme: deux fonctions de base des anions dans la plante</i>	4
<i>c- Donc...</i>	5
<u>2- L'accumulation des anions est une tâche "onéreuse" pour la plante</u>	6
<u>3- Quand un canal anionique de la membrane plasmique s'ouvre...</u>	8
B- La technique du patch-clamp permet la caractérisation de nombreux canaux anioniques sur la membrane plasmique des cellules végétales	7
<u>1- Les canaux anioniques végétaux ne sont pas des canaux chlorures!</u>	7
<u>2- Régulations des canaux anioniques étudiés en patch-clamp: diversité et multiplicité des mécanismes impliqués</u>	8
<i>a- Régulation par les propriétés de la membrane plasmique</i>	8
<i>b- Régulation par des variations de paramètres intracellulaires</i>	10
<i>c- Régulation par les composés du compartiment extracellulaire</i>	12
<i>d- Conclusion sur la régulation des canaux anioniques</i>	13
<u>3- Les inhibiteurs de canaux anioniques permettent de "sélectionner" un canal de la membrane plasmique</u>	13
<u>4- Que peut on conclure des régulations caractérisées en patch-clamp quant à la fonction des canaux anioniques de la membrane plasmique?</u>	14
C- Fonction des canaux ioniques: quelques beaux exemples ne rendent pas compte de la diversité des activités	15
<u>1- Régulation négative du volume cellulaire: le modèle des cellules de garde des stomates</u>	15
<i>a- Les stomates: une structure simple subissant des variations de volume cellulaire en fonction de nombreux paramètres de l'environnement</i>	15
<i>b- La fermeture du stomate en réponse à l'acide abscissique fait intervenir un canal nitrate à cinétiques lentes</i>	16
<i>c- La voie de signalisation de fermeture des stomates en réponse au calcium extracellulaire passe elle aussi par un canal anionique de type lent</i>	19
<i>d- Le modèle de variation réversible du volume des cellules de garde est-il applicable à d'autres types cellulaires?</i>	20
<u>2- La perception du signal lumière</u>	20

<u>3- Communication longue distance</u>	22
<u>4- Implication de canaux anioniques dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques</u>	23
<i>a- Stress abiotique racinaire: des canaux impliqués dans la résistance au cation toxique Al^{3+}</i>	23
<i>b- Réponse d'efflux au stress hypoosmotique</i>	24
<i>c- L'efflux d'anions: une réponse précoce lors de l'interaction plante-pathogène</i>	24
<u>5- La perception de doses supraoptimales d'auxine</u>	25
<u>6- Transport des anions: un canal d'influx pour charger la racine et des canaux d'efflux pour charger le xylème</u>	26

D- Support moléculaire des canaux anioniques végétaux de la membrane plasmique..... 28

<u>1- Il existe dans le génome des plantes des gènes codant des protéines homologues à des canaux anioniques</u>	28
<i>a- La famille des CLC (pour Chloride Channel)</i>	28
<i>b- La très grande famille des protéines ABC (pour ATP-Binding-Cassette)</i>	29
<i>c- La famille des VDAC (pour Voltage Dependent Anion Channel)</i>	31
<i>d- Autres familles intéressantes</i>	32
<u>2- Beaucoup de séquences codant potentiellement pour des protéines membranaires n'ont pas encore de fonction</u>	32

E- Objectif de la thèse: comprendre la fonction des canaux anioniques dans des types cellulaires "moins spécialisés" que les cellules de garde et les cellules racinaires..... 34

<u>1- Une vision de l'état de la recherche concernant les canaux anioniques de la membrane plasmique à mon arrivée au laboratoire</u>	34
<u>2- Deux modèles biologiques pour l'étude des canaux anioniques de la membrane plasmique chez <i>Arabidopsis</i>: l'hypocotyle et les suspensions cellulaires</u>	35
<i>a- l'hypocotyle d'<i>Arabidopsis</i> comme système modèle pour l'étude de l'élongation cellulaire</i>	35
<i>b- Les suspensions cellulaires comme système modèle pour l'étude de processus d'osmorégulation</i>	36
<i>c- Donc...</i>	36
<u>3- Objectif de la thèse et stratégies</u>	37
<i>a- Poursuivre l'étude des activités des canaux anioniques de la membrane plasmique</i>	37
<i>b- Caractériser les fonctions physiologiques dans lesquelles les canaux anioniques de la membrane plasmique peuvent être impliqués</i>	37
<i>c- Identifier des gènes des canaux anioniques</i>	37
<i>d- Enfin...</i>	38

Chapitre II: CARACTERISATION DES ACTIVITES "CANAL ANIONIQUE" DE LA MEMBRANE PLASMIQUE DES CELLULES D'*ARABIDOPSIS* PAR LA TECHNIQUE DU PATCH-CLAMP: DEUX CANAUX BIEN DISTINCTS PEUVENT ETRE ACTIFS DANS LES MEMES CONDITIONS 39

A- Contribution à la caractérisation d'un canal anionique à cinétiques rapides sur la membrane plasmique des cellules épidermiques de l'hypocotyle d'<i>Arabidopsis thaliana</i>.....	40
1- <u>Le canal anionique à cinétiques rapides: une activité déjà bien caractérisée</u>	40
2- <u>Le canal rapide présente une perméabilité originale des anions et son activité est régulée par le statut des anions internes</u>	40
a- Article n°1: " <i>Sulfate is Both a Substrate and an Activator of the Voltage-Dependent Anion Channel of Arabidopsis Hypocotyl Cells</i> "	40
ARTICLE N°1	41 à 49
b- <i>Complément de résultat sur la perméabilité: le phosphate est un ion imperméant dans le pore du canal anionique à cinétiques rapides</i>	50
c- <i>Sulfate et modulation de l'activité dans le temps</i>	50
d- <i>Avancées techniques en rapport avec la régulation/perméation du sulfate</i>	51
3- <u>Etude de la fermeture dépendante du voltage du canal à cinétiques rapides: arguments pour une obstruction par les nucléotides cytosoliques</u>	52
a- Article n°2: " <i>Nucleotides provide a voltage-sensitive gate for the rapid anion channel of Arabidopsis hypocotyl cells</i> "	52
ARTICLE N°2	53 à 59
b- <i>Une étude en canal unitaire confirme plusieurs points de notre hypothèse et apporte de nouveaux éléments</i>	60
c- <i>La fermeture du canal par le voltage est complexe...</i>	61
B- Le canal anionique à cinétiques lentes de la membrane plasmique des cellules épidermiques de l'hypocotyle d'<i>Arabidopsis thaliana</i>.....	62
1- <u>Premières caractérisations d'un canal anionique à cinétiques lentes des cellules épidermiques</u>	62
ARTICLE N°3: "<i>Characterization of a nitrate-permeable channel able to mediate sustained anion efflux in hypocotyl cells from Arabidopsis thaliana</i>"	63 à 73
2- <u>Complément sur la sélectivité</u>	74
C- La régulation par le pH est une nouvelle caractéristique divergente entre canaux de type rapide et de type lent	75
ARTICLE N°4: <i>Opposite pH regulation of slow and rapid anion channels at the plasma membrane of Arabidopsis thaliana hypocotyl cells</i>	75 à 80
D- Des canaux anioniques aux caractéristiques très similaires peuvent être observés en patch-clamp sur les cellules en culture d'<i>Arabidopsis thaliana</i>	81
E- Conclusion	82
1- <u>Les canaux anioniques de la membrane plasmiques d'<i>Arabidopsis thaliana</i> sont régulés de façon multiple et divergente</u>	82
a- <i>Multirégulation</i>	82
b- <i>Des caractéristiques souvent divergentes militent en faveur de deux canaux anioniques moléculairement distincts</i>	82
2- <u>Une base moléculaire pour les deux canaux anioniques de la membrane plasmique?</u>	83
3- <u>Malgré ces nombreux niveaux de régulation, les rôles des deux canaux sont hypothétiques</u>	84

<i>a- Le canal rapide: métabolisme ou signalisation électrique?</i>	84
<i>b- Le canal lent: un rôle dans l'osmorégulation cellulaire et dans la compensation du courant de pompe?</i>	85

Chapitre III : LES EFFLUX D'ANIONS: ETUDE DES ACTIVITES DES CANAUX ANIONIQUES DES CELLULES D'ARABIDOPSIS THALIANA A TRAVERS UNE MESURE PLUS GLOBALE 87

A- Nécessité de développer des approches complémentaires à la technique du patch-clamp pour comprendre la fonction des canaux anioniques de la membrane plasmique 87

<u>1- Un exemple de va-et-vient entre patch-clamp et développement de plantules. Limites d'une telle approche</u>	87
<u>2- Des réponses à court terme à l'échelle de la cellule ou du tissu</u>	88
<u>3- Quels sont les outils à notre disposition provenant des observations de patch-clamp?</u>	89

B- Premières expériences: efflux d'anions à partir des parties aériennes de plantules d'*Arabidopsis thaliana* 90

C- Utilisation des cellules en culture pour rechercher des signaux activant les canaux anioniques de la membrane plasmique..... 91

<u>1- Recherche d'effecteurs capables d'induire des efflux de nitrate</u>	91
<u>2- Les deux canaux anioniques caractérisés en patch-clamp sont-ils impliqués dans les efflux à partir des cellules en culture?</u>	92
<i>a- Sélectivité des efflux: une limite des cellules en suspension</i>	93
<i>b- Effet des inhibiteurs de canaux anioniques</i>	93
<i>c- Régulation des efflux par le pH et les anions externes</i>	93
<u>3- Discussion</u>	94

D- Pour aller plus loin : premiers pas vers une activité déclenchée et observée en patch-clamp 96

Chapitre IV: RECHERCHE DE CRIBLES D'EXPRESSION EN SYSTEMES HETEROLOGUES POUR LE CLONAGE DE GENES CODANT DES CANAUX ANIONIQUES..... 97

A- Introduction 97

<u>1- Quels sont les systèmes d'expressions à notre disposition?</u>	97
<u>2- Détecter une activité canal anionique dans un système hétérologue</u>	98

B- Recherche d'un crible fondé sur la perméation d'anions toxiques dans le pore des canaux anioniques de la membrane plasmique..... 101

<u>1- Le système chlorate/nitrate réductase chez <i>Hansenula polymorpha</i></u>	102
<i>a- Le principe du trépied Chlorate, Nitrate reductase et Perméabilité</i>	102

<i>b- Premiers essais: sensibilité de Pichia pastoris et Hansenula polymorpha aux précurseurs des anions toxiques</i>	103
<i>c- L'expression de hCLC1 sauvage et des mutants ponctuels n'induit pas de modification de croissance d'Hansenula polymorpha.</i>	104
<u>2- Les anions toxiques sans a priori</u>	104
<i>a- L'expression de canaux anioniques affecte peu la croissance de Saccharomyces, même sur des milieux riches en anions potentiellement toxiques</i>	104
<i>b- TmCLC0 confère une croissance plus faible à la levure CN3</i>	105
<u>3- Conclusion sur la mise au point d'un crible basé sur la perméabilité d'anions toxiques dans le pore des canaux anioniques</u>	106
<i>a- Perspective : l'expression de CLC0 fournit de nouvelles pistes pour la compréhension du rôle des canaux anioniques dans les cellules animales et végétales</i>	106
<i>b- Pour aller plus loin...</i>	106

C- Tentative de clonage du canal anionique à cinétiques rapides: l'effet activateur du sulfate est-il conservé en ovocyte de Xénope? 108

<u>1- Principe</u>	108
<u>2- Première expérience: l'injection de sulfate ne permet pas d'activer de conductance de type rapide dans les ovocytes de xénope préalablement injectés avec des ARN polyA</u>	109
<u>3- Discussion et perspectives</u>	109

D- Conclusion sur les systèmes hétérologues utilisés lors de crible d'expression 111

Chapitre V: CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES 112

<u>1- Rappel des principaux résultats et perspectives à court terme</u>	112
<u>2- Les couples patch-clamp/approches-complémentaires pour comprendre la fonction des canaux anioniques</u>	114
<u>3- Identifier à tout prix les gènes des canaux anioniques des cellules végétales</u>	116
<u>4-Perspectives: la génétique pour l'étude de l'homéostasie des anions</u>	117
<i>a- Un crible large pour l'homéostasie des anions</i>	117
<i>b- Les anions toxiques encore et toujours...</i>	117
<i>c- Classer les mutants, retenir ceux affectés dans des activités canal anionique</i>	118

ANNEXES 119

Annexe A- Principes d'électrophysiologie et de patch-clamp 119

<u>1- Force électromotrice d'un ion</u>	119
<u>2- Intensité du courant, potentiel de réversion</u>	119
<u>3- Fermeture des canaux ioniques</u>	120
<u>4- Les techniques de voltage-clamp et la technique du patch-clamp appliquée à la membrane plasmique des cellules végétales</u>	120
<u>5- Protocoles de voltage utilisés dans les expériences de patch-clamp: signification et informations</u>	121

Annexe B- Matériels et méthodes.....	124
<u>1- Culture de plantules et de cellules en suspension d'<i>Arabidopsis thaliana</i></u>	124
<u>2- Mesure de concentrations anioniques et efflux</u>	124
<u>3- Electrophysiologie sur <i>Arabidopsis thaliana</i></u>	126
<u>4- Pool d'ARNm et banques d'expression</u>	128
<u>5- Electrophysiologie sur ovocyte de Xénope (<i>Xenopus leavis</i>)</u>	129
<u>6- Les systèmes "levure"</u>	131
Annexe C- Complément à l'article n°2: un modèle informatique simple rend compte de l'obstruction par les nucléotides du pore du canal rapide	133
<u>1- Principe</u>	133
<u>2- Application numérique: il existe un jeu de valeurs permettant d'effectuer une approximation et de reproduire une grande partie des résultats...</u>	134
<u>c- ...mais certains résultats ne sont pas explicables par le modèle</u>	135
BIBLIOGRAPHIE	136

A- ABBREVIATIONS

1-ANA	acide naphthalène-1-acétique
2-ANA	acide naphthalène-2-acétique
A9C	acide anthracène-9-carboxylique
AAPK	ABA-activated protein kinase
ABA	acide abscissique
ABC	ATP Binding Cassette
abi1 & 2	abscisic acid-insensitive 1 & 2
ADN	acide désoxyribo-nucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADP	adenosyl diphosphate
AIA	acide IndoleAcétique = auxine
AMP	adenosyl monophosphate
AMPPnP	5'adenylylimidodiphosphate
AO	acide okadaïque
AQP	aquaporine
ARN	acide ribo-nucléique
ARNc	ARN complémentaire
ATP	adenosine-5'-triphosphate
ATPδS	adenosine-5'-O-(3-thiotriphosphate)
BR	brassinostéroïdes
BTP	Bis-tris propane
CLC	Chloride Channel (famille des ...)
cpm	coup par minutes
DIDS	acide 4,4' diisothiocyanati-stilbène-2,2'-disulfonique
DMSO	dimethylsulfoxyde
DO	densité optique
EC ₅₀	concentration induisant 50% de l'effet
EGTA	acide éthylène glycol bis(2-aminoéthylether)-N,N,N',N'-tétracétique
Em	Potentiel de membrane (mV)
GABA	Gamma-aminobutyric acid
GCA2	Growth Control exerted by ABA

GCAC1	Guard Cell Anion Channel 1
GluCl	Glutamate-gated Chloride Channel
GFP	Green Fluorescent Protein
Hepes	acid N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-2-éthanesulfonique
IAA-94	acide indanyloxyacétique 94
IV	Courant/Voltage
LGIC	Ligand gated ion channel
MES	acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique
min	minute(s)
ms	milliseconde(s)
mV	milliVolt(s)
nif	acide niflumique
NPPB	acide 5-nitro-2,3-phenylpropylaminobenzenoïque
pA	picoAmpère
PCR	Polymerase Chaine Reaction
pS	picoSiemens
rpm	rotation(s) par minute
sec	seconde(s)
SITS	acide 4-acetamido-4'-isothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonique
SAB	Serum Albumine Bovine
SCN ⁻	thiocyanate
Tris	Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel

B- CONSTANTES

F	constante de Faraday (9,648.10 ⁻²³ V.C.°K ⁻¹)
h	coefficient de Hill
R	constante des gaz parfaits (8,314 V.C.°K ⁻¹ .mol ⁻¹)
T	température (298 °K)

Chapitre I

INTRODUCTION

Chapitre I: INTRODUCTION

Une fois enracinées, les plantes doivent faire face aux contraintes de l'environnement pour assurer leur survie et le succès de leur reproduction. Cet environnement fluctue beaucoup, alternant des périodes fastes et des périodes plus difficiles. Les processus d'évolution semblent avoir sélectionné une grande plasticité dans le développement végétal et une large gamme de programmes d'expression de gènes en réponse aux contraintes de l'environnement.

La nutrition des plantes, en particulier la nutrition minérale, est très dépendante de la disponibilité des molécules au contact des racines. En fonction du lessivage ou des apports extérieurs, des caractéristiques physico-chimiques du sol et des compétitions avec d'autres organismes, les plantes doivent s'adapter pour un ou plusieurs types de molécules, à une alternance de périodes de carence et d'abondance. Cela nécessite d'une part des processus d'absorption très efficaces et d'autre part l'existence d'une politique de stockage permettant à la plante d'éviter les carences en périodes difficiles.

De plus, les cellules végétales, comme toutes les cellules eucaryotes, sont extrêmement compartimentées. Cela signifie que les enzymes et leurs substrats/produits ne sont pas toujours dans le même compartiment et ont à être regroupés/transportés pour que le système soit fonctionnel. Les membranes sont donc des zones d'échange d'eau, d'ions ou de solutés. A leur niveau, la cellule peut assurer un contrôle sur les flux de différentes molécules. La membrane plasmique a un statut particulier: elle assure l'interface entre le milieu cellulaire et la paroi. Du côté cytosolique, la composition du milieu est très bien définie et relativement constante dans le temps; du côté extérieur, elle est au contraire très variable. Il est évident que la cellule doit posséder des systèmes de transport efficaces sur cette membrane et les moduler en fonction des conditions, afin d'assurer sa survie.

Les différentes activités impliquées dans l'homéostasie des ions à l'échelle de la cellule ou de la plante commencent à être connues. Ce sont en particulier des protéines transmembranaires impliquées dans des phénomènes de transport conduisant à l'accumulation des solutés dans certains compartiments et certains organes. Sur la membrane plasmique, les scientifiques ont décrit des systèmes d'accumulation très efficaces -des transporteurs directement ou non énergisés- et des protéines particulières permettant la diffusion des molécules en fonction de leur gradient -les canaux ioniques-; deux grands modes de transport impliqués dans des fonctions très diverses.

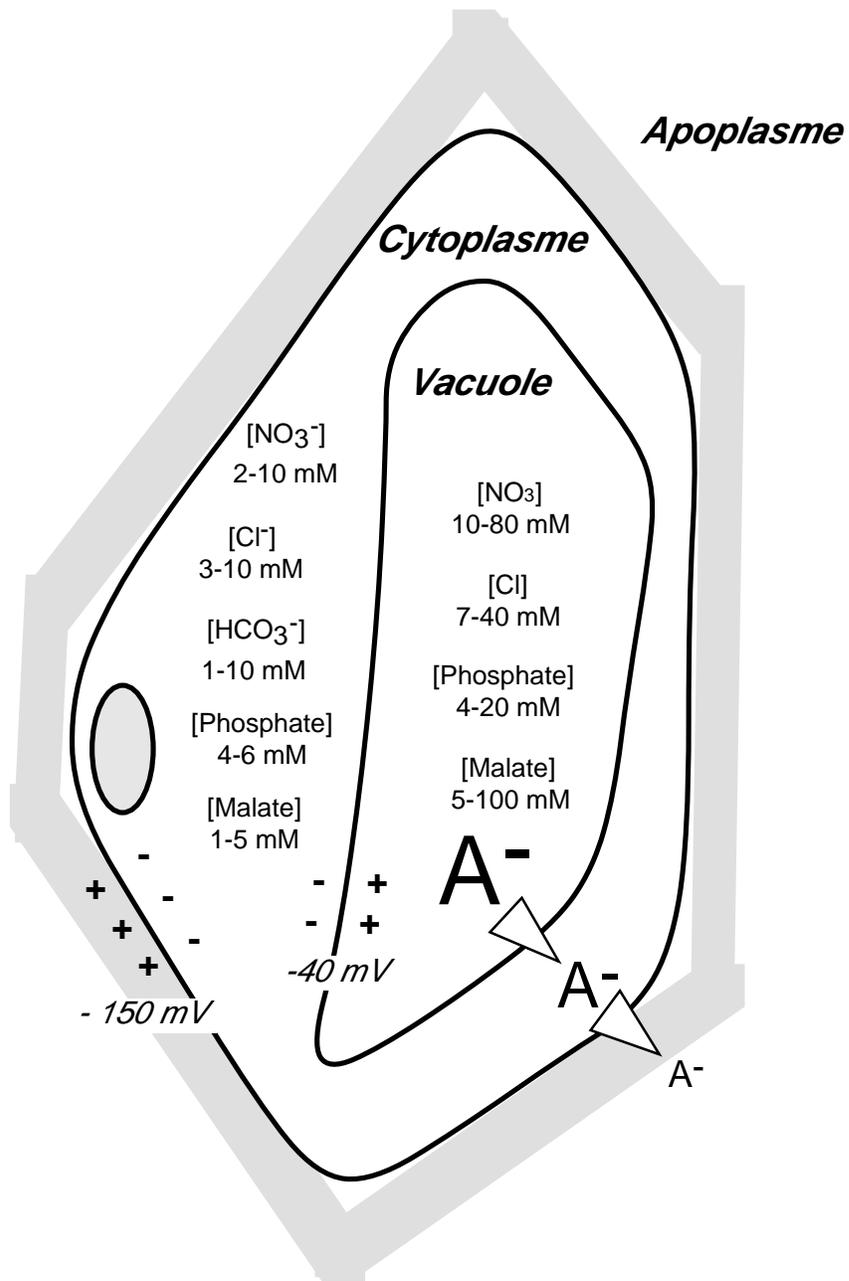


Figure I-1: *Compartmentation des anions dans la cellule végétale: gradients d'anions et gradients de potentiel.*
 D'après Barbier-Brygoo *et al.* 2000

A- Homéostasie des anions dans la plante

L'homéostasie des anions est l'ensemble des processus physiologiques de la plante qui régissent l'accumulation des anions telle qu'on peut l'observer expérimentalement. Il s'agit donc d'une "politique" des plantes nécessaire à leur survie et faisant intervenir de nombreuses fonctions cellulaires régulées de manière à n'autoriser que des fluctuations compatibles avec la survie. Nous verrons dans le chapitre suivant que le statut des anions est complexe dans la plante, à la fois en raison de leur grande diversité, mais aussi parce qu'ils interviennent dans de nombreux phénomènes à l'échelle de l'organe, de la cellule ou du compartiment cellulaire. La liste des fonctions que je présenterai n'est bien sûr pas exhaustive.

1- Les anions ne sont pas gérés par les cellules végétales comme ils le sont dans les cellules animales

a- Contenu anionique des systèmes végétaux

Les cellules animales n'ont en grande quantité comme anion inorganique que l'anion chlorure qui sert de contre-charge au potassium et au sodium. A l'opposé, les cellules végétales accumulent de façon très souple une quantité importante et variée d'anions. La figure I-1 (adaptée de (Barbier-Brygoo *et al.*, 2000)) donne quelques valeurs indicatives quant à l'accumulation des anions dans la cellule végétale. En plus de l'ion chlorure, qui se trouve en concentration relativement faible, on trouve dans les cellules végétales du nitrate, du phosphate, du sulfate ainsi que plusieurs types d'anions organiques, dont certains des plus abondants sont le malate, le glutamate et l'aspartate. En face de cette grande variété de charges négatives, la plante accumule principalement comme cation, le potassium. Elle supporte donc très bien une grande variabilité qualitative et quantitative dans la composition anionique du milieu mais le potassium est absolument nécessaire à sa survie.

Comme l'illustre la figure I-1, tous les compartiments de la cellule ne stockent pas les anions de la même façon. Différents auteurs se sont attachés à mesurer les concentrations anioniques dans le cytoplasme et dans la vacuole et ont révélé d'importantes disparités. Par exemple, pour les plantes supérieures et en conditions nutritives non limitantes, les concentrations de nitrate cytoplasmique et vacuolaire sont respectivement de 1-5 mM et 20-40 mM (Crawford, 1995). Un tel ratio est conservé dans les cellules d'orge en ce qui concerne le nitrate (4 / 40 mM) (Smith *et al.*, 1995) et pour le chlorure chez l'algue *Eraemosphera viridis* (3 / 7 mM) (Bethmann *et al.*, 1995) et l'hépatique *Conophalum conicum* (7,4 / 43,5 mM) (Trebacz *et al.*, 1994). Une idée répandue veut que les concentrations anioniques cytoplasmiques, comme d'autres paramètres cellulaires soient relativement tamponnées. Effectivement, dans les racines d'orge ayant poussé sur un milieu contenant 0,1 ou 10 mM NO_3^- , un dosage par la technique des microélectrodes sélectives révèle des concentrations cytoplasmiques de l'ordre de 4 mM dans les deux cas, alors qu'elles varient de 10 à 40 mM dans la vacuole (Van der Leij *et al.*, 1998). Des résultats comparables ont été obtenus

concernant le phosphate dans les racines de maïs: sa concentration est de l'ordre de 4 à 6 mM dans le cytoplasme mais varie de 0 à 20 mM dans la vacuole (Lee *et al.*, 1990). Les données quant aux compartiments autres que la vacuole et le cytoplasme sont peu abondantes: A partir de chloroplastes isolés d'épinards, de betterave et de pois, Robinson et Downton (1984) ont évalué l'anion chlorure à une concentration proche de 100 mM. Enfin Kaiser et Urbach (1977) ont dosé le phosphate inorganique dans le même organe à une valeur proche de 150 mmole par mg de Chlorophylle.

L'autre idée intéressante illustrée par ces expériences est que la plante est capable de pallier le manque d'un certain anion probablement par l'accumulation d'autres anions en provenance du milieu ou par synthèse selon les possibilités (Hiatt, 1967; Ting, 1981). Lors de l'ouverture des stomates de *Vicia faba*, le malate est accumulé en complément de l'ion chlorure dans les cellules de garde à 75 mM en condition de chlore non limitant et à 145 mM en cas de carence (Raschke *et al.*, 1978).

Un autre niveau de complexité lors de l'accumulation des anions est l'origine de la cellule considérée. On observe généralement une distorsion par exemple entre différents organes. Ainsi Geelen et ses collègues (2000) observent sur de jeunes plantules d'*Arabidopsis thaliana* une concentration 30 % supérieure en nitrate et en sulfate dans les parties aériennes par rapport à la racine. En revanche, l'anion chlorure est accumulé de manière comparable dans les deux organes. Un autre exemple est le cas des cellules de garde des stomates, dont la concentration en anions varie en fonction des besoins lors des mouvements stomatiques. Les cellules voisines ne subissent pas ou peu ces variations ou, chez certaines espèces, fournissent les cellules de garde en anions nécessaires à l'ouverture des stomates: la concentration en chlore dans les cellules de garde augmente en même temps qu'elle diminue dans les cellules proches. Un dernier exemple est donné par l'évaluation des concentrations de certains anions dans le mésophylle et l'épiderme d'orge. Alors que le chlore et le nitrate semblent être accumulés dans les cellules épidermiques d'un facteur proche de 5, le phosphate est accumulé dans le mésophylle d'un facteur 3 (Karley *et al.*, 2000).

Ces différences entre organes et entre tissus rendent probablement compte d'une spécialisation des cellules au sein de la plante soit en terme de stockage, soit en fonction des capacités métaboliques. Il est en effet imaginable que les anions dont l'assimilation est onéreuse soient stockés dans les organes photosynthétiques. Toutes ces variations dans l'accumulation traduisent probablement des variations des populations de transporteurs au niveau des membranes des cellules.

b- Osmolarité et métabolisme: deux fonctions de base des anions dans la plante

Le statut des anions dans les cellules végétales est d'autant plus complexe qu'ils interviennent potentiellement dans plusieurs phénomènes physiologiques d'importance.

Le premier d'entre eux est le maintien d'une forte osmolarité, assurant la turgescence. La pression osmotique dans les cellules végétales est souvent de l'ordre de 400 à 1000 mOsm selon les espèces et les conditions (Craw, 1976). Excepté pour les espèces qui accumulent beaucoup de sucre, cette osmolarité est principalement assurée par des sels de potassium. Par exemple, chez l'orge en conditions normales, elle est voisine de 450 mOsm (Fricke *et al.*, 1994). Le potassium est alors à une

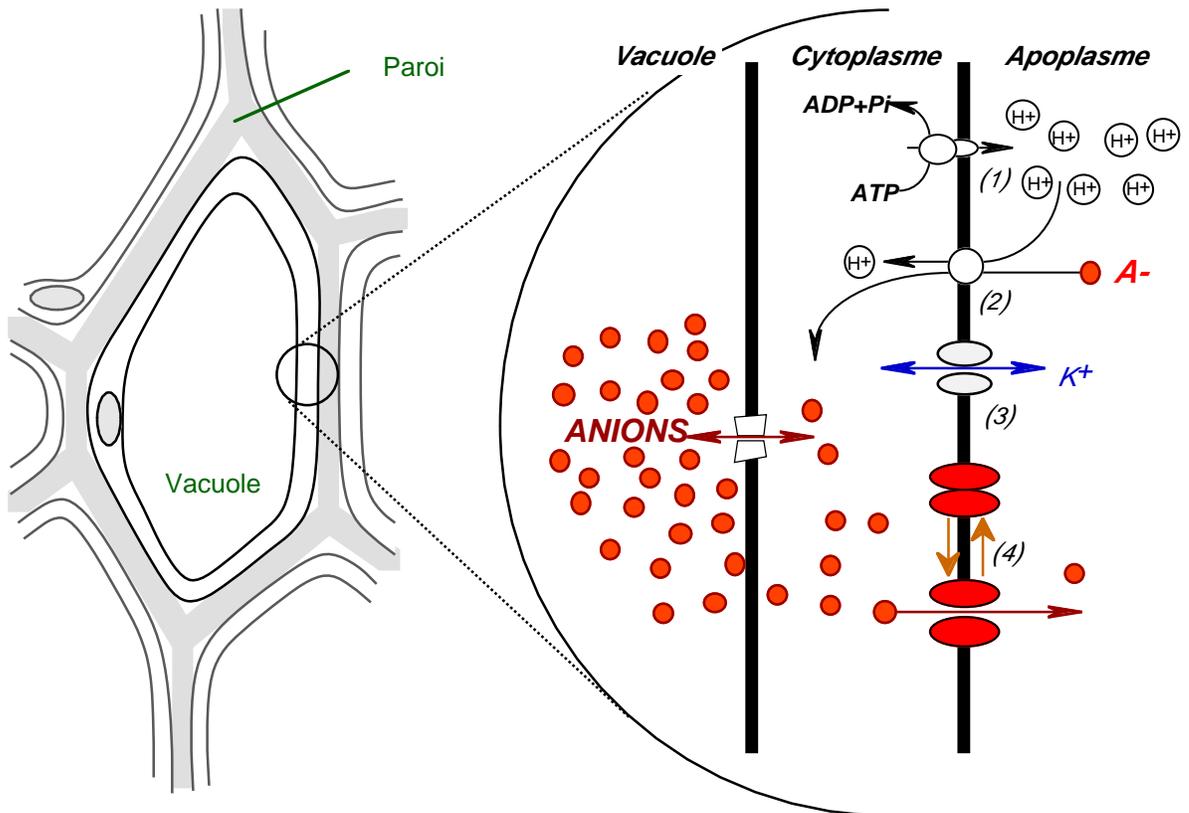


Figure I-2: Résumé des mécanismes de transport des anions à l'échelle de la membrane plasmique des cellules végétales. Le gradient de potentiel électrochimique des protons est créé et entretenu par les pompes ATPases (1) de la membrane plasmique. Ce gradient, dit primaire, est "consommé" pour créer les gradients secondaires dont ceux des différents anions. Les activités mises alors en jeu sont des cotransports (2) nH^+/A^- . Alors que l'accumulation du potassium dans la cellule peut se faire souvent uniquement par diffusion (3) ceci grâce au potentiel de membrane très négatif, l'apparition de conductances aux anions sur cette membrane (4) provoquera un fort efflux.

concentration proche de 200 mM, tout comme les anions inorganiques cumulés (nitrate, chlorure et phosphate).

Les anions interviennent de plus dans de nombreuses étapes du métabolisme. Contrairement aux animaux, les plantes sont capables de mobiliser l'azote, le soufre et le phosphore à partir des anions minéraux nitrate, sulfate et phosphate (Buchanan *et al.*, 2000). Pour cela, elles possèdent des enzymes clefs: l'azote du nitrate est réduit par les nitrate et nitrite réductases en ammonium puis inclus dans les acides aminés et les protéines. L'APS sulfurylase "active" le sulfate en le fixant sur le phosphate alfa d'un ATP formant ainsi l'APS (pour *Adénosine PhosphoSulfate*), lui-même substrat de plusieurs enzymes conduisant à l'incorporation du soufre dans des molécules plus complexes. Le phosphate, par réduction d'une liaison ester, est fixé à l'ADP pour former l'ATP. De là, il peut être remobilisé et inclus dans des molécules plus complexes comme des sucres phosphates. Le contenu anionique des plantes correspond donc aussi à un stockage d'azote, de soufre et de phosphore, facilement utilisable quoique moyennant de grandes dépenses énergétiques. Par exemple, la réduction de l'azote sous forme NO_3^- en acides aminés correspond à une "dépense" minimum de 8 NAD(P)H, H^+ . Il en est de même pour les anions organiques qui sont des "étapes" dans des voies métaboliques et s'accumulent selon les besoins momentanés en réponse à plusieurs contraintes (niveaux énergétiques de la cellule, régulation du pH, maintien de l'osmolarité, etc). Par exemple, le malate, un des anions organiques les plus abondants, est un point d'entrée du cycle de Krebs et une étape de la synthèse des glucides à partir des lipides. Mais il intervient aussi lors de la photosynthèse car il est le produit de l'acceptation du dioxyde de carbone par le phosphoenol pyruvate (PEP) grâce à la PEP carboxylase et la malate déshydrogénase. Il est particulièrement accumulé durant le cycle photosynthétique des plantes en C_4 et sert de navette chez les crassulacées. De même, le glutamate et l'aspartate -deux anions organiques abondants- interviennent dans l'assimilation de l'azote inorganique lors de l'incorporation de l'ammonium dans les molécules organiques plus complexes.

c- Donc...

Les plantes accumulent beaucoup de sels de potassium mais avec une grande souplesse quant à la nature des anions. Si les besoins métaboliques sont satisfaits, elles accumulent de façon apparemment qualitativement indifférente les anions du sol et lorsque ceux-ci viennent à faire défaut, elles peuvent utiliser les produits de leur métabolisme comme anions solubles. Ceux-ci peuvent alors atteindre des concentrations conséquentes.

Ces variabilités qualitatives et quantitatives correspondent à une politique de stockage des anions par la plante en réponse aux contraintes de l'environnement et du développement. Elle nécessite probablement un nombre non négligeable de transporteurs et de régulateurs, dont certains sont bien décrits d'un point de vue fonctionnel et ont été clonés. Parmi ces nombreuses protéines membranaires, les canaux anioniques dont l'activité a été décrite sur toutes les membranes des cellules végétales, ont encore comme nous allons le voir dans le chapitre suivant, des fonctions mal comprises.

2- L'accumulation des anions est une tâche "onéreuse" pour la plante

A l'échelle de la cellule végétale, les anions sont accumulés, en provenance du milieu extracellulaire (apoplasme ou sol). Le mécanisme de cette accumulation est décrit dans le schéma de la figure I-2. La membrane plasmique possède, de par l'activité de la pompe ATPase, un fort gradient de protons (pour revue (Morsomme *et al.*, 2000)). Ce gradient électrochimique, créé par une activité enzymatique coûteuse en molécules d'ATP, est utilisé par toute une série de systèmes de symports ou d'antiports qui, dans le premier cas, permettent l'accumulation de certains composés dans la cellule ou, dans le second cas, permettent leur expulsion hors de la cellule. Les anions sont donc transportés et concentrés dans la cellule par des cotransports H^+/A^- qui ont été dans certains cas caractérisés enzymatiquement (Felle, 1994) et souvent clonés (Tsay *et al.*, 1993). Ils semblent être assez spécifiques d'un type d'anion: il existe des familles de transporteurs pour le nitrate (pour revue (Forde, 2000)), le sulfate et le phosphate (pour revue (Smith *et al.*, 2000)).

3- Quand un canal anionique de la membrane plasmique s'ouvre...

De par le potentiel de membrane, très négatif, et en raison de la répartition des anions fortement accumulés à l'intérieur des cellules, on peut s'attendre à ce que l'ouverture d'une conductance anionique sur la membrane plasmique conduise à un efflux soutenu d'anions. Etant donné le gradient de potentiel électrochimique des anions de part et d'autre de la membrane plasmique des cellules végétales, cet efflux se traduit par une dépolarisation activant d'autres conductances. Ces deux phénomènes, efflux et dépolarisation ne peuvent se maintenir indéfiniment, sous peine de conduire la cellule à se vider de ses sels, perdre sa pression osmotique, sa turgescence et mourir. Au repos, les canaux anioniques de la membrane plasmique ne peuvent être ouverts tout le temps avec une ampleur comparable à ce que l'on peut caractériser en utilisant la technique du patch-clamp (voir chapitre suivant). Il nous faut donc admettre que d'une part, ils sont très régulés, et que d'autre part ils s'activent de façon très discrète ou de façon importante mais transitoire, à l'occasion d'événements bien particuliers.

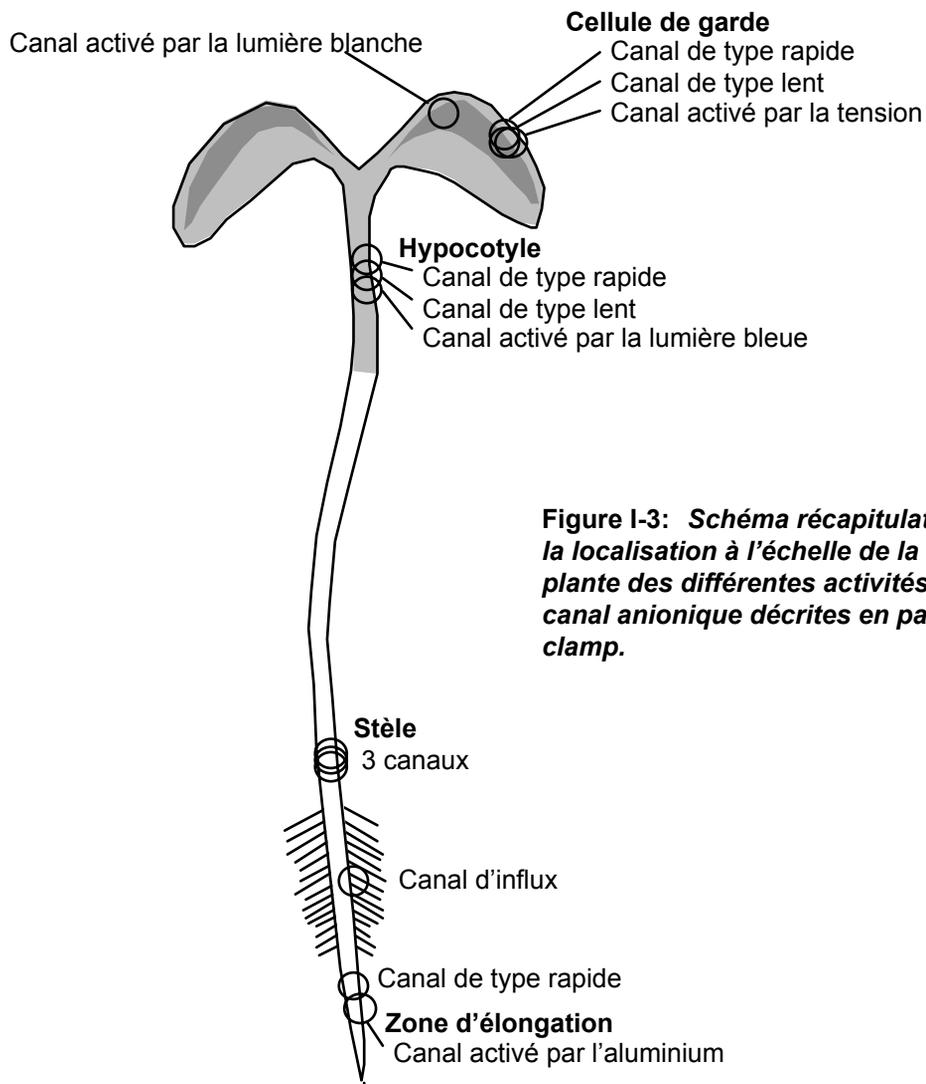


Figure I-3: Schéma récapitulatif de la localisation à l'échelle de la plante des différentes activités canal anionique décrites en patch-clamp.

B- La technique du patch-clamp permet la caractérisation de nombreux canaux anioniques sur la membrane plasmique des cellules végétales

De nombreuses équipes dans le monde se sont attachées à la caractérisation de canaux anioniques de la membrane plasmique des cellules végétales et ont utilisé pour cela la technique du patch-clamp appliquée aux protoplastes issus de différents tissus (figure I-3). L'annexe A présente cette technique adaptée aux systèmes végétaux et les conclusions relativement fines que l'on peut en tirer quant aux régulations et aux caractéristiques biophysiques des canaux anioniques.

La littérature concernant ces canaux est de plus en plus abondante et il serait vain de vouloir faire un catalogue exhaustif des activités, de leurs caractéristiques biophysiques et de leurs régulations. Je préfère donc présenter de façon aussi complète et détaillée que possible ces canaux sous forme de tableaux (tableaux 1-1 à 1-3). Le texte de ce chapitre a pour rôle de mettre en lumière certaines caractéristiques reconnues ou qui m'ont semblé intéressantes. De plus, il est censé attirer l'attention sur la grande variabilité des mécanismes mis en jeu pour la régulation de l'activité des canaux anioniques.

1- Les canaux anioniques végétaux ne sont pas des canaux chlorures!

L'anion physiologique majoritaire dans les systèmes animaux est l'anion chlorure. Les canaux anioniques des cellules animales sont donc étudiés en patch-clamp avec des solutions généralement à base de chlorure et l'étude de leur sélectivité est effectuée souvent dans le but d'avoir des données biophysiques telles que la taille du pore ou le processus de la fermeture dépendante du voltage. Chez les végétaux, comme nous l'avons vu, les anions ont un statut beaucoup plus complexe, et étudier la sélectivité des canaux anioniques des cellules végétales a une importance physiologique évidente.

Les séquences de perméabilité des canaux anioniques n'ont pas été établies dans tous les cas et sont souvent incomplètes. Pour des raisons historiques, l'ion chlorure est considéré comme la référence et est utilisé lors des identifications et des études d'activités de la membrane plasmique des cellules végétales.

Le nitrate semble être un anion systématiquement perméant dans les canaux anioniques végétaux. Dans le cas du canal de type R des cellules de garde de *Vicia faba*, le rapport P_{NO_3}/P_{Cl} est de 4,1 (Dietrich *et al.*, 1998; Hedrich *et al.*, 1993); il est comparable, bien que non quantifié pour le canal d'influx des cellules de racines de *Triticum aestivum* (Skerrett *et al.*, 1994). Le canal anionique de type lent des cellules de garde de *Vicia faba* est quant à lui extrêmement perméant au nitrate avec un rapport de perméation de 20,9 (Schmidt *et al.*, 1994). Seul le canal X-IRAC, caractérisé sur la membrane plasmique de protoplastes de parenchyme du xylème de l'orge, présente une sélectivité comparable pour le chlorure et le nitrate (Köhler *et al.*, 2000). La perméabilité des autres anions inorganiques physiologiques, tels le sulfate et le phosphate n'a souvent pas été testée lors de l'évaluation de la sélectivité des canaux et

Tableau I-1: Caractéristiques électriques des canaux anioniques de la membrane plasmique des cellules végétales étudiés en patch-clamp. Canaux des stomates.

Type de Canal	Type cellulaire (Espèce)	Dépendance vis à vis du voltage	Cinétiques	Sélectivité	Pharmacologie	Régulation	Fonction cellulaire
Type R (<i>rapid</i>), nommé GCAC1 (1)	Cellule de garde (<i>Vicia faba</i>)	Forte, canal activé par dépolarisation (2,3)	Rapides (ms)	SCN>NO ₃ >I>Br>Cl>malate (4,5,6)	DIDS>NPPB, IAA94>A9C Inhibition par le DPC (7,8)	Activé par l'ATP intracellulaire (site de liaison) (9,10) et le Ca ²⁺ (11). Régulé par l'auxine (12,13), les pHi et pHe (14), les anions extracellulaires (5,13) dont le malate (6,15) & le CO ₂ (6,15)	Signalisation hormonale (?)
Type S (<i>slow</i>) (16)	Idem	Faible, canal activé par dépolarisation (16)	Lentes (s) (16)	NO ₃ >Br>F>Cl>I>malate (17)	NPPB,IAA94>A9C>>DIDS (18,19,20). Glibenclamide Activé par la cromakalim (18).	Activé par ATP intracellulaire (phosphorylation) (21) et le Calcium (22). Maintenu activé par l'ABA en absence d'ATP (23). Activé par l'ABA (24). Effet de 10 µM de Glibenclamide partiellement réversé par 10 µM d'ABA (18).	Fermeture des stomates (=osmorégulation)
Type "Stretch" (25)	Idem	Faiblement	N.D.	N.D., étudié en chlorure interne	N.D.	Activé par la tension de membrane	Régulation du volume et de la turgescence
Type R (26)	Cellule de garde (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	Forte, canal activé par dépolarisation	N.D.	N.D., étudié en sulfate interne	N.D.	Activé par le sulfate interne.	N.D.
Type S (27)	Idem	Faible, canal activé par dépolarisation	Lentes (s)	N.D., étudié en chlorure interne	A9C>>NPPB,NA, DIDS	Activé par ATP intracellulaire (phosphorylation) et le calcium (28). Activé par l'ABA sauf chez les mutants <i>abi1</i> , <i>abi2</i> (27) et <i>gpa1</i> (29). Suractivé par l'ABA chez <i>era1</i> (30).	Fermeture des stomates (=osmorégulation)

(1) Hedrich (1994) (2) Keller *et al.* (1989) (3) Kolb *et al.* (1995) (4) Dietrich *et al.* (1994) (5) Dietrich *et al.* (1998) (6) Hedrich *et al.* (1993) (7) Marten *et al.* (1992) (8) Marten *et al.* (1993) (9) Hedrich *et al.* (1990) (10) Schulz-Lessdorf *et al.* (1996) (11) Hedrich *et al.* (1988) (12) Marten *et al.* (1991) (13) Lohse *et al.* (1995) (14) Schulz-Lessdorf *et al.* (1995) (15) Hedrich *et al.* (1994) (16) Schroeder *et al.* (1992) (17) Schmidt *et al.* (1994) (18) Leonhardt *et al.* (1999) (19) Schroeder *et al.* (1993) (20) Schwartz *et al.* (1995) (21) Schmidt *et al.* (1995) (22) Schroeder *et al.* (1989) (23) Schwarz *et al.* (1998) (24) Li *et al.* (2000) (25) Cosgrove *et al.* (1991) (26) Pei *et al.* (2000) (27) Pei *et al.* (1997) (28) Allen *et al.* (1999) (29) Wang *et al.* (2001) (30) Pei *et al.* (1998)

n'apparaît que rarement dans les séquences de perméabilité. Seul le canal d'influx des cellules de blé (Skerrett *et al.*, 1994), a été présenté comme "relativement" imperméant au phosphate. Dans le cas du canal anionique à cinétiques rapides (Dietrich *et al.*, 1998), les auteurs évaluent la taille limite d'exclusion du pore du canal en comparant les tailles des anions utilisés en patch-clamp et les perméabilités relatives mesurées dans chacun des cas. Ils ont abouti à une valeur de l'ordre de 0,7 nanomètre.

Les anions organiques sont souvent considérés comme trop "gros" pour être perméant dans le pore des canaux anioniques, mais ce n'est pas le cas de tous les canaux et certains d'entre eux laissent passer par exemple le malate et le succinate. Généralement le ratio $P_{\text{malate}}/P_{\text{Cl}}$ est inférieur à 1. Pour les canaux anioniques lents et rapides des cellules de garde de *Vicia faba*, il est respectivement de l'ordre de 0,24 (Schmidt *et al.*, 1994) et de 0,1 (Hedrich *et al.*, 1993). Pour le canal X-QUAC (pour *Xylem Quickly Activated Anion Channel*) caractérisé dans les cellules du parenchyme xylémien de l'orge, il est de 0,28 (Köhler *et al.*, 2000). En revanche, le canal des racines de *Triticum aestivum* activé par l'aluminium présente un rapport $P_{\text{malate}}/P_{\text{Cl}}$ nettement en faveur du malate (8,4) (Zhang *et al.*, 2001). Étonnement un canal apparemment très comparable caractérisé chez *Zea mais*, n'a un rapport $P_{\text{malate}}/P_{\text{Cl}}$ que de 0,25 (Kollmeier *et al.*, 2001). Dans ce dernier cas, les auteurs ont aussi montré une perméabilité significative au citrate avec un rapport $P_{\text{citrate}}/P_{\text{Cl}}$ de 0,18.

2- Régulations des canaux anioniques étudiés en patch-clamp: diversité et multiplicité des mécanismes impliqués

La technique du patch-clamp permet l'étude relativement simple de l'effet de nombreux paramètres de l'environnement sur des activités électrogènes. Il faut reconnaître que ces approches sont souvent assez tatouantes et consistent à tester un grand nombre de conditions souvent de façon empirique. Néanmoins, elles conduisent au final à l'identification de nouvelles régulations s'exerçant sur les canaux anioniques et à l'idée qu'un même canal est souvent régulé de façons multiples. La bibliographie est particulièrement abondante dans le cas des deux canaux, de type rapide et de type lent, des cellules de garde et nous y ferons souvent référence.

a- Régulation par les propriétés de la membrane plasmique

Régulation par le potentiel de membrane

L'une des régulation les plus courantes de l'activité des canaux ioniques est celle exercée par le potentiel transmembranaire: cela se traduit par une activité de la protéine, c'est à dire une perméation des anions, uniquement dans certaines gammes de voltage (pour plus de détail, voir annexe A). D'un point de vue biophysique, la protéine canal possède un "senseur de voltage", qui comme son nom l'indique, perçoit la différence de potentiel de la membrane et ouvre ou ferme le canal selon sa valeur. Cette sensibilité n'est possible que parce que le senseur porte des charges cryptiques capables de se déplacer dans le champ électrique de la membrane. De façon simpliste, plus il possède de charges plus la fermeture sera "brusquement" dépendante du voltage: en se déplaçant sur l'axe des potentiels, le canal passera très rapidement d'un état complètement fermé (ou ouvert) à un état complètement ouvert (ou fermé). La

Tableau I-2: Caractéristiques électriques des canaux anioniques de la membrane plasmique (sauf cellules de garde et hors travaux du laboratoire) étudiés en patch-clamp.

Type de Canal	Type cellulaire (Espèce)	Dépendance vis à vis du voltage	Cinétiques	Sélectivité	Pharmacologie	Régulation	Fonction cellulaire
? (1,2)	Cellule de l'hypocotyle (<i>A.thaliana</i>)	Faible	N.D.	N.D., étudié en Cl ⁻ interne	NPPB Autres: N.D.	Activé par la lumière bleue en configuration cellule-attachée	Signalisation électrique lumière bleue
Type R (3)	Cellule racinaire (<i>A. thaliana</i>)	Forte, canal activé par dépolarisation	N.D.	N.D., étudié en SO ₄ ²⁻ interne	N.D.	Activé par le sulfate interne.	N.D.
Type R (TSAC ^a) (4,5)	Cellule en culture (<i>N.tabaccum</i>)	Forte, canal activé par dépolarisation	Rapides	N.D., étudié en Cl ⁻ interne	NPPB>A9C > DIDS > acide éthacrinique	Régulé négativement par l'ATP par un phénomène dépendant de la phosphorylation. Régulé par l'auxine.	
? (6,7)	Cellule de la racine (<i>T. aestivum</i>)	Faible, activé par hyperpolarisation	N.D.	Malate>Cl ⁻ Etudié en Cl ⁻ interne	N.D.	Régulé par les anions externes. Activé par Al ³⁺	Tolérance à l'aluminium
? (8)	Cellule de la racine (<i>Z. maïs</i>)	Faible, activé par hyperpolarisation		Cl ⁻ >Malate >Citrate ; Etudié en Cl ⁻ interne	N.D.	Activé par Al ³⁺	Tolérance à l'aluminium
SCAC ^b (9)	"	N.D.	Lentes	N.D., étudié en Cl ⁻ interne	N.D.		
LCAC ^c (9)	"	N.D	Lentes	N.D., étudié en Cl ⁻ interne	N.D.	Activé par Al ³⁺	Tolérance à l'aluminium
Canal d'influx (10)	Cellule de la racine (<i>T. aestivum</i>)	Activé par dépolarisation	Rapides (ms)	NO ₃ >Cl>I>> H ₂ PO ₄ , ClO ₄ ⁻	DIDS>>Zn	Activé par Ca ²⁺ cytosolique et anions externes	Absorption d'anions en conditions de forte salinité?
Type R ? (11)	Xylème de la racine (<i>H. vulgare</i>)	N.D.	Rapides	N.D., étudié en Cl ⁻ interne	N.D.	N.D.	Charge du xylème?
X-IRAC ^d (12)	"	N.D. Actif aux potentiels hyperpolarisés	Lentes (sec)	NO ₃ =Cl	N.D.	Evt canal-unitaire en configuration cellule-entière. Activé par l'augmentation du Ca ²⁺ _i .	Chargement passif en sel du Xyleme?
X-QUAC ^e (12)	"	Actif a Em<<0 et à Em proche de 0.	Rapides (ms)	NO ₃ >Cl>Malate	N.D.	Activé par la diminution du Ca ²⁺ _i .	"
X-SLAC ^f = Type R? (12)	"	Activé par dépolarisation	Rapides		N.D.	Observé à faible Ca ²⁺ _i	"

^a TSAC: Tobacco Suspension Anion Channel. ^b SCAC: Small Conductance Anion Channel. ^c LCAC: Large Conductance Anion Channel ^d X-IRAC: Xylem - inward Rectifying Anion Channel. ^e X-QUAC: Xylem - Quikly Activating Anion Channel. ^f X-SLAT: Xylem - Slowly Activating Anion Channel. Evt: (1) Cho et al. (1996) (2) Lewis et al. (1997) (3) Kiegle et al. (2000) (4) Zimmermann et al. (1994) (5) Zimmermann et al. (1998) (6) Ryan et al. (1997) (7) Zhang et al. (2001) (8) Kollmeier et al. (2001) (9) Pineros et al. (2001) (10) Skerrett et al. (1994) (11) Wegner et al. (1994) (12) Köhler et al. (2000)

fenêtre de potentiel intermédiaire, pour laquelle la population de canaux n'est ni totalement ouverte ni totalement fermée, sera alors très étroite. Une population de canaux peu dépendante du voltage, c'est à dire avec des senseurs moins chargés sera dans un état intermédiaire sur une très grande gamme de potentiel.

Plusieurs canaux anioniques de la membrane plasmique sont activés par dépolarisation. Certains le sont faiblement: leur probabilité d'ouverture croît lentement de -200 à -100 mV pendant que la force électromotrice dans la même gamme de voltage décroît. Cela se traduit par une relative constance des intensités des flux d'anions transitant dans le pore du canal, et ceci, dans une gamme étendue de potentiels trans-membranaires. C'est le cas en particulier du canal de type lent des stomates de *Vicia faba* qui aux potentiels les plus négatifs n'est pas totalement fermé et qui atteint son maximum d'efflux d'anions à des potentiels relativement dépolarisés (Schroeder *et al.*, 1992). Sa dépendance vis à vis du voltage n'a pas été quantifiée mais au vu des différentes études, la charge mise en jeu dans la réponse au potentiel est de l'ordre de -1. A l'opposé, il existe des canaux activés par dépolarisation de manière très "brusque". C'est le cas de tous les canaux de type R, qui présentent une absence d'activité aux potentiels les plus négatifs et s'activent lors d'une dépolarisation dépassant leur potentiel d'activation pour atteindre une activité maximale à des potentiels de quelques dizaines de millivolts moins négatifs. Le canal GCAC1 (pour *Guard Cell Anion Channel*) est le premier à avoir été décrit comme ayant une telle dépendance vis à vis du voltage: son potentiel d'activation est de l'ordre de -100 mV et il atteint une ouverture maximale et un efflux maximal aux environs de -40 mV (Hedrich *et al.*, 1994a). Cela correspond à un senseur de voltage portant entre -3 et -4 charges équivalentes. De la même façon, le canal TSAC (pour *Tobacco Suspension Anion Channel*) (Zimmermann *et al.*, 1994) et le canal des cellules épidermiques de l'hypocotyle d'*Arabidopsis* (Thomine *et al.*, 1995) sont eux aussi activés efficacement par dépolarisation mais à des potentiels plus négatifs. Le pic de courant, c'est à dire le potentiel pour lequel l'activité est maximale, est alors de l'ordre de -100 mV. Dans les deux cas la charge apparente mise en jeu lors du phénomène d'ouverture par le voltage est de l'ordre de 4 (Thomine *et al.*, 1997a; Zimmermann *et al.*, 1994). Un peu plus loin, nous parlerons des régulations des canaux de type Rapide s'exerçant à travers un déplacement de la dépendance au voltage et donc du potentiel d'activation. Enfin, certains canaux sont activés lorsque l'on dépasse le potentiel d'équilibre des anions, et sont dit alors "canaux d'influx" ou "canaux rectifiant sortant". L'exemple le mieux détaillé est le canal des cellules de racine de blé (Skerrett *et al.*, 1994) dont le potentiel d'activation est de l'ordre de -30 mV.

Le canal anionique d'*Asclepias tuberosa* est au contraire activé par hyperpolarisation mais c'est, à ma connaissance, le seul exemple et celui-ci est relativement mal caractérisé (Schauf *et al.*, 1987).

Enfin, il existe des canaux végétaux dont l'activité n'est apparemment pas ou peu dépendante du voltage. C'est le cas des canaux activés par l'aluminium dans les racines des monocotylédons (Kollmeier *et al.*, 2001; Pineros *et al.*, 2001; Ryan *et al.*, 1995) ou par la lumière bleue dans l'hypocotyle d'*Arabidopsis* (Cho *et al.*, 1996).

Régulation par la tension membranaire

L'une des caractéristiques biophysiques des membranes que l'on peut imaginer varier couramment lors des processus physiologiques est la tension membranaire. Des

Tableau I-3: Caractéristiques électriques des canaux anioniques de la membrane plasmique (sauf cellules de garde et hors travaux du laboratoire) étudiés en patch-clamp. Suite.

Type de Canal	Type cellulaire (Espèce)	Dépendance vis à vis du voltage	Cinétiques	Sélectivité	Pharmacologie	Régulation	Fonction cellulaire
? (1)	Cellules en suspension (<i>Asclepias tuberosa</i>)	Activé par hyperpolarisation	Rapides (ordre: 10 ms)	N.D., étudié en Cl ⁻ interne	Zn ²⁺ , acide éthacrynique	Inhibé (dans 60% des cas) par 100 µM ABA Activité en burst	?
Type "Stretch" (2)	Cellules en suspension (<i>Nicotiana tabaccum</i>)	N.D.	N.D.	N.D., étudié en Cl ⁻ interne	N.D.	Activé par la tension de membrane (supérieure à 15 mm Hg)	Osmoregulation?
? (3)	Cellules en suspension (<i>Daucus carota</i>)	Activé par hyperpolarisation	Rapides (ms)	N.D., étudié en Cl ⁻ interne	N.D.	N.D.	Contrôle du potentiel de membrane? Osmorégulation ?
? (4)	Cellules en suspension (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	Activé par dépolarisation	Lentes	Etudié en Cl ⁻ interne Cl ⁻ =NO ₃ ⁻	N.D.	Activé par un ratio K ⁺ _e /Cl ⁻ _e inférieur à 0,1.	?
Lent? (5)	Cellules en suspension (<i>Coffea arabica</i>)	Activé par dépolarisation	Lentes (sec)	F ⁻ >NO ₃ ⁻ >Cl ⁻	N.D.	N.D.	?
? (5)	Cellules en suspension (<i>Coffea arabica</i>)	Non régulé par le potentiel	N.D.	F ⁻ >>NO ₃ ⁻ =Cl ⁻	N.D.	N.D.	?

(1) Schauf *et al.* (1987) (2) Falke *et al.* (1988) (3) Barbara *et al.* (1994) (4) Cerana *et al.* (1992) (5) Dieudonné *et al.* (1997)

canaux sensibles à cette tension et présentant une sélectivité en faveur des anions ont été décrits sur la membrane plasmique des cellules de garde de *Vicia faba* (Cosgrove *et al.*, 1991) ainsi que sur celle des cellules en culture de tabac (Falke *et al.*, 1988). La tension de membrane ayant un rôle activateur est évaluée dans le premier cas à 2 kPa et dans le second, supérieure à 20 kPa. Etant donné la forte turgescence des cellules végétales et la fonction des sels dans l'osmolarité, il est facile d'imaginer une fonction pour de tels canaux: il doit s'exercer de fortes tensions sur la membrane plasmique et leur activation leur permet d'agir un peu comme des soupapes cellulaires, re-larguant si nécessaire dans le milieu extracellulaire les surplus d'anions.

b- Régulation par des variations de paramètres intracellulaires

Le calcium cytosolique

Le calcium est un messager cellulaire secondaire primordial dans de nombreuses voies de signalisation (Sanders *et al.*, 1999), aussi bien chez les animaux que chez les végétaux. Ses concentrations cytosoliques varient du nanomolaire au micromolaire, et semblent réguler de nombreuses activités dont celles de transporteurs membranaires. Dans le cas des canaux anioniques de la membrane plasmique, en particulier pour les canaux de type rapide et lent des cellules de garde, des régulations par le calcium intracellulaire ont été décrites.

Le canal du type rapide des cellules de garde de *Vicia faba* est régulé par le calcium interne (Hedrich *et al.*, 1990) mais la démonstration en est très indirecte: l'augmentation du pouvoir tampon calcium de 1 mM EGTA à 10 mM empêche l'activation du canal par la perfusion de fortes concentrations de calcium dans le bain, indiquant ainsi que celui-ci agit par la face interne de la membrane. Le canal de type lent des cellules de garde de *Vicia faba* quant à lui est inactif en condition de faible calcium libre (10 nM) et s'active à de plus fortes concentrations (1500 nM) (Schroeder *et al.*, 1989; Schwarz *et al.*, 1998). Dans les deux cas, la régulation calcium, pourtant théoriquement primordiale, n'a pas été étudiée plus en détail. En revanche, dans le cas des cellules de garde d'*Arabidopsis thaliana*, et pour le canal à cinétiques lentes elle a été mieux quantifiée (Allen *et al.*, 1999b): la concentration induisant 50 % de l'activation est proche de 1,2 μM et l'activité fluctue beaucoup aux concentrations physiologiques $\square 0,1$ à 1 μM , mais cette régulation est indirecte et fait intervenir des étapes de phosphorylation. En effet, sans ATP ou avec 5 mM d'AMP-PnP, l'analogue non hydrolysable de l'ATP, le canal ne s'active plus en réponse au calcium. Enfin, les inhibiteurs de kinases K-252a ($\square 2 \mu\text{M}$) et staurosporine ($\square 50 \mu\text{M}$), empêchent cette activation même en présence de MgATP. Une autre quantification de l'effet du calcium est présentée dans la caractérisation du canal anionique des cellules du mésophylle. A une concentration de 0,1 μM le canal est fermé et l' EC_{50} est de 0,5 μM (Elzenga *et al.*, 1997a). Dans une autre étude, ces mêmes auteurs parlent d'une régulation par le calcium sur un canal qu'ils pensent être le même et dont l' EC_{50} est plus proche de 10 μM (Elzenga *et al.*, 1997b).

Le pH

Le canal anionique à cinétiques rapides des cellules de garde de *Vicia* est régulé par le pH intracellulaire (Schulz-Lessdorf *et al.*, 1996). En configuration cellule-entière, la fermeture dépendante du potentiel n'est pas affectée, mais des mesures en

canal unitaire montrent que les canaux sont recrutés lors d'une acidification (pKa 6,9). Par contre une des constantes cinétiques, l'inactivation lente, est sensible à la différence de pH de part et d'autre de la membrane et ralentit lorsque cette différence (pHi-pHo) croît.

Il existe peu d'étude de l'effet du pH sur les canaux anioniques de la membrane plasmique chez les plantes et cela malgré l'idée répandue qu'il s'agit d'un paramètre cellulaire crucial (Kurkdjian *et al.*, 1989). Pourtant, les canaux anioniques semblent intervenir dans des fonctions physiologiques requérant des variations de pH intra ou extracellulaire, comme l'élongation cellulaire (Thomine *et al.*, 1997b), l'homéostasie cytoplasmique (Johannes *et al.*, 1998) ou les réponses aux pathogènes (Nürnbergger *et al.*, 1994; Pugin *et al.*, 1997).

Les nucléotides

Les nucléotides font partie des molécules abondantes du cytosol. Ceux adénylés constituent une forme préférentielle de mise en réserve de l'énergie métabolique et ont une fonction dans la répartition de l'énergie vers les différentes activités cellulaires. Mais les nucléotides interviennent aussi dans des phénomènes de signalisation (□i) en servant de substrat aux nombreuses kinases du cytosol (□ii) en étant cofacteur des protéines G et (□iii) en interférant eux-mêmes avec certaines protéines.

Les canaux anioniques de la membrane plasmique peuvent être régulés par phosphorylation. Le canal TSAC (Zimmermann *et al.*, 1994), canal de type rapide, est modulé par le voltage transmembranaire et se ferme aux potentiels les plus négatifs en présence de 10 mM MgATP dans la solution de pipette. Cette dépendance vis à vis du voltage disparaît lorsque l'on ajoute 2 µM de staurosporine, un inhibiteur de certaines activités kinases, montrant donc qu'elle est causée par un phénomène de phosphorylation. En absence d'ATP, la conductance devient petit à petit non dépendante du voltage, probablement suite à la dilution des nucléotides endogènes et à la déphosphorylation du canal. L'acide okadaïque, un inhibiteur de phosphatase, permet le maintien de cette régulation par le potentiel même en absence de nucléotides dans la solution de pipette. Le canal de type lent des cellules de garde de *Vicia faba* est lui aussi régulé par des phénomènes de phosphorylation (Schmidt *et al.*, 1995): si la solution de pipette ne contient pas d'ATP, la conductance disparaît rapidement, mais il ne s'agit pas d'une régulation de la dépendance au potentiel de membrane. Le GTP ou l'AMP-PnP sont incapables de contrecarrer ce phénomène. En revanche, l'inhibiteur de kinase K-252a, en présence de 4 mM ATP, cause la disparition du courant et l'acide okadaïque □(100 nM) le maintient en absence d'ATP.

Dans le cas du canal anionique rapide des cellules de garde de *Vicia faba*, il existe aussi une régulation par les nucléotides, mais celle-ci fait intervenir un site de fixation et non des phénomènes de phosphorylation (Hedrich *et al.*, 1990). Sans nucléotide, l'activité des canaux est presque nulle, même dans des conditions de concentration en calcium favorables. Avec de l'ATP (1 à 2 mM), de l'ATPγS (100 µM), un analogue non hydrolysable de l'ATP, ou du GTPγS (100 à 200 µM) dans la solution de pipette le canal devient activable par le calcium cytosolique.

Le malate

Le canal anionique de type lent des stomates de *Vicia faba* a été décrit comme étant régulé négativement par le malate interne (Schmidt *et al.*, 1994). Il y est

perméant (150 mM dans la solution de pipette) et présente un potentiel de réversion cohérent avec cette perméation. Néanmoins, durant le scellement, son activité globale diminue, mais trop lentement pour être expliquée par une dilution d'un autre anion perméant présent dans le cytosol, et le potentiel de réversion se déplace vers 0 mV. Le mécanisme biophysique de cette régulation négative n'a pas été exploré à ce jour. Il s'agit là d'un premier exemple de régulation de l'activité d'un canal anionique par l'un de ses substrats.

c- Régulation par les composés du compartiment extracellulaire

Les anions externes

La régulation par le voltage du canal anionique du type rapide des stomates de *Vicia faba* est la cible de plusieurs modulations. Nous avons vu que le pH interne et externe étaient capables de l'affecter (Schulz-Lessdorf *et al.*, 1996). Un autre paramètre extracellulaire l'affectant également est le statut des anions. L'augmentation de la concentration externe en anions perméants provoque un déplacement du pic de courant vers des potentiels plus négatifs (Dietrich *et al.*, 1998; Hedrich *et al.*, 1993). Ce déplacement est définitif et correspond à une augmentation de l'activité du canal à des potentiels considérés comme physiologiques. Le malate a un effet similaire, à faible concentration ($K_m = 0,3$ mM (Hedrich *et al.*, 1994b)) mais il est transitoire (Hedrich *et al.*, 1993).

Hormones

Le patch-clamp, malgré ses contraintes (voir annexe A), a permis la mise en évidence de plusieurs régulations hormonales de canaux anioniques végétaux. La première est celle du canal à cinétiques rapides des cellules de garde de *Vicia faba* par l'auxine (Marten *et al.*, 1991): l'ajout de 1-ANA dans le bain provoque une activation du canal à travers le déplacement de sa régulation par le voltage vers des potentiels plus négatifs. Ce déplacement atteint une quarantaine de millivolts avec les doses maximum de 1-ANA. Deux critiques de ce travail sont que (i) l'auxine 2-ANA physiologiquement inefficace induit un effet comparable (Lohse *et al.*, 1995), (ii) les concentrations de 1-ANA induisant cet effet sont très fortes, cette régulation présentant un EC_{50} proche de 20 μ M. Plus tard, les auteurs ont montré que cette régulation avait lieu directement au niveau du canal par un site de fixation des anions externes (Lohse *et al.*, 1995).

L'acide abscissique est capable d'activer le canal anionique de type lent des cellules de garde d'*Arabidopsis thaliana* (Pei *et al.*, 1998; Pei *et al.*, 1997): pour que cette régulation soit observable, il est nécessaire de préparer les protoplastes avec ou sans 50 μ M ABA et le patch-clamp est utilisé pour révéler les activités de la membrane plasmique. Dans le cas de *Vicia faba*, une première étude (Schwarz *et al.*, 1998) a montré que l'activité du canal de type lent des stomates se maintenait dans le temps, en absence d'ATP dans la solution de pipette, si on perfusait dans le bain 100 μ M ABA. Une régulation directe par l'ABA a été décrite plus récemment (Li *et al.*, 2000), correspondant à un recrutement des canaux de type lent au cours du scellement en présence de 50 μ M ABA.

d- Conclusion sur la régulation des canaux anioniques

Les deux exemples de canaux les mieux caractérisés sont les canaux de type lent et rapide des cellules de garde de *Vicia faba*. Plusieurs équipes se sont attachées à décrire les régulations qui s'y exerçaient et arrivent à un nombre important de niveaux de régulation. Ceci est donc en accord avec le pronostic de fortes régulations des canaux anioniques de la membrane plasmique par les paramètres de l'environnement et les paramètres cellulaires: les anions ne "sortent" probablement qu'à des occasions bien particulières de la vie des cellules ou alors de façon relativement discrète.

Par exemple, le canal anionique lent nécessite d'être phosphorylé, en présence de calcium, et en absence de malate cytosolique pour être actif. Le canal de type rapide est quant à lui activé par le calcium cytosolique, seulement si le cytosol contient des nucléotides. Son activation requiert de plus un potentiel de membrane dépolarisé, c'est à dire inférieur au potentiel d'activation. Enfin, ce canal est modulé par des paramètres de l'environnement de la membrane, comme l'auxine ou les anions externes.

3- Les inhibiteurs de canaux anioniques permettent de "sélectionner" un canal de la membrane plasmique

Héritée des travaux concernant les canaux anioniques animaux (Greger, 1990), une série de molécules a été rassemblée sous le nom d'inhibiteurs de canaux anioniques et, depuis quelques années, utilisée sur les systèmes végétaux. Ces molécules appartiennent à différentes classes chimiques sans homologie de structure. Dans les systèmes animaux, ces molécules ont été utilisées pour mieux comprendre la structure des protéines formant les canaux anioniques et pour tenter de les purifier les protéines canal anioniques. Ainsi la famille des stilbènes, en particulier le H₂DIDS (pour *acide 4,4'-diisothiocyanodihydri-stilbène-2,2'-disulfonique*) a permis d'identifier précisément les résidus impliqués dans son interaction avec des transporteurs et donnés des renseignements quant à la structure de ces protéines (Gatto *et al.*, 1997; Okubo *et al.*, 1994). L'inhibiteur IAA-94 a permis la purification de la protéine p64 correspondant à un canal anionique intracellulaire (Landry *et al.*, 1989). Mais ces molécules sont aussi, comme leur nom l'indique, des bloqueurs de certaines activités canal anionique et ont été utilisées comme tels soit lors de la caractérisation de conductances ioniques en patch-clamp, soit pour impliquer des canaux dans des phénomènes intégrés à l'échelle de la cellule ou de l'organisme.

Dans les tableaux de 1-1 à 1-3 apparaissent les séquences de sensibilité des canaux anioniques végétaux de la membrane plasmique aux inhibiteurs usuels, lorsqu'elles ont été déterminées. Sauf exception, il ressort que les canaux végétaux sont peu sensibles aux inhibiteurs des canaux animaux et les doses utilisées, publiées dans les articles de patch-clamp ou lors d'approches physiologiques plus intégrées, sont souvent conséquentes. De plus, les canaux anioniques dont l'activité est dépendante du potentiel de membrane comme le canal R des cellules de garde de *Vicia faba*, ne subissent pas uniquement une diminution de l'activité quel que soit le voltage mais souvent aussi un déplacement du potentiel d'activation qui rend difficile la prévision quant à leur effet dans un système complexe (Marten *et al.*, 1992). Enfin,

dernier point intéressant justifiant l'utilisation de ces inhibiteurs, les différents canaux anioniques caractérisés sur un même membrane ne sont pas sensibles aux mêmes molécules. Par exemple, le canal anionique rapide des cellules de garde de *Vicia faba* est particulièrement sensible aux stilbènes comme le DIDS (Marten *et al.*, 1993), alors que le canal lent de ces mêmes cellules est bloqué par le NPPB (Schroeder *et al.*, 1993). Théoriquement, il est alors possible de bloquer spécifiquement l'un des différents canaux présents dans un même type cellulaire et donc de bloquer ou d'affecter la fonction cellulaire dans laquelle il intervient. Nous verrons dans le chapitre suivant, que ce raisonnement est suivi avec plus ou moins de résultats par toutes les personnes qui cherchent à comprendre la fonction des canaux anioniques des systèmes végétaux.

En conclusion, les inhibiteurs de canaux anioniques fournissent un outil intéressant pour la caractérisation des canaux et la compréhension de leur fonction à l'échelle de la cellule ou de l'organe. Néanmoins ils sont à utiliser avec précaution dans la mesure où ils sont peu spécifiques des protéines canal. On sait qu'ils sont capables d'inhiber des canaux anioniques dont les bases protéiques n'ont rien à voir entre elles mais aussi des activités n'ayant pas à ce jour de rapport avec des canaux anioniques. Par exemple, le DIDS affecte des canaux anioniques comme les CLC (Paulmichl *et al.*, 1993) ou le CFTR (pour *Cystic Fibrosis Transmembrane regulator*) (Linsdell *et al.*, 1996) mais est aussi capable d'inhiber chez la betterave, la conductance SV (pour *Slow Vacuolar*) qui s'est révélée être un canal cationique (Hedrich *et al.*, 1988). Le NPPB est capable d'inhiber une activité canal potassique chez le blé (Garill *et al.*, 1996).

4- Que peut on conclure des régulations caractérisées en patch-clamp quant à la fonction des canaux anioniques de la membrane plasmique?

Nous allons voir dans le chapitre suivant à travers certains exemples que la technique du patch-clamp, utilisée seule, ne permet pas de conclure quant à la fonction des activités décrites. En revanche, elle donne toute une série d'indices permettant soit de remonter vers leur rôle à l'échelle de la cellule ou de l'organe, soit de descendre vers l'étude de leur régulation cellulaire lors d'une fonction déjà décrite.

Les canaux anioniques de type lent, décrits à l'origine dans les cellules de garde des stomates, sont souvent peu régulés par le voltage et de façon très lente. Cela signifie que, quel que soit le potentiel de la membrane dans des gammes physiologiques de voltages, l'efflux d'anions autorisé par leur activation, est relativement constant. Ces canaux sont modulés généralement à travers des phénomènes de recrutement de population de canaux (par exemple par la phosphorylation, le calcium, l'acide abscissique...). Par opposition, les canaux anioniques de type rapide sont principalement régulés à travers la modulation de leur dépendance vis à vis du voltage. Dans le cas le mieux étudié à ce jour, le canal des cellules de garde de *Vicia faba*, de nombreux facteurs (hormones, anions, pH ...) sont capables de déplacer le potentiel d'activation, c'est à dire le potentiel à partir duquel la population de canaux sera significativement active. Cela fait de ce type de canal un senseur important, capable d'intégrer de nombreux stimuli de l'environnement.

C- Fonction des canaux ioniques: quelques beaux exemples ne rendent pas compte de la diversité des activités

Dans la partie précédente, nous avons vu qu'il existe des canaux anioniques sur la membrane plasmique des cellules végétales. Les canaux présentent des caractéristiques électrophysiologiques très diverses et sont régulés de façons variées et parfois opposées. Il est donc probable qu'ils interviennent dans des phénomènes physiologiques différents.

La figure I-3 résume les différentes localisations, dans la plante, des canaux anioniques décrits grâce à la technique du patch-clamp. A première vue, il semble que l'on trouve de telles activités sur les membranes plasmiques provenant de nombreux, voire de tous les types cellulaires. Ceci souligne l'importance probable de ces protéines. D'un autre côté, nous avons vu dans le chapitre précédent que ces canaux présentaient des caractéristiques électriques divergentes, ce qui semble indiquer qu'ils pourraient intervenir dans plusieurs fonctions bien distinctes.

Lors de la mise au point d'une approche de patch-clamp, les différentes équipes se sont d'abord focalisées sur des modèles pour lesquels il avait été démontré l'existence de canaux anioniques au niveau de la membrane plasmique. Ces indices étaient souvent le déclenchement d'efflux ou de dépolarisations en réponse à un stimulus particulier. Parmi ces modèles, les stomates se sont révélés un système de prédilection qui a donné satisfaction puisqu'on y a démontré à la fois l'implication de canaux anioniques dans des phénomènes de signalisation et dans des phénomènes d'osmorégulation.

1- Régulation négative du volume cellulaire: le modèle des cellules de garde des stomates

a- Les stomates: une structure simple subissant des variations de volume cellulaire en fonction de nombreux paramètres de l'environnement

Les stomates sont des structures situées généralement sur le limbe des feuilles des végétaux cormophytes et qui interviennent dans la régulation de la transpiration et des échanges gazeux entre la plante et son environnement. Un trou, nommé ostiole, est ménagé dans la cuticule par deux cellules accolées dites cellules de garde. Ces cellules peuvent subir des variations de volume relativement rapides qui conduisent à une modification de la taille de l'ostiole et donc à une modification des flux de transpiration et d'échanges gazeux avec l'atmosphère. Etant donné les nombreux stimuli que reçoivent les plantes et l'importance vitale de l'adaptation des échanges avec l'environnement, les stomates sont un point privilégié de l'intégration de l'information. De façon prévisible, de nombreuses études ont mis en évidence une quantité importante de signaux ayant un effet sur la turgescence et le volume des cellules de garde. Cette structure simple a l'avantage d'être facilement observable et est devenue petit à petit un modèle important sur lequel travaillent de nombreuses équipes dans le monde sur des phénomènes à la fois de transport et de signalisation (Schroeder *et al.*, 2001).

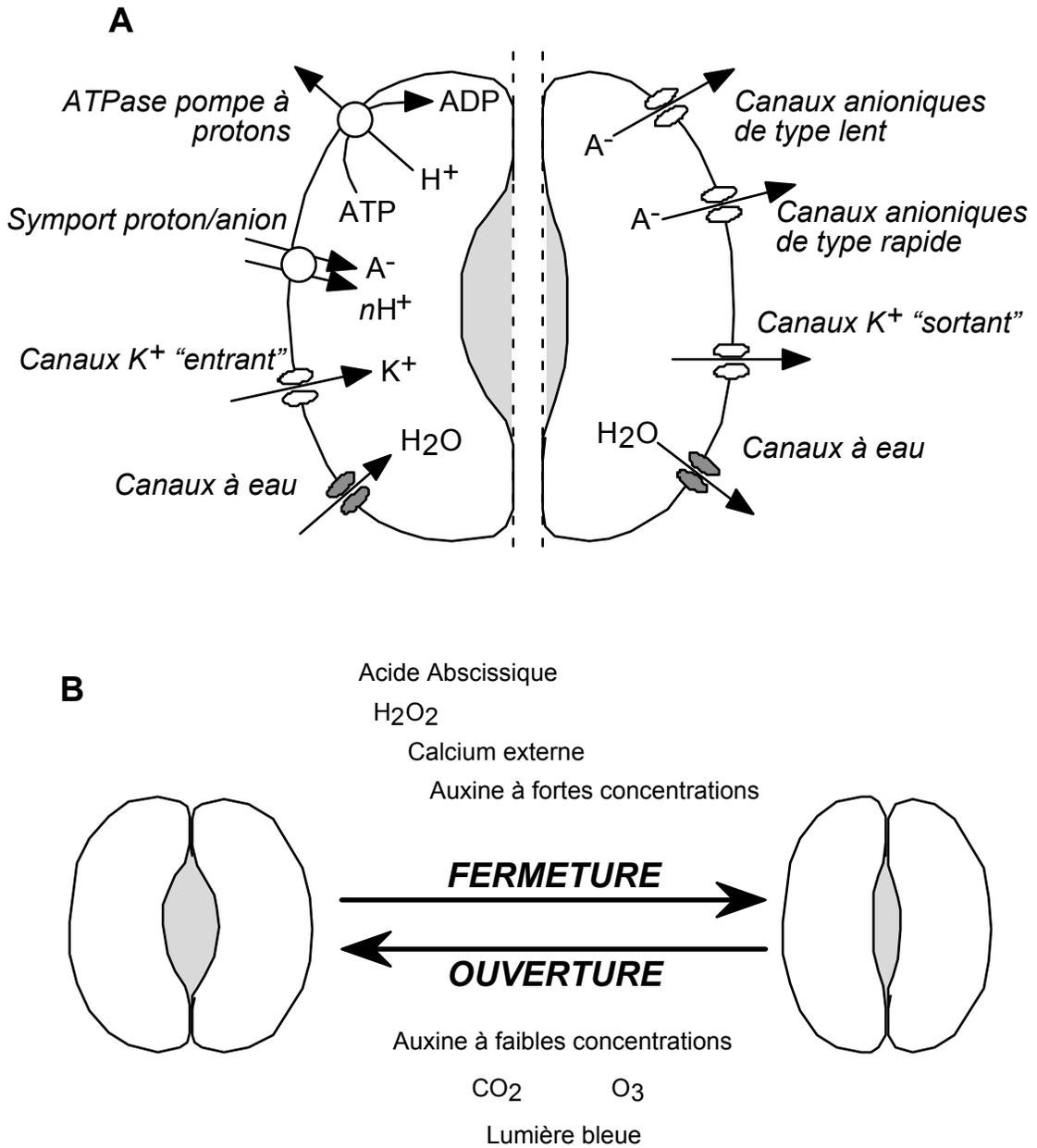


Figure I-4: Physiologie du mouvement stomatique. (A) Transporteurs de la membrane plasmique mis en jeu lors de l'ouverture (gauche) et lors de la fermeture (droite) des stomates . (B) Exemples de signaux capables de moduler l'ouverture de l'ostiole.

Les mécanismes biophysiques de variation du volume sont aujourd'hui bien décrits (figure I-4A). Lors de l'ouverture des stomates, une accumulation de sel de potassium dans les cellules de garde provoque un accroissement de la pression osmotique et donc un influx passif d'eau. Le volume de la cellule et sa turgescence augmentent conduisant à l'ouverture de l'ostiole. Le potentiel de membrane créé par la pompe à protons ATP-dépendant est responsable de l'énergisation du système nécessaire à l'influx des anions par des symports et à celui du potassium via des canaux potassiques rectifiants entrants. Conjointement à ces transports d'osmoticum, l'amidon est hydrolysé pour donner du malate. En réponse à cette augmentation de pression osmotique, un flux d'eau passe la membrane en partie grâce aux canaux de type aquaporine. Ces transporteurs situés au niveau de la membrane plasmique fonctionnent de manière coordonnée avec des transporteurs du tonoplaste permettant l'influx de sels dans le compartiment vacuolaire.

La fermeture se fait de façon opposée: les cellules de garde "relâchent" les sels dans l'apoplasme, phénomène qui s'accompagne d'un flux d'eau sortant et donc d'une diminution de la turgescence conduisant à la fermeture du stomate. Les transporteurs impliqués sont d'une part, et probablement de façon très précoce, des canaux anioniques autorisant l'efflux soutenu d'anions cytosoliques, et d'autre part des canaux potassiques rectifiants sortants, activés par la dépolarisation induite par les premiers (Ward *et al.*, 1995). Dans ce cas aussi, ce mécanisme est coordonné avec d'autres activités intracellulaires, en particulier avec les transporteurs de la vacuole, d'une part, et la synthèse d'amidon à partir du malate d'autre part.

Il est probable que le système soit très dynamique et qu'il existe un équilibre des activités entre la machinerie d'ouverture et celle de fermeture. Le comportement "net" du système est finement régulé par la perception de l'environnement. La figure I-4B présente quelques-uns des signaux capables de moduler les canaux dans le sens de la fermeture ou de l'ouverture de l'ostiole. Parmi ceux-ci on trouve des signaux endogènes comme des hormones (acide abscissique et l'auxine) et des signaux exogènes comme la lumière, le CO₂, etc...

Que ce soit dans le cas de l'ouverture ou de la fermeture de l'ostiole, les flux d'anions sont des éléments extrêmement importants et les stomates sont donc un système modèle pour l'étude de ces processus dans des phénomènes d'osmorégulation.

b- La fermeture du stomate en réponse à l'acide abscissique fait intervenir un canal nitrate à cinétiques lentes

L'acide abscissique est une hormone primordiale qui intervient, entre autres, dans des situations de stress, comme le stress osmotique. Elle a un fort effet sur les stomates, qu'elle ferme afin de réduire les pertes d'eau de la plante. De nombreuses expériences ont mis en évidence des efflux d'anions et une dépolarisation de la membrane plasmique en réponse à l'ABA (pour revue voir (Raschke *et al.*, 1988)), pouvant impliquer l'activation d'un ou de plusieurs canaux anioniques sur cette membrane.

La pharmacologie permet d'impliquer un canal de type lent dans la fermeture des stomates induites par l'ABA

Afin d'impliquer plus précisément des canaux anioniques, des approches pharmacologiques ont été conduites sur la réponse de fermeture des stomates en réponse à l'acide abscissique. Certains inhibiteurs de canaux anioniques réversent l'effet de l'hormone. Chez *Vicia faba* et *Commelina communis*, la fermeture à la lumière induite par 10 μ M d'ABA est totalement réversée par l'A9C (300 μ M), le probénécide (500 μ M) ou l'acide niflumique (20 ou 30 μ M selon l'espèce) (Schwartz *et al.*, 1995). De plus, 20 μ M de NPPB réversent totalement l'effet inducteur de fermeture de 50 μ M d'ABA + 40 mM de malate alors que le DIDS n'a pas cet effet (Schroeder *et al.*, 1993). Plus récemment, l'effet de l'ABA a pu être réversé par 10 μ M de glibenclamide, un inhibiteur des activités des protéines ABC (Leonhardt *et al.*, 1999).

L'investigation des populations de canaux anioniques de la membrane plasmique grâce à la technique du patch-clamp a révélé l'existence de trois types de canaux anioniques (voir tableau 1-1 et (Cosgrove *et al.*, 1991; Keller *et al.*, 1989; Schroeder *et al.*, 1992)) dont un est activé par la tension de membrane. Les deux autres, nommés canal rapide et canal lent, ont des activités régulées par le voltage et se distinguent en particulier par des cinétiques très différentes, ce qui leur a valu leur nom. Le profil pharmacologique du canal anionique de type lent (tableau 1-1) est le plus en adéquation avec celui de la réversion de l'effet de l'acide abscissique sur les stomates. Cette hypothèse a été confirmée par l'utilisation d'inhibiteurs de phosphatases et de kinases (Schmidt *et al.*, 1995): en patch-clamp, le canal de type lent des cellules de garde de *Vicia faba* est régulé par phosphorylation. Cette régulation a été retrouvée dans le cas des cellules de garde d'*Arabidopsis thaliana* (Pei *et al.*, 1997).

Ce n'est que récemment qu'une régulation directe d'un canal anionique de type lent par l'ABA a été montrée en patch-clamp, mettant un point final à la controverse portant sur la nature du canal d'efflux: chez *Vicia faba*, le canal anionique est actif constitutivement en patch-clamp. Sans MgATP dans la solution de pipette, son activité décroît au cours du temps, mais la perfusion de 100 μ M ABA contrecarre cette inhibition, maintenant probablement le canal dans un état phosphorylé (Schwarz *et al.*, 1998). La régulation directe a été confirmée par la suite (Li *et al.*, 2000). Enfin la technique du voltage-clamp révèle dans les cellules de garde de tabac, la régulation du canal par l'ABA (Grabov *et al.*, 1997).

Les voies de signalisation de l'ABA: une approche génétique renforcée par une approche électrophysiologique

Contrairement à ceux de *Vicia faba*, les protoplastes dérivés des cellules de garde d'*Arabidopsis thaliana* (Pei *et al.*, 1997) ne présentent que peu d'activité de canaux anioniques. En revanche, s'ils sont incubés avec 50 μ M ABA pendant une nuit, il est possible d'activer un canal anionique, qui, même s'il n'a pas été caractérisé en détail, ressemble à un canal de type lent.

L'utilisation d'*Arabidopsis* ouvre le champ de la génétique pour l'étude des voies de signalisation de l'acide abscissique dans les stomates. Les mutants dominants *abi1-1* (Leung *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1994) et *abi2-1* (Leung *et al.*, 1997) (pour *abscisic acid-insensitive 1* et 2), correspondent à des mutations ponctuelles dans les domaines catalytiques de deux protéines phosphatases 2C. Leur phénotype est une

insensibilité à l'acide abscissique pour la régulation de l'ouverture des stomates et une dormance réduite des graines. Utilisant la technique du patch-clamp, Pei et ses collègues ont montré que l'ABA était incapable d'activer le canal anionique chez *abi1* et *abi2* (Pei *et al.*, 1997). En revanche, l'inhibiteur de kinase K-252a (2 μ M) restaure partiellement l'activation dépendante de l'ABA chez le mutant *abi1* mais pas chez *abi2*, suggérant d'une part l'existence d'une protéine kinase, inhibée par le K-252a, en aval de ABI1 dans la voie de signalisation ABA, et révélant d'autre part une voie de signalisation parallèle à celle de ABI1, qui pourrait contenir ABI2. Une étude un peu différente a consisté à transformer des plants de tabac avec le gène muté et dominant *abi1* et d'appliquer la technique du voltage-clamp au stomate (Grabov *et al.*, 1997). Chez cette espèce, l'ABA induit un ralentissement des cinétiques d'un canal ressemblant au canal de type lent. Les stomates transformés avec la forme dominante de *abi1-1* ne présente aucune modification de cette régulation.

La régulation par le calcium, décrite dans les cellules de garde de *Vicia faba* (Schroeder *et al.*, 1989), a été reconsidérée chez des plantes d'*Arabidopsis thaliana* sauvage et chez les mutants *abi1* et *abi2* (Allen *et al.*, 1999a; Miyawaki *et al.*, 1997). Les sondes de calcium fura2 et indo1 et plus récemment la protéine chimère Caméléon (Allen *et al.*, 1999a) permettent de suivre finement les variations de calcium cytosolique par des techniques peu invasives. Chez ces plantes de type sauvage, 10 μ M d'ABA provoquent des oscillations caractéristiques du calcium cytosolique correspondant au maximum à une variation de concentration de l'ordre de 0,3 μ M. Chez les deux mutants de phosphatases 2C, cette réponse n'est que partielle (proche de 0,1 μ M). L'étude en patch-clamp du canal de type lent montre que le calcium active le canal uniquement en présence d'ATP, ce qui va dans le sens d'un phénomène de phosphorylation par des kinases en aval de l'étape calcium. Ceci est confirmé par l'utilisation de solutions de pipette sans nucléotide ou avec des nucléotides non hydrolysables. Les deux mutants *abi1* et *abi2* se comportent de la même façon, indiquant que les éléments phosphatase ABI1 et ABI2 sont situés à un niveau précoce dans la voie de signalisation ABA en amont de la régulation calcique. Des investigations ultérieures basées sur l'effet inducteur d'un "pulse" de calcium sur la fermeture des stomates permettaient d'imaginer l'intervention d'un canal calcique ouvert par l'ABA en réponse à une hyperpolarisation (Grabov *et al.*, 1998). De tels canaux ont été décrits par la suite chez *Vicia faba* (Hamilton *et al.*, 2000) et chez *Arabidopsis thaliana* (Pei *et al.*, 2000). Dans ce dernier cas, l'activation du canal par l'hormone passe par une production d'eau oxygénée et la protéine GCA2 (Pei *et al.*, 2000). En effet le mutant *gca2*, décrit à l'origine comme insensible à l'ABA sur un critère de croissance racinaire, ne présente plus au niveau des stomates l'activation du courant calcique en réponse à l' H_2O_2 .

Le mutant récessif hypersensible à l'ABA *era1-2* (pour *enhanced response to ABA*) correspond à une perte de fonction d'un gène codant pour une farnesyltransférase (Cutler *et al.*, 1996). Il est résistant à la sécheresse, par le fait que ses stomates sont constitutivement plus fermés que ceux du sauvage et car ils sont hypersensibles à l'ABA exogène. L'investigation en patch-clamp de ce mutant montre que le canal de type lent n'est pas activé sans ABA mais qu'avec un traitement de 50 μ M ABA, il présente une intensité de courant deux fois supérieure à celle du sauvage (Pei *et al.*, 1998). Ce phénotype ainsi que le phénotype d'hypersensibilité à l'ABA des stomates sont mimés par 2 μ M de HFPA (pour *acide α -hydroxyfarnesyl-*

phosphonique), un inhibiteur de farnesyltransferase. Les doubles mutants *eral/abi1* et *eral/abi2* présentent une restauration partielle de l'activation par l'ABA du canal anionique en patch-clamp ainsi qu'une faible réponse des stomates à l'hormone. Ceci semble confirmer que la voie de signalisation ABA est ramifiée et complexe.

Enfin, un dernière article à très récemment dévoilé par la génétique un nouvel élément tardif de la régulation du canal lent en réponse à l'ABA: les 2 allèles du mutant *gpa1* (pour *G protein alpha subunit*) correspondent à des pertes de fonction de la seule sous unité α de G protéine trimérique du génome d'*Arabidopsis thaliana* (Wang *et al.*, 2001). Chez ces plantes, et seulement dans certaines conditions de pH cytosolique, l'ABA n'est plus capable de fermer les stomates et d'activer le canal anionique de type lent. Ceci indique l'existence de deux voies parallèles dans la signalisation ABA, l'une passant par des variations de pH, l'autre par la G protéine.

Deux autres éléments de la voie de signalisation de l'ABA ont été mis en évidence dans des systèmes différents d'*Arabidopsis thaliana* et se sont révélés conduire à une activation des canaux. Un crible en ovocyte de xénope, basé sur l'activation de courant endogène sensible au calcium par l'acide abscissique, a permis l'isolation d'une syntaxine (Nt-Syr1), impliquée dans la signalisation ABA de façon précoce (Leyman *et al.*, 1999). Plus récemment (Li *et al.*, 2000), une kinase de *Vicia faba*, nommée AAPK (pour *ABA-activated serine-threonine protein kinase*) a été microséquencée puis clonée à partir d'un gel en 2 dimensions grâce à son activité, spécifiquement déclenchée par l'ABA. Des plantes transformées par le gène muté codant pour cette protéine AAPK(K43A), possédant une activité constitutive, présentent une réduction spécifique de la fermeture des stomates provoquée par l'ABA. De plus, l'investigation en patch-clamp montre que l'hormone n'est plus capable d'activer le canal anionique de type lent. Des homologues de ces deux protéines n'ont pas encore été à ce jour isolés chez *Arabidopsis thaliana* et il est difficile de concevoir la position de ces protéines dans le schéma touffu de la signalisation ABA sans l'aide de la génétique et l'utilisation de doubles mutants.

c- La voie de signalisation de fermeture des stomates en réponse au calcium extracellulaire passe elle aussi par un canal anionique de type lent

Le calcium extracellulaire est capable de provoquer la fermeture des stomates de façon plus ou moins efficace selon les espèces. Chez *Vicia faba*, 10 mM de CaCl₂ induisent seulement 30 % de fermeture alors que chez *Commelina communis*, 1 mM de CaCl₂ induit jusqu'à 80 % de fermeture (Leonhardt *et al.*, 1999). Dans les deux espèces, 10 μ M de glibenclamide, un inhibiteur de protéine ABC inhibant un canal de type lent, réversent cet effet, montrant alors que ce canal intervient dans la fermeture des stomates en réponse au calcium. Dans la même publication, et en jouant sur l'utilisation d'inhibiteur de protéine ABC et le NPPB, les auteurs ont démontré que la signalisation ABA passait par ce même canal. Il existe donc une convergence entre deux voies de signalisation et de perception des paramètres de l'environnement qui conduisent à l'activation du même canal anionique de type lent, un des moteurs de la baisse de turgescence des cellules de garde. Cette notion de convergence est importante, car elle explique que les canaux anioniques sont régulés de nombreuses façons. Il reste à savoir si la régulation de la fermeture des stomates par le calcium extracellulaire a une signification physiologique, ou si cela correspond à une

interférence avec le maillon calcium de la voie de signalisation ABA. Un élément de réponse est apporté par l'étude du mutant *det3* (pour *deetiolated 3*), possédant une mutation dans une protéine du complexe de l'ATPase vacuolaire (Schumacher *et al.*, 1999). Chez ce mutant, la signalisation calcique cytosolique fonctionne normalement en réponse à l'ABA et conduit à la fermeture des stomates, en revanche elle est aberrante en réponse à 1 mM de CaCl₂ externe et les stomates restent anormalement ouverts (Allen *et al.*, 2000). Ceci milite en faveur de l'existence de processus de signalisation distincts pour les deux signaux et en conséquence pour une signification physiologique de la fermeture des stomates en réponse au calcium extracellulaire. Des études récentes soulignent l'importance des paramètres des oscillations calciques dans la réponse stomatique (Allen *et al.*, 2001), mais les processus d'intégration du signal en amont des canaux anioniques restent à élucider.

d- Le modèle de variation réversible du volume des cellules de garde est-il applicable à d'autres types cellulaires?

Le canal à cinétiques lentes de la membrane plasmique des cellules de garde intervient donc dans la fermeture de l'ostiole des stomates, en permettant l'efflux de sels nécessaire à la baisse de la turgescence. La question se pose de savoir si ce modèle est un système spécifique de l'organe stomate en relation avec sa fonction ou s'il peut être généralisé à d'autres types cellulaires, en particulier des cellules "moins spécialisées". La modification de l'ouverture des stomates est tout à fait originale dans la mesure où il s'agit d'un phénomène réversible: les cellules de garde, selon les paramètres de l'environnement, se gonflent ou se dégonflent. La majorité des modifications de volume des cellules végétales n'ont pas cette caractéristique: il s'agit de processus d'élongation cellulaire, impliquant une modification des caractéristiques physiques de la paroi et une accumulation de composés constituant la cellule, dont des sels et de l'eau, mais aussi une grande quantité de protéines, de lipides, de composés de la paroi pectocellulosique, etc... En aucun cas elles ne sont réversibles. Or les canaux anioniques de la membrane plasmique, s'ils sont impliqués dans le moteur des modifications de volume, ne peuvent qu'intervenir dans la diminution, car leur ouverture cause un efflux d'anions.

2- La perception du signal lumière

Le signal lumière est perçu quantitativement et qualitativement par la plante grâce à plusieurs photorécepteurs tels les phytochromes, pour les longueurs d'onde rouges, et les cryptochromes pour la lumière bleue. Parmi les réponses précoces des cellules végétales exposées à la lumière, on observe souvent une modification des caractéristiques électriques membranaires comme le potentiel transmembranaire, logiquement provoquée par des modifications d'activités de certains transporteurs électrogènes.

Ainsi, en réponse à la lumière bleue, les cellules de l'hypocotyle de jeunes plantules étiolées de concombre (Spalding *et al.*, 1992a; Spalding *et al.*, 1988) et d'*Arabidopsis* (Cho *et al.*, 1996) présentent une dépolarisation transitoire (pouvant atteindre une centaine de millivolts), suivie rapidement par l'inhibition de l'élongation

de la tige (Cosgrove, 1981). Parmi les transporteurs affectés par cette dépolarisation de membrane, une approche pharmacologique a pu impliquer, grâce au cyanure et au vanadate, la pompe ATPase à protons et, grâce au NPPB, des canaux anioniques (Spalding *et al.*, 1992a): le NPPB (20 μM) bloque à la fois la dépolarisation de la membrane plasmique et l'inhibition de l'élongation produites par la lumière bleue.

Plus tard, chez *Arabidopsis thaliana*, il a été mis en évidence un canal anionique à forte conductance (Cho *et al.*, 1996): des protoplastes d'hypocotyle étioilé, préparés à l'abri de la lumière bleue et patchés en configuration cellule attachée -configuration avec laquelle les voies de signalisation sont probablement les plus intègres (voir annexe A)- présentent une activité canal anionique déclenchée par un pulse de lumière bleue et pouvant être inhibé par le NPPB ($\text{EC}_{50} < 5 \mu\text{M}$). Cette activation, chez *Arabidopsis*, pourrait être dépendante du calcium cytosolique (Lewis *et al.*, 1997) puisque 10 mM de La^{3+} inhibent complètement la dépolarisation induite par la lumière bleue et le canal de sélectivité anionique. La conclusion de ce travail est que l'activation d'un canal anionique est nécessaire à la transduction du signal lumière conduisant à l'inhibition de l'élongation, mais aussi à la mise en place du programme photomorphogénétique. En effet, le NPPB à une concentration de 20 μM , capable d'inhiber le canal anionique et la réponse de dépolarisation de la membrane, n'a pas d'impact sur le taux d'expression des gènes intervenant dans la synthèse des anthocyanes mais réduit la concentration d'anthocyanes de 72 % (Noh *et al.*, 1998). L'utilisation du mutant *hy4* (pour *hypocotyl 4*) (Ahmad *et al.*, 1993) semble indiquer qu'il existe deux voies contrôlant l'accumulation des composés anthocyanés: l'une régule l'expression des gènes de synthèses des anthocyanes, l'autre contrôle l'activation de cette voie de biosynthèse (Noh *et al.*, 1998). Ceci est confirmé par le suivi au cours du temps de l'élongation de l'hypocotyle de plantules sauvages et mutantes (Parks *et al.*, 1998).

La transduction du signal lumière bleue a aussi été étudiée à partir de protoplastes provenant de coléoptiles de maïs (Wang *et al.*, 1997) et d'hypocotyles d'*Arabidopsis thaliana* (Wang *et al.*, 1998) étioilés. En réponse à un pulse de lumière, ces cellules présentent une diminution momentanée de volume de l'ordre de 5 % correspondant à l'activation de transporteurs d'efflux et à une baisse consécutive de pression osmotique et du volume. Dans les deux cas, ce signal est réduit par le NPPB ce qui fait d'un canal anionique un élément clef dans la signalisation/réponse à la lumière bleue.

Dans le cas des cellules de mésophylle de pois, la lumière blanche induit une dépolarisation lente et transitoire de la membrane plasmique (Elzenga *et al.*, 1995). La perfusion de concentrations croissantes (de 1 à 100 mM) de chlorure ou de 15 mM nitrate réduit fortement son amplitude, suggérant qu'un canal anionique pourrait être la principale conductance mise en jeu lors de la phase de dépolarisation. Cette dépolarisation, observée dans les cellules du mésophylle, est très différente de celle de la membrane des cellules épidermiques en réponse au même signal, dont la principale composante ionique pourrait être un influx de calcium. Une investigation utilisant la technique du patch-clamp a permis la caractérisation d'un canal anionique, qui, en configuration cellule attachée, est activé par la lumière blanche (Elzenga *et al.*, 1997a).

Au niveau des stomates de *Vicia faba*, le passage de la lumière blanche à l'obscurité provoque une lente dépolarisation de la membrane plasmique (Roelfsema

et al., 2001) en même temps que la fermeture de l'ostiole (Felle *et al.*, 2000). La courbe courant-voltage déduite d'expériences en voltage-clamp montre l'apparition d'un courant entrant peu dépendant du voltage, qui pourrait être anionique. Si les trois canaux dont nous avons déjà parlé sont les seuls présents sur la membrane plasmique, ces caractéristiques correspondent plutôt au canal de type lent (Schroeder *et al.*, 1992) et ces expériences sont un nouvel exemple d'un canal anionique à la confluence de plusieurs voies de signalisation.

3- Communication longue distance

Les potentiels d'action (PA) sont des dépolarisations transitoires de la membrane plasmique observables chez les végétaux et comparables aux variations de potentiel observés le long des axones chez les animaux (Hille, 1992). Ils ont été décrits aussi bien chez les algues (Hope *et al.*, 1975; Williamson *et al.*, 1982) et les champignons (Slayman *et al.*, 1976) que chez les plantes supérieures (Zawadski *et al.*, 1991).

Dans le cas de l'algue *Chara*, la technique de voltage-clamp a permis de comprendre quelles étaient les différentes étapes du potentiel d'action (Kourie, 1994). Une entrée de calcium semble être l'un des événements initiateurs du potentiel d'action, mais la dépolarisation principale serait due à l'activation de conductances anioniques et la repolarisation probablement à des conductances potassiques. Ce phénomène intervient chez les algues dans des phénomènes de réajustement osmotique: l'efflux de sel de potassium à l'occasion d'un potentiel d'action est loin d'être négligeable. Chez les plantes supérieures, les potentiels d'actions, couplés à des ondes plus lentes ont été décrits dans plusieurs espèces (Thain *et al.*, 1993) et semblent pouvoir être propagés de cellule à cellule. Malgré un certain nombre d'expériences relatées dans la bibliographie, les transporteurs mis en jeu, et en particulier l'intervention de canaux anioniques dans les phases de dépolarisation, ne sont pas clairement identifiés. Néanmoins certains auteurs ont pu corréler les potentiels d'action avec des efflux d'ions chlorures chez *Mimosa pudica* (Abe, 1981).

Les potentiels d'action propagés sont véhicules d'information: ainsi chez *Mimosa pudica*, ils interviennent dans le repliement de l'ensemble des pétioles foliaires en réponse à un toucher localisé. Dans le cas de la tomate, le potentiel propagé induit par la blessure permet l'expression délocalisée du gène *pin* (pour *Protein inhibitor*) et correspond probablement à l'acquisition de défense par la plante contre les insectes (Stankovic *et al.*, 1996; Wildon *et al.*, 1992). Chez *Bidens pilosa*, des dépolarisations propagées de la membrane seraient d'une part impliquées dans le choix du bourgeon axillaire lors de la levée de la dominance apicale (Frachisse *et al.*, 1985), et d'autre part capables d'induire l'expression de certains gènes (Vian *et al.*, 1996).

4- Implication de canaux anioniques dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques

a- Stress abiotique racinaire: des canaux impliqués dans la résistance au cation toxique Al^{3+}

L'aluminium est présent naturellement dans les sols (Ma, 2000). Dans certains cas l'acidité des sols libère la forme Al^{3+} , toxique à forte concentration pour les plantes supérieures et inhibant fortement la croissance. Parmi les moyens de lutte des racines mis en jeu à son contact, on observe une exsudation racinaire, localisée à l'apex (Ryan *et al.*, 1995), d'acides organiques comme le malate (Delhaize *et al.*, 1993), le citrate, l'oxalate ainsi que de phosphate. Ces anions, au contact de la racine, réduisent la concentration du cation libre (et toxique) en le complexant (Delhaize *et al.*, 1995). Parce que de tels anions sont majoritairement synthétisés et accumulés dans les cellules végétales et parce que la membrane plasmique est hyperpolarisée, des canaux anioniques perméables aux acides organiques sont de bons candidats pour être à la base de ces exsudats déclenchés par l'aluminium. Une approche visant à les caractériser chez le blé est venue confirmer cette idée puisque les exsudats sont réduits efficacement par certains inhibiteurs de canaux anioniques tel que l'acide niflumique, le NPPB, l'IAA-94 et l'A9C (Ryan *et al.*, 1995).

Sur des protoplastes d'un cultivar résistant à l'aluminium (ET8), ces mêmes auteurs ont pu finalement caractériser en utilisant la technique du patch-clamp un canal anionique à large conductance (Ryan *et al.*, 1997), perméable au malate (Zhang *et al.*, 2001), inhibé par l'acide niflumique et activé par l'aluminium plus ou moins rapidement dans 55 % des cellules (Ryan *et al.*, 1997). De façon intéressante, les protoplastes provenant d'un cultivar très proche, mais sensible à l'aluminium (ES8) ne présentent qu'une conductance réduite (2/3 inférieure), s'activant beaucoup plus lentement (Demi temps d'activation = 36,0 min contre 9,1 min) et concernant moins de protoplastes (11 % contre 39 % lors de l'expérience) (Zhang *et al.*, 2001). La question se pose de savoir quel est le locus responsable de la divergence entre les deux cultivars et ce qu'il code.

Le mécanisme d'activation, la voie de signalisation et le récepteur à l'aluminium sont encore inconnus. Néanmoins plusieurs auteurs ont décrit des temps de latence entre la mise en contact des racines avec l'aluminium et le début des exsudats, indiquant qu'il existe une voie de signalisation complexe et que l'aluminium n'interagit pas directement avec le système d'efflux. Plus récemment, l'inhibiteur de protéine kinase K-252a (1 μ M) s'est révélé capable de réduire les exsudats racinaires de blé (cultivar résistant à l'aluminium Atlas) et d'inhiber une activité kinase (42 kD) en gel, activée précocement (< 5 min) par l'aluminium (Osawa *et al.*, 2001). Ceci est le premier élément de caractérisation de la voie de signalisation Al^{3+} chez les végétaux.

Parallèlement à ces approches sur le blé, d'autres auteurs se sont focalisés sur le maïs et ont caractérisé des canaux anioniques activés par l'aluminium (Kollmeier *et al.*, 2001; Pineros *et al.*, 2001). Le DIDS et l'acide niflumique (100 μ M) réversent l'effet de 50 μ M Al^{3+} sur les exsudats racinaires et inhibent un canal anionique, perméable au malate et au citrate (Kollmeier *et al.*, 2001), très comparable à celui décrit chez le blé. Un des canaux anioniques (Pineros *et al.*, 2001), est activable de

façon réversible en configuration canal unitaire, ce qui semble indiquer qu'un des systèmes de perception de l'aluminium se trouve au niveau du canal ou que la perception et la courte voie de signalisation de cet événement sont localisées au niveau de la membrane plasmique. Ce résultat est apparemment en opposition avec les réponses décrites chez le blé où l'on observe une activation de protéines solubles telles une protéine kinase de 28 kD en amont de l'activation du canal (Osawa *et al.*, 2001). Ceci souligne la complexité probable et la variabilité interspécifique de la réponse à l'aluminium dans la racine.

b- Réponse d'efflux au stress hypoosmotique

Le choc hypoosmotique est une situation de stress, à laquelle sont probablement régulièrement soumises les cellules végétales, par exemple lors de pluie diluante au contact des feuilles et des racines. Le gradient osmotique de part et d'autre de la membrane plasmique est alors brusquement accru et cela se traduit par un influx passif d'eau dans la cellule et consécutivement une augmentation de la turgescence et du volume. Parmi les réponses extrêmement précoces visant à rétablir un équilibre d'osmolarité, intervient l'efflux d'ions et d'osmotica via les canaux. Chez les cellules en culture d'*Arabidopsis thaliana*, un choc hypo-osmotique de 100 mOsm provoque une augmentation des efflux de chlorure marqué ($^{36}\text{Cl}^-$) de l'ordre de 10 à 20 fois dans les 15 premières minutes (Teodoro *et al.*, 1998). Une préincubation de 300 μM A9C ou de 100 μM NPPB réduit l'effet du choc osmotique sur l'efflux de chlore de 50 %.

Dans le cas des cellules en culture de Tabac, un choc osmotique (Cazalé *et al.*, 1998) induit un burst oxydatif, une alcalinisation extracellulaire ainsi que des efflux de potassium et d'anions. Ces derniers sont fortement réduits par 100 μM de NPPB, A9C et DIDS, respectivement de 100, 80 et 60 %. De façon intéressante, ces mêmes molécules aux mêmes concentrations, induisent des inhibitions comparables du burst oxydatif, ce qui indique que les canaux anioniques activés en réponse au choc hypoosmotique n'ont pas uniquement une fonction dans l'osmorégulation mais interviennent peut-être aussi dans la signalisation osmotique qui conduit au burst oxydatif mais pas à l'activation des MAP Kinases (Cazalé, 1999).

Les approches de patch-clamp ont permis de caractériser des canaux anioniques activés par la tension sur les membranes plasmiques végétales de cellule en culture de tabac (Falke *et al.*, 1988) ou des cellules de garde de *Vicia faba* (Cosgrove *et al.*, 1991). La littérature ne contient que peu de résultats à leur sujet mais on peut s'attendre à les trouver dans un grand nombre de types cellulaires chez les végétaux car ce sont de bons candidats pour intervenir précocement dans les flux d'anions observés en réponse au choc hypoosmotique.

c- L'efflux d'anions: une réponse précoce lors de l'interaction plante-pathogène

L'interaction entre une plante et un pathogène, tels certaines bactéries ou des champignons, provoque de la part de la plante toute une série de réactions apparemment complexes dites réactions de défense (Scheel, 1998; Yang *et al.*, 1997). Selon les cas, elles conduisent la plante à une résistance aux pathogènes ou parfois ne sont pas suffisantes pour stopper sa progression ce qui aboutit à une attaque massive de la plante. La plante possède donc dans de nombreux cas des récepteurs qui lui

permettent de "ressentir" une attaque et y répondre efficacement de façon plus ou moins adaptée. Les étapes de cette réponse sont complexes et leur ordre n'est pas vraiment bien établi. Quelques minutes après l'interaction, on observe des modifications des flux ioniques au travers de la membrane ainsi que la production de formes activées d'oxygène et des modifications de phosphorylation des protéines, puis à l'échelle de quelques heures, une synthèse de protéines comme les PR (pour *Pathogenesis-Related*), une modification de la composition de la paroi de la cellule, comme un dépôt de callose conduisant à une résistance accrue à la pénétration. Dans certain cas, la propagation de signaux systémiques médiés par des hormones telles l'acide salicylique et l'acide jasmonique conduit des tissus éloignés du site d'infection à adopter une stratégie de défense. L'intensité et la rapidité de ces différentes étapes sont très variables, dépendantes de la nature du pathogène et de l'aptitude de la plante à faire face à l'infection.

Parmi les étapes précoces, on observe la modulation d'activité de transporteurs de la membrane plasmique comme l'ATPase pompe à protons et des canaux cations et anions. Ainsi, un peptide de 13 acides aminés, Pep-13, provenant d'une glycoprotéine du champignon *Phytophthora megasperma*, provoque un efflux d'anions à partir des cellules de persil (Nürnberg *et al.*, 1994). Il est en est de même avec la cryptogéine, un éliciteur de *Phytophthora cryptogea*, sur les suspensions cellulaires de tabac (Pugin *et al.*, 1997). Ces efflux d'anions sont des événements cruciaux dans les voies de transduction des éliciteurs. En effet, leur inhibition par des inhibiteurs de canaux anioniques conduit à l'interruption des réactions de défenses développées ultérieurement (Jabs *et al.*, 1997). La question de savoir s'ils correspondent uniquement à des phénomènes de signalisation ou s'ils ont eux-mêmes une action sur le pathogène n'est pas encore tranchée.

De par le potentiel de la membrane plasmique, très négatif, et l'accumulation des anions dans les cellules végétales, les phénomènes diffusifs sont suffisant pour expliquer les efflux d'anions observés en réponses aux éliciteurs. Néanmoins, l'activité responsable de ces efflux n'est pas encore caractérisée. Sur une base pharmacologique, il semble qu'un canal de type rapide pourrait être activé (Zimmermann *et al.*, 1998a) mais aucune preuve directe n'a pour l'instant été apportée.

5- La perception de doses supraoptimales d'auxine

La réponse des cellules végétales à la phytohormone auxine est complexe et conduit à des réponses à court, moyen et long terme, variant beaucoup d'un organe à l'autre. Parmi les réponses précoces, une modification des activités des transporteurs de la membrane plasmique conduit à des modifications des caractéristiques électriques.

A des concentrations relativement faibles d'hormone, dites infraoptimales, la membrane plasmique subit une rapide hyperpolarisation correspondant, sur des bases de flux de protons, à une activation des pompes ATPases de la membrane (Felle *et al.*, 1991). Lors de phénomènes d'élongation cellulaire en réponse à l'auxine, cette activation de la pompe est primordiale car elle conduit à l'acidification de l'apoplasme et à l'assouplissement nécessaire et expérimentalement observé de la paroi pecto-cellulosique (Cosgrove, 1997). A des concentrations plus fortes, dites supraoptimales,

l'auxine induit plutôt une dépolarisation de la membrane plasmique dont la cause n'est pas identifiée.

Au laboratoire, une approche développementale et pharmacologique mise au point sur l'hypocotyle d'*Arabidopsis thaliana* a apporté des arguments en faveur de l'implication de canaux anioniques en réponse à l'auxine. Des plantules ayant poussé à l'obscurité sont caractérisées par un phénotype étiolé. Celui-ci se manifeste en particulier au niveau de l'élongation de l'hypocotyle puisque ce dernier atteint la taille de 18 mm (alors qu'à la lumière, il mesure 2 mm). L'application exogène d'auxine, comme du 1-ANA à la concentration de 1 μM , a comme effet de réduire cette élongation de 60 à 90% (Thomine *et al.*, 1997b). Cette inhibition est réversée par des inhibiteurs de canaux anioniques comme le DIDS et l'A9C, ces résultats pouvant être lus au niveau de l'organe (longueur de l'hypocotyle) et au niveau cellulaire (longueur des cellules épidermiques). L'effet des inhibiteurs de canaux anioniques est spécifique de la réponse de l'hypocotyle aux auxines, puisque ni l'A9C ni le DIDS ne sont capables de réverser l'inhibition de l'élongation par les cytokinines ou l'éthylène.

On peut concevoir une autre fonction pour les canaux anioniques de la membrane plasmique dans les phénomènes de réponse à l'auxine, mais cette fois à des concentrations infraoptimales. La pompe ATPase est fortement activée et interviendrait, dans la théorie de la croissance acide, dans le relâchement de la paroi pectocellulosique nécessaire à l'élongation cellulaire. Keller et van Volkenburgh se sont intéressés à la réponse électrique membranaire à l'auxine dans les cellules de coléoptiles d'avoine (Keller *et al.*, 1996). Celle-ci est caractérisée par une courte dépolarisation puis une hyperpolarisation attribuée à l'activation de l'ATPase pompe à protons. Cette dépolarisation étant atténuée par un inhibiteur des canaux anioniques (100 μM de NPPB) et sensible à la concentration des anions externes, les auteurs ont conclu que la réponse électrique était vraisemblablement due à une conductance anionique. Ces mêmes conditions modèrent le taux d'élongation de segments de coléoptiles d'avoine induit par l'auxine, amenant de cette façon un premier argument en faveur de l'implication de canaux anioniques dans l'élongation, en tant que partenaire de la pompe ATPase.

Nous avons vu que certains canaux anioniques de type rapide de la membrane plasmique répondaient à l'auxine par un déplacement de leur ouverture dépendante du voltage vers le potentiel de repos de la membrane, ce qui correspond donc à une activation. C'est le cas en particulier du canal anionique R des cellules de garde de *Vicia faba* (Marten *et al.*, 1991) et de TSAC (pour *Tobacco Suspension Anion Channel*) (Zimmermann *et al.*, 1994). Dans les deux cas, les doses employées, de l'ordre respectivement de 20 et 10 μM suggèrent leur implication dans les réponses aux doses supraoptimales. Néanmoins depuis ces publications, aucun nouvel argument direct n'a été apporté au sujet de la régulation des canaux anioniques par l'auxine.

6- Transport des anions: un canal d'influx pour charger la racine et des canaux d'efflux pour charger le xylème

L'absorption des anions du sol au niveau de la racine se fait majoritairement dans la zone différenciée portant les poils racinaires. Du fait du potentiel électrochimique des anions, très peu en faveur d'une entrée diffusive, il est probable

que ce soit des cotransports protons/anions qui soient responsables de cet influx dans les conditions classiques. Et effectivement de tels transporteurs ont été caractérisés fonctionnellement et les ADNc correspondant clonés (Forde, 2000; Smith *et al.*, 2000). Néanmoins, sur les cellules de racines de blé (*Triticum sativum*), un canal anionique a été décrit en patch-clamp présentant les caractéristiques d'un canal d'influx, en particulier ayant une activité régulée par le voltage et s'activant à des potentiels moins négatifs que le potentiel d'équilibre des anions (Skerrett *et al.*, 1994). De telles conditions, soit de dépolarisation, soit d'augmentation des concentrations anioniques extracellulaires, n'ont pas été décrites et ne doivent arriver que très occasionnellement. Les auteurs pensent que dans les cas particuliers de fortes concentrations en NaCl dans le voisinage de la racine, ce canal pourrait permettre l'entrée d'anions suite à la dépolarisation induite par l'entrée de Na⁺.

Les anions, activement prélevés dans le milieu par les transporteurs ou par diffusion grâce à des canaux anioniques entrants, traversent le cortex jusqu'au parenchyme xylémien, d'où ils passent dans les vaisseaux du xylème. Ce dernier phénomène qui correspond à un efflux des cellules parenchymateuses, peut tout à fait être expliqué par la présence de canaux anioniques ouverts sur la membrane plasmique. Des études en patch-clamp révèlent l'existence d'au moins trois conductances sur la membrane plasmique de protoplastes dérivés de tels tissus chez l'orge (Köhler *et al.*, 2000; Wegner *et al.*, 1994). Ces canaux présentent des caractéristiques tant de régulation par le voltage que par le calcium très différentes les unes des autres. Les auteurs ont émis l'hypothèse que certains d'entre eux, et en particulier le canal X-QUAC (pour *Xylem-Quickly Activated Anion Channel*), travaillant en "tandem" avec le canal potassique KORC (pour *K⁺ Outward Rectifier Channel*), pourraient être responsables de l'efflux de sel nécessaire au chargement du xylème. Les preuves sont difficiles à apporter car le système est assez inaccessible et probablement difficile à étudier.

Tableau I-4 : Les différentes familles de gènes codant potentiellement pour des canaux anioniques et leurs membres chez les végétaux...

Famille	Chez les animaux...	...et chez les végétaux.
Chloride Channel (CLC)	Voir texte	Voir texte
Voltage Dependent Anion Channel (VDAC)	Voir texte	Voir texte
ATP Binding Cassette (ABC)	Voir texte	Voir texte
Aquaporine (AQP)	Voir texte	Voir texte
Swelling-activated Chloride Channel (regulator) (pClIn)	Au départ décrits comme des canaux (1). Semblent aujourd'hui plutôt être des éléments de la perception du gonflement conduisant aux flux d'anions (2)	1 homologue possible (BAA97193)
Phospholemman	Petits peptides de 8 kDa provoquant des conductances anioniques en ovocytes de Xénope (3)	En raison de leur très petite taille (de l'ordre de 70 acides aminés), il est difficile de déterminer par des approches bio-informatiques si le génome d' <i>Arabidopsis thaliana</i> possède des homologues.
Intracellular Chloride Channel (CLIC/p64)	Plusieurs gènes chez les mammifères avec une sélectivité anionique (4,5)	Non. Homologie avec des gènes notés "dehydroascorbate reductase" (AAG40196.1 et AAG24946.1)
Calcium Activated Chloride Channel (ClCa ²⁺ C)	Plusieurs gènes clonés chez les mammifères (6). Canaux de sélectivité anioniques activables par le calcium (7)	Non
Excitatory Amino Acid Transporteur (EAAT) / Alanine Serine Cysteine Transporteur (ASCT)	Famille de transporteurs d'acides aminés dont certains ont des activités de type canaux anioniques (8,9,10,11)	Non
Ligand Activated Ion Channel (LGIC)	Famille nombreuse comprenant des canaux cationiques (récepteurs à acétylcholine et au glutamate) et des canaux anioniques (récepteur GABA et à la glycine, canaux GluCl)	20 gènes de la famille des récepteurs au glutamate (12) Voir texte

(1) Paulmichl *et al.* (1992) (2) Krapivinsky *et al.* (1994) (3) Moorman *et al.* (1992) (4) Landry *et al.* (1989) (5) Landry *et al.* (1993) (6) Agnel *et al.* (1999) (7) Fuller *et al.* (1994) (8) Fairman *et al.* (1995) (9) Fairman *et al.* (1999) (10) Zerangue *et al.* (1996) (11) Bröer *et al.* (2000) (12) Lacombe *et al.* (2001)

D- Support moléculaire des canaux anioniques végétaux de la membrane plasmique

La question de la nature moléculaire des canaux anioniques chez les végétaux et plus particulièrement dans le cas des canaux de la membrane plasmique n'est pas tranchée à ce jour. Néanmoins, plusieurs groupes ont spéculé sur cette nature en se basant sur des comparaisons de caractéristiques biophysiques, cinétiques et pharmacologiques. Mais ces différents travaux n'ont pas conduit à identifier clairement les gènes codant les conductances anioniques.

Dans cette partie, j'ai cherché à établir un bilan de nos connaissances sur la base moléculaire des conductances anioniques chez les végétaux. Nous passerons en revue plusieurs familles de gènes candidates travaillées dans divers laboratoire. Le séquençage total du génome d'*Arabidopsis* (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), ouvre de nouvelles possibilité pour l'identification de ces gènes.

1- Il existe dans le génome des plantes des gènes codant des protéines homologues à des canaux anioniques

Le séquençage du génome d'*Arabidopsis thaliana* est venu récemment compléter les données accumulées sur les différentes familles de gènes décrits chez les plantes. Il est désormais possible d'avoir une idée du nombre et de la taille des familles de gènes présentes chez certains organismes et codant pour une protéine ayant une activité canal anionique démontrée. C'est le cas, chez les animaux d'au moins neuf familles de gènes (tableau I-4). Parmi celles-ci, les plantes semblent posséder de façon certaine des gènes de type Chloride Channel (CLC), ATP Binding Cassette (ABC), Voltage-Dependant Anion Channel (VDAC), aquaporine (AQP) et Ligand-Activated Ion Channel (LGIC). La partie suivante évoque ces quelques familles, les preuves de leur nature de canal anionique chez les animaux et les travaux entamés chez les végétaux. Dans le cas de protéines de type phospholemman, rien n'est connu chez les végétaux, y compris en ce qui concerne d'éventuels homologues dans les banques de séquences, en raison de leur très petite taille, ainsi ne peut-on exclure avec certitude leur existence chez les végétaux.

a- La famille des CLC (pour Chloride Channel)

Par une approche de biochimie des protéines, le premier CLC, nommé CLC-0 a été cloné à partir de l'organe électrique du poisson torpille *Torpedo marmorata* (Jentsch *et al.*, 1990). Des protéines homologues ont ensuite été trouvées chez les mammifères, la levure et les procaryotes. Il s'agit de protéines comprenant de 10 à 12 domaines transmembranaires (Schmidt-Rose *et al.*, 1997), dont l'expression hétérologue montre, lorsqu'elle est possible, qu'elles forment des canaux présentant une conductance originale impliquant deux pores (Bauer *et al.*, 1991). Des données de cristallographie sont venues valider cette organisation en dimère (Mindell *et al.*, 2001). Aujourd'hui cette famille qui compte 9 membres chez l'homme, fait l'objet d'études poussées ayant donné une littérature abondante (Jentsch *et al.*, 1999). Certaines

maladies génétiques telles certaines myotonies ou la maladie de Dent (Jentsch, 1996), sont causées par des mutations dans ces gènes. La localisation subcellulaire des CLC animaux est multiple puisque certains sont présents sur la membrane plasmique alors que d'autres pourraient avoir une localisation sur les endomembranes. L'expression hétérologue des CLC animaux a été possible dans de nombreux cas et les CLC ont apparemment des caractéristiques électriques aussi variées (Foskett, 1998) que leur localisation, rendant difficile la comparaison avec les activités décrites chez les plantes.

Les gènes de la famille CLC sont aussi présents chez les végétaux. Ils ont été clonés par homologie de séquences, d'abord chez *Nicotiana tabacum* (Lurin *et al.*, 1996) (CLCNt1 et 2) puis chez *Arabidopsis thaliana* (Hechenberger *et al.*, 1996) dont le génome contient 7 représentants recensés (AtCLC-a à AtCLC-g). Les tentatives d'expression hétérologue visant à retrouver une activité canal anionique aux caractéristiques connus semblent avoir échoué: l'expression de CLCNt1 caractérisée en ovocyte de xénope (Lurin *et al.*, 1996) pourrait selon les auteurs correspondre à une activité endogène dérégulée par l'apport d'ARN exogènes (Lurin, 1998).

La majeure partie des CLC végétaux appartiennent à une branche de l'arbre-dendrogramme des CLC dont les membres ont une localisation endomembranaire. Et en effet, la seule tentative de localisation subcellulaire d'un CLC végétal a montré que CLCNt1 colocalise avec des marqueurs des membranes mitochondriales (Lurin *et al.*, 2000). La localisation des CLC d'*Arabidopsis* est en cours au laboratoire, mais il n'est pas unimaginable que certains d'entre eux se trouvent tout de même sur la membrane plasmique des cellules végétales. Néanmoins, certaines caractéristiques biophysiques que l'on peut penser être conservées, comme la structure en double pore responsable d'enregistrements caractéristiques en canal unitaire n'ont pas été observées à ce jour sur les membranes végétales.

Les fonctions intégrées de ces canaux chez les plantes restent elles aussi inconnues pour l'instant. Le seul élément de réponse à cette question a été apporté par l'obtention d'un mutant d'insertion dans le gène *AtCLC-a* (Geelen *et al.*, 2000). Son phénotype est discret: les plantules accumulent deux fois moins le nitrate alors que les pools des autres anions sont inchangés. Un autre trait de phénotype est que le mutant est plus sensible au chlorate que le type sauvage. Ces deux résultats semblent indiquer que le produit du gène *AtCLC-a* intervient dans la régulation de la teneur intracellulaire en nitrate.

Le laboratoire dans lequel j'ai effectué mon travail de thèse et qui a été à l'origine du clonage du premier CLC chez les plantes (Lurin *et al.*, 1996), continue son travail (Vinauger-Douard, 2001) sur cette famille de gène et étudie en particulier le rôle de deux CLC divergents (AtCLC-e et AtCLC-f) dont les séquences semblent proches de celles des CLC bactériens.

b- La très grande famille des protéines ABC (pour ATP-Binding-Cassette)

La famille des protéines ABC est un groupe de très grande taille dans tous les phylla et particulièrement chez les végétaux. Chez *Arabidopsis*, on compte plus de 125 gènes (soit 0,5 % des gènes) codant des protéines ABC alors que chez l'homme et la levure, on dénombre respectivement 51 et 29 membres.

La structure des complexes protéiques ABC est très peu conservée. Elle est caractérisée par un domaine de fixation des nucléotides (NBD pour *Nucléotides Binding Domaine*) contenant 2 motifs consensus nommés Walker a et b ainsi qu'un peptide de liaison aux nucléotides spécifique de la famille (Walker *et al.*, 1982) et un domaine hydrophobe souvent constitué de 6 hélices transmembranaires. Ces deux domaines peuvent être les produits de gènes différents, comme c'est généralement le cas chez les procaryotes, ou faire partie d'une même protéine. Enfin on peut observer l'agencement de plusieurs structures similaires conduisant à des structures à 12 domaines transmembranaires et deux sites NBD. C'est le cas du CFTR (pour *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*).

Les activités des protéines ABC semblent très diverses et elles interviennent dans de nombreuses fonctions physiologiques (Bauer *et al.*, 1999; Higgins, 2001). L'une des plus importantes semble être la détoxification cellulaire: ces protéines catalysent alors la compartimentation de composés toxiques généralement conjugués au tri peptide glutathion (Glu-Cys-Gly) par les activités Glutathion-S-Transférases (GSTs) (Dixon *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 2000). Chez les animaux et les microorganismes, l'extrusion se fait dans le compartiment extracellulaire alors que chez les végétaux et la levure, c'est la vacuole qui joue le rôle de réservoir de détoxification. Il semble d'ailleurs que les protéines ABC soient localisées sur la membrane plasmique dans le premier cas et plutôt sur le tonoplaste dans le second cas. Dans la majorité des cas, elles codent pour des pompes directement énergisées par l'hydrolyse de l'ATP (ATPase) ce qui en fait un mécanisme très efficace de détoxification, indépendant des gradients électrochimiques.

A côté de ces activités ATPases, certaines protéines ABC animales interviennent dans la formation ou dans la régulation de canaux de la membrane plasmique:

- le produit du gène *SUR* (pour *Sulfonylurea Receptor*) est impliqué dans la formation d'un complexe canal potassique sensible à l'ATP nommé K_{ATP} (Inagaki *et al.*, 1995): il s'agit de l'assemblage de quatre protéines de la famille des *Kir* (pour *Inward Rectification K⁺ channels*) et de quatre sous-unité de la famille *SUR*. Les protéines *SUR* possèdent un domaine de liaison au Sulfonylurée, d'où son nom (Aguilar-Bryan *et al.*, 1995).

- le gène CFTR code chez les mammifères une protéine dont la mutation entraîne des maladies génétiques graves, en particulier la mucoviscidose (Riordan *et al.*, 1989). Son expression en système hétérologue a révélé qu'elle était responsable d'une conductance anionique (Anderson *et al.*, 1991b) régulée par l'ATP intracellulaire (Anderson *et al.*, 1991a), et par phosphorylation par une protéine kinase A dépendante de l'AMPc (Cheng *et al.*, 1991).

- la protéine MDR1 (pour *Multi-Drug Resistance*) ou P-glycoprotéine, exprimée en système hétérologue présente une activité de cotransport des drogues (Endicott *et al.*, 1988) mais a aussi semble-t-il une activité de type canal anionique (Valverde *et al.*, 1992). Cette dernière est très discutée à ce jour.

Chez les végétaux, des ADNc codant des protéines ABC de la sous famille MRP (pour *Multidrug Resistance Proteines*) ont d'abord été clonés par homologie de séquence (Rea *et al.*, 1998). Certaines de ces protéines ont effectivement une activité de transport de conjugués au glutathion (Lu *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1997).

Des approches plus physiologiques ont démontré l'implication de protéines de type ABC dans des processus divers (Martinoia *et al.*, 2002) comme la détoxification du

cytoplasme (Klein *et al.*, 2000; Martinoia *et al.*, 1993), l'élongation cellulaire et la réponse à la lumière bleue (Sidler *et al.*, 1998), le mouvement des stomates et le développement de la racine (Gaedeke *et al.*, 2001), l'extrusion de composé antifongique (Jasinski *et al.*, 2001) et l'homéostasie des cations (Kushnir *et al.*, 2001). Aucune d'entre elles n'a été décrite comme ayant une activité canal. En revanche, certaines de ces protéines semblent localisées sur la membrane plasmique (Jasinski *et al.*, 2001; Sidler *et al.*, 1998).

En utilisant la technique du patch-clamp, des sulfonylurées telles la glibenclamide et la cromokalim, modulateur des protéines ABC, affectent l'activité de canaux potassiques et anioniques des cellules de garde ainsi que l'ouverture des stomates de *Vicia faba* et *Commelina communis* (Leonhardt *et al.*, 2001; Leonhardt *et al.*, 1997; Leonhardt *et al.*, 1999). Ceci semble indiquer que des protéines ABC pourraient réguler, voire même constituer partiellement, certains canaux végétaux, en particulier les canaux anioniques, de la membrane plasmique. A ce jour, aucune preuve moléculaire n'est venue confirmer cette hypothèse. Néanmoins, le gène MDR5 d'*Arabidopsis thaliana*, récemment caractérisé (Gaedeke *et al.*, 2001), semble être un bon candidat: en effet un mutant d'insertion dans le gène *AtMRP5*, ne présente plus l'ouverture de ses stomates en réponse à la glibenclamide.

c- La famille des VDAC (pour Voltage Dependent Anion Channel)

La famille des VDAC regroupe des protéines initialement décrites comme localisées dans la membrane externe des procaryotes et dans l'enveloppe des organites des eucaryotes comme les mitochondries et les chloroplastes. Ce sont de petites protéines membranaires dont la structure tertiaire est un grand feuillet β replié sur lui-même en forme de tonneau et qui ménage donc un large pore dans la membrane. Elles semblent fonctionner en tétramère et sont caractérisées par une large conductance et une probabilité d'ouverture maximum aux environs de 0 mV .

Chez les plantes, des gènes de la famille VDAC ont été clonés. Le blé en contient au moins 3 isoformes (TsVDAC1 à 3) qui complètent un mutant *VDAC* de *Saccharomyces cerevisiae* et dont les activités sont proches de celles décrites chez les animaux (Elkeles *et al.*, 1997; Elkeles *et al.*, 1995). L'analyse du génome d'*Arabidopsis thaliana*, indique qu'il existe 6 gènes codant pour des VDAC (A. Marmagne, communication personnelle), mais rien à leur sujet n'est publié à ce jour quant à leurs activités, localisations et fonctions. Une publication récente semble toutefois indiquer qu'un de ces gènes est transcrit en réponse à une infection par *Xanthomonas campestris* (Lacomme *et al.*, 1999).

Un point extrêmement intéressant a été soulevé par des études récentes, basées sur des résultats d'électrophysiologie et d'immunolocalisation: certaines VDAC, en particulier chez les mammifères, peuvent avoir une localisation de type membrane plasmique (Buettner *et al.*, 2000; Guibert *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1996). Il est vrai, qu'à ce jour, les caractéristiques de conductance et de sensibilité au voltage des VDAC n'ont pas été observées au niveau de cette membrane chez les végétaux. Une explication pourrait être que les VDAC ne soient que des éléments constituant de complexes protéiques beaucoup plus gros, avec des caractéristiques de transports ioniques totalement différentes de celles observées lors d'expériences de reconstitution en bicouche lipidique.

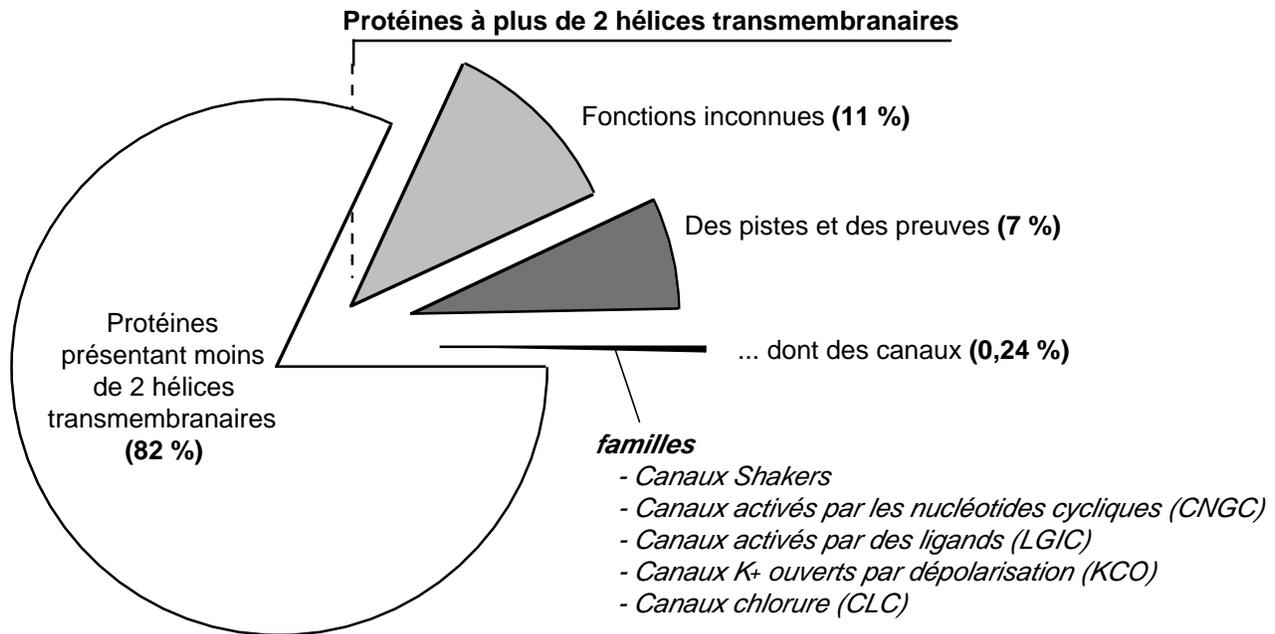


Figure I-5: Représentation de la quantité de protéines transmembranaires (sur une base bioinformatique avec plus de 2 hélices transmembranaires) parmi les 25450 produits potentiels de gènes d'*Arabidopsis thaliana* issus du séquençage systématique du génome. Données intégrées à partir de la banque de John Ward (<http://www.cbs.umn.edu/arabidopsis/>) en Janvier 2001.

d- Autres familles intéressantes

Les aquaporines constituent la grande famille des MIP (pour *Major Intrinsic Proteins*) sont comme leur nom l'indique des canaux à eau que l'on trouve dans tous les organismes et en particulier chez les plantes (pour revue (Santoni *et al.*, 2000)). Chez *Arabidopsis thaliana*, on en dénombre de l'ordre de 35. Leur sélectivité est généralement en faveur de l'eau mais de récentes études semblent indiquer que certaines d'entre elles laissent aussi passer de petits solutés neutres comme le glycérol et l'urée (Biela *et al.*, 1999; Gerbeau *et al.*, 1999). Une étude récente (Yasui *et al.*, 1999) a montré que l'aquaporine AQP6 du rat exprimée en ovocyte de xénope est capable de créer au niveau de la membrane plasmique des courants chlorures sensibles au mercure (un inhibiteur des aquaporines). Ces résultats n'ont pas été répétés dans le cas d'aquaporines de plantes à ce jour et semblent pour l'instant très précurseurs chez les animaux.

Enfin la famille des canaux activés par des ligands (LGIC pour *Ligand Gated Ion Channel*) existe chez les plantes et sont représentés en particulier par des protéines de type récepteur au glutamate (Lacombe *et al.*, 2001; Lam *et al.*, 1998). Ceux ci sont, chez les animaux, des canaux à sélectivité cationique. Les protéines de type récepteur Glycine, GABA ou GluCl qui, eux, sont des conductances anioniques n'apparaissent pas dans les banques de séquences chez les végétaux. Par contre, il semble que la sélectivité des LGIC soit contrôlée par un très petit nombre de résidu (Gunthorpe *et al.*, 2001) et il n'est pas unimaginable que des gènes de type récepteur au glutamate correspondent finalement à des protéines ayant une activité canal anionique.

2- Beaucoup de séquences codant potentiellement pour des protéines membranaires n'ont pas encore de fonction

Le génome d'*Arabidopsis thaliana* a été séquencé dans sa quasi totalité et contient de l'ordre de 25000 à 26000 séquences codant pour des protéines (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Il est difficile de tirer des conclusions quantitatives de cette masse de résultats. Parmi ces nombreuses séquences, moins de 10 % des protéines ont été caractérisées de façon expérimentale, 60 % codent des protéines ayant des homologies avec des protéines caractérisées chez d'autres organismes et 30 % n'ont pas de fonction.

Parallèlement à cette approximation, une approche bio-informatique fondée sur la prédiction des domaines transmembranaires (Tusnady *et al.*, 1998), permet d'identifier 18 % des protéines chez *Arabidopsis* comme ayant plus de deux hélices transmembranaires (Ward, 2001) (figure I-5). De l'ordre de 38 % d'entre elles ont une fonction décrite ou prédite à partir d'observations faites dans d'autres organismes et les transporteurs en représentent une large part, supérieure à un tiers. Il reste donc 62 % de protéines hydrophobes dont on ne connaît absolument pas la fonction (www.cbs.umn.edu/arabidopsis). Comment identifier parmi celles-ci des gènes candidats pour coder des canaux anioniques?

Chez les animaux, il existe plusieurs familles de canaux potassiques, la plus célèbre étant la famille Shaker (Tempel *et al.*, 1987). Toutes ces familles n'ont pas réellement d'homologie mais présentent toute une séquence signature spécifique et très

conservée au niveau du filtre de sélectivité du pore. Ceci permet en théorie de reconnaître tous les canaux potassiques à partir de données brutes d'un séquençage et, chez *Arabidopsis*, cela a par exemple conduit à l'isolement des gènes KCO (pour *Outward-rectifier K⁺ Channel*) (Czempinski *et al.*, 1997). Malheureusement de telles séquences clefs n'ont pas été identifiées dans le cas des canaux anioniques et une telle approche bio-informatique n'est donc pas possible.

Le premier travail de génomique ayant été fait, la communauté scientifique a pour objectif suivant d'attribuer systématiquement une fonction et une activité à chaque produit des gènes. Le travail est vaste mais devrait pouvoir conduire à l'identification de plusieurs gènes nouveaux codant des canaux ioniques, par exemple lors de programmes d'expression systématique en système hétérologue ou lors d'analyse systématique de mutants obtenus par génétique réverse.

E- Objectif de la thèse: comprendre la fonction des canaux anioniques dans des types cellulaires "moins spécialisés" que les cellules de garde et les cellules racinaires

1- Une vision de l'état de la recherche concernant les canaux anioniques de la membrane plasmique à mon arrivée au laboratoire

Nous avons vu, dans le premier chapitre de cette introduction, que le statut des anions dans la plante était plus complexe que dans les cellules animales, tant par la variété des espèces accumulées que par leur quantité relative et leur implication dans plusieurs phénomènes complexes à l'échelle de la cellule, tels la régulation de la pression osmotique et le métabolisme. Il n'est pas étonnant qu'un certain nombre de protéines membranaires interviennent plus ou moins directement dans le maintien de l'homéostasie des anions dans la plante. Parmi celles-ci, de nombreux transporteurs ont été caractérisés tant sur le plan fonctionnel que sur le plan moléculaire. De par leur aptitudes à faire ressortir les anions de la cellule, les canaux anioniques de la membrane plasmique occupent une place un peu particulière et encore mal comprise.

La technique du patch-clamp a permis la caractérisation de nombreuses activités de type canal anionique sur cette membrane (voir seconde partie de l'introduction). Celles-ci sont à la fois extrêmement répandues, probablement dans tous les types cellulaires, et présentent des caractéristiques très divergentes. Ces deux constatations semblent indiquer que les canaux anioniques sont très importants pour les cellules végétales, et qu'ils interviennent dans des phénomènes multiples. Parallèlement à cela, de plus en plus de fonctions physiologiques semblant faire intervenir des canaux anioniques et des transports d'anions sont caractérisées dans les systèmes végétaux (voir troisième partie de l'introduction). Dans presque tous les cas, les activités canal correspondantes n'ont pas été caractérisées en patch-clamp ou le lien entre les deux approches n'a pas pu être fait.

Quelques rares exemples d'implication d'un canal particulier dans un phénomène particulier sont néanmoins disponibles. Le plus documenté d'entre eux est la fonction du canal anionique à cinétiques lentes dans les phénomènes d'osmorégulation des stomates en réponse, entre autres, à l'acide abscissique. Dans cet exemple, aujourd'hui bien caractérisé, une régulation directe par l'ABA du canal a pu être observée, venant compléter des données pharmacologiques cohérentes. Un dernier argument a pu être fourni grâce à l'utilisation de mutants de la voie de signalisation de l'hormone. Un autre exemple, plus récent, est celui, nous l'avons vu, de l'activation de canaux perméables aux acides organiques en réponse à l'aluminium. Dans ce cas encore, des arguments pharmacologiques, joints à l'observation d'activations relativement directes par le cation Al^{3+} fournissent une série d'arguments forts conduisant à l'identification en patch-clamp de l'activité canal responsable de l'activité physiologique. Ces deux exemples concernent des canaux spéciaux dans des cellules particulières. Ces systèmes cellulaires étaient donc connus depuis longtemps comme étant le siège d'efflux d'anions et la logique voulait que l'on puisse y décrire des canaux anioniques. Depuis quelques années, l'application de la technique du patch-clamp à de nombreux types cellulaires a permis de caractériser beaucoup d'autres canaux anioniques sur la

membrane plasmique de cellules "moins" spécialisées. Leur fonction n'y est alors pas si évidente...

En résumé, les canaux anioniques ont été caractérisés en utilisant la technique du patch-clamp dans de nombreux types cellulaires mais leur fonction n'est établie que dans certains cas très particuliers. L'un des principaux objectifs du laboratoire d'Hélène Barbier-Brygoo est de comprendre la fonction des canaux présents sur la membrane plasmique de cellules "moins spécialisées" que les cellules de garde des stomates ou les cellules de la pointe racinaire. Pour cela plusieurs approches sont développées: le point de départ est un travail en patch-clamp visant à l'identification et la caractérisation d'activités anioniques sur la membrane plasmique, avec l'idée que mieux seront comprises les régulations directes affectant les canaux, plus facile il sera d'avoir des idées quant à leur fonction. Une seconde approche consiste en la caractérisation de réponses intégrées à l'échelle de la cellule ou de la plante faisant intervenir des canaux anioniques. L'idée est ensuite d'impliquer une activité particulière décrite en patch-clamp dans un phénomène physiologique particulier et de trouver ainsi un rôle au canal. Néanmoins, la littérature en témoigne, ce lien reste extrêmement difficile à établir et les outils à notre disposition sont souvent insuffisants.

2- Deux modèles biologiques pour l'étude des canaux anioniques de la membrane plasmique chez *Arabidopsis*: l'hypocotyle et les suspensions cellulaires

a- l'hypocotyle d'Arabidopsis comme système modèle pour l'étude de l'élongation cellulaire

Le laboratoire a choisi de travailler sur l'hypocotyle d'*Arabidopsis thaliana* avec l'objectif d'explorer le rôle potentiel des canaux anioniques dans des phénomènes de développement à l'échelle de la plante avec un intérêt particulier pour la régulation de l'élongation cellulaire. Pour cela l'hypocotyle est tout indiqué: chez *Arabidopsis*, il possède son nombre final de cellules lors de la formation de l'embryon et après la germination, son développement se fait majoritairement par élongation des cellules qui le composent (Gendreau *et al.*, 1997). Il s'agit donc d'un bon modèle pour l'étude des phénomènes de contrôle du volume cellulaire liés aux processus d'élongation et l'idée de départ de l'équipe était d'explorer le rôle potentiel des canaux anioniques dans de tels processus.

Dans un premier temps le laboratoire s'est intéressé aux activités canal anionique de la membrane plasmique des cellules épidermiques. Utilisant la technique du patch-clamp appliquée aux protoplastes dérivés des cellules épidermiques, il a été possible de caractériser fonctionnellement un canal anionique de type rapide et d'établir certaines de ses régulations (Thomine *et al.*, 1997a; Thomine *et al.*, 1995).

En parallèle, par une approche basée sur la pharmacologie des canaux anioniques, le laboratoire a pu mettre en évidence la fonction d'un canal anionique potentiel dans le contrôle du volume cellulaire en réponse à l'auxine (Thomine *et al.*, 1997b). A l'obscurité, les jeunes plantules d'*Arabidopsis* sont étioilées et présentent en particulier un hypocotyle long et grêle. La présence d'auxine dans le milieu de culture inhibe fortement cette élongation. Pour savoir si un canal anionique était impliqué

dans ce processus, les auteurs ont utilisé plusieurs inhibiteurs de canaux anioniques et observé que deux d'entre eux, le DIDS et l'A9C, étaient capables de contre-carrer les effets de l'hormone. Cela suggère que la voie de transduction de l'auxine conduisant à l'inhibition de l'élongation de l'hypocotyle d'*Arabidopsis* passe par un canal, ou une protéine autre, dont l'activité est inhibée par les deux molécules. De plus cette réversion de l'inhibition est spécifique de l'auxine: la diminution de la taille de l'hypocotyle causée par l'ACC, le précurseur de l'éthylène, ou les cytokinines n'est pas réversé par les inhibiteurs de canaux. Cela signifie que le canal intervient relativement spécifiquement dans la régulation de l'élongation cellulaire par l'auxine

La pharmacologie efficace sur les plantules est différente de celle efficace sur le canal rapide des cellules de l'épiderme. Cela suggère que la cible des inhibiteurs sur la réponse auxine des plantules est distincte du canal anionique déjà caractérisé, et que probablement il existe un ou plusieurs autres canaux dans notre système.

b- Les suspensions cellulaires comme système modèle pour l'étude de processus d'osmorégulation

Le second modèle du laboratoire est celui des cellules en suspension, dans un premier temps celles de tabac et plus récemment celles d'*Arabidopsis thaliana*.

Une partie de l'équipe d'Hélène Barbier-Brygoo s'intéresse à l'effet d'un stress osmotique sur les cellules végétales. Chez les cellules de tabac, un choc hypoosmotique provoque un burst oxydatif, des efflux de potassium et d'anions, une entrée de calcium ainsi qu'une alcalinisation du milieu extérieur, indiquant une modification des activités de transporteurs dont des canaux anioniques (Cazalé *et al.*, 1998). De plus, ceci s'accompagne de modification des caractéristiques biophysiques de la paroi et de l'activation de chaînes de MAPkinase (pour *Mitogen Activated Protein kinase*) (Cazalé *et al.*, 1999). Les canaux anioniques ont un rôle central dans la transduction du signal choc hypoosmotique, puisque l'inhibition des efflux d'anions bloque aussi la production de forme activée d'oxygène. A mon arrivée dans le laboratoire la même approche débutait sur les cellules en suspension d'*Arabidopsis thaliana*.

c- Donc...

Dans ces différents modèles, cellules de l'hypocotyle et en suspension, de tabac ou d'*Arabidopsis*, la technique de patch-clamp a permis d'identifier un canal anionique de type rapide (Thomine *et al.*, 1995; Zimmermann *et al.*, 1994). La littérature fait aussi référence à un canal activé par la tension de la membrane (Falke *et al.*, 1988).

D'un autre côté, des arguments pharmacologiques permettent d'impliquer dans ces mêmes systèmes des canaux anioniques dans l'inhibition de l'élongation en réponse à l'auxine (Thomine *et al.*, 1997b) ainsi que dans la réponse au choc hypoosmotique (Cazalé *et al.*, 1998). En revanche, la nature des canaux impliqués dans ces deux phénomènes est inconnue, que ce soit moléculairement ou du point de vue de la caractérisation d'activité en patch-clamp.

3- Objectif de la thèse et stratégies

a- Poursuivre l'étude des activités des canaux anioniques de la membrane plasmique

La poursuite de la caractérisation des conductances de la membrane plasmique est un des objectifs majeurs du laboratoire auquel j'ai beaucoup participé: bien comprendre les régulations qui s'exercent sur un canal fournit des éléments pour mieux comprendre sa fonction à l'échelle de la cellule. Pour cela, la technique du patch-clamp est tout indiquée. Je me suis focalisé d'une part sur les cellules de l'épiderme de l'hypocotyle, pour lesquelles il existait des arguments en faveur de l'existence d'au moins un autre canal anionique, et sur les cellules en suspension d'*Arabidopsis*, pour lesquelles on ne savait que peu de chose quant aux canaux membranaires décrits en patch-clamp. Cette partie du travail est présentée dans le chapitre II.

b- Caractériser les fonctions physiologiques dans lesquelles les canaux anioniques de la membrane plasmique peuvent être impliqués

Le chapitre III traite de la caractérisation de réponses physiologiques intégrées dans lesquelles sont impliqués des canaux anioniques. Plusieurs choix de réponses s'offraient à moi: des réponses très indirectes, comme dans le cas de la réponse élongation de l'hypocotyle en réponse à l'auxine, ou beaucoup plus proches du canal. J'ai décidé de me focaliser sur une réponse très liée à l'activité des canaux anioniques de la membrane plasmique: les efflux d'anions à partir de nos systèmes d'intérêt. Après quelques essais peu concluants sur le système plantule, j'ai travaillé beaucoup sur le système cellules en suspension.

L'idée de telles approches est de toujours faire le lien avec les résultats obtenus grâce à la technique du patch-clamp afin d'impliquer une conductance bien particulière dans un phénomène intégré à l'échelle de la cellule ou de l'organe. J'ai donc essayé dans le chapitre III de mettre en parallèle ces deux types d'approche afin d'établir des corrélations nous permettant de conclure.

c- Identifier des gènes des canaux anioniques

La connaissance des gènes codant pour les activités canal anionique de la membrane plasmique est une étape clef nécessaire à une stratégie de génétique réverse. Cette dernière est primordiale. Elle nous permet de pallier le manque d'inhibiteurs réellement spécifiques d'un canal en affectant son activité directement par altération de la protéine et de ainsi répondre à la question de sa fonction. En effet, en théorie, la disruption du gène doit à la fois affecter l'activité des canaux et le processus physiologique dans lequel ils sont impliqués.

Cela a justifié la mise en place d'approches dont le but était le clonage des gènes des canaux anioniques. Pour cela, plusieurs stratégies sont possibles. Au cours de ma dernière année de thèse, je me suis focalisé sur la mise au point de crible d'expression en système hétérologue, ce qui est rapporté dans le chapitre IV.

d- Enfin...

Ce travail de thèse s'inscrit dans le travail d'un groupe et a conduit à plusieurs publications. J'ai choisi de les intégrer dans le texte de ce manuscrit car elles correspondent à des points particuliers du travail présenté dans le chapitre II.

Le chapitre V correspond à une conclusion générale et à des perspectives découlant des approches et des résultats évoqués dans les parties précédentes. Y sont présentées les autres approches que l'on pourrait utiliser pour mieux comprendre la fonction des canaux anioniques chez les végétaux, ainsi que celles que j'aurais aimé développer si j'avais eu le temps ou la possibilité de revenir trois années en arrière...

L'annexe A présente les techniques de voltage-clamp et de patch-clamp utilisées pour l'étude des protéines électrogènes des membranes, l'annexe B traite des techniques utilisées au cours de ce travail, et l'annexe C présente un modèle mathématique pour expliquer le comportement du canal anionique rapide vis à vis du voltage et d'autres paramètres.

Chapitre II

**CARACTERISATION DES ACTIVITES
"CANAL ANIONIQUE" DE LA MEMBRANE PLASMIQUE
DES CELLULES D'ARABIDOPSIS PAR LA TECHNIQUE
DU PATCH-CLAMP: DEUX CANAUX BIEN DISTINCTS
PEUVENT ETRE ACTIFS DANS LES MEMES
CONDITIONS**

**Chapitre II:
CARACTERISATION DES ACTIVITES
"CANAL ANIONIQUE" DE LA MEMBRANE
PLASMIQUE DES CELLULES D'*ARABIDOPSIS* PAR LA
TECHNIQUE DU PATCH-CLAMP:
DEUX CANAUX BIEN DISTINCTS PEUVENT ETRE
ACTIFS DANS LES MEMES CONDITIONS**

Le patch-clamp est une technique invasive permettant de caractériser les protéines électrogènes des membranes (Hamill *et al.*, 1981). Elle a été adaptée aux cellules végétales avec succès mais il est nécessaire de passer par une étape de protoplaste, c'est à dire une cellule débarrassée de sa paroi pectocellulosique par un traitement assez rude pour la cellule. L'annexe A présente cette technique et est nécessaire pour comprendre le travail présenté dans cette partie.

En perfusant le cytoplasme des cellules avec différentes solutions d'anions, nous avons pu caractériser deux canaux anioniques sur la membrane plasmique des protoplastes provenant de cellules épidermiques de l'hypocotyle d'*Arabidopsis thaliana*. Une étape du travail visant à comprendre leurs fonctions respectives consiste à bien caractériser les régulations qui s'y exercent ainsi que leurs propriétés biophysiques. Nous avons recherché quels étaient les composés du cytosol ou du milieu extracellulaire qui modulaient leurs activités, et donnaient une indication sur leur fonction. Par la suite et dans le but de relier ces activités à des fonctions cellulaires et à des fonctions intégrées au niveau de la plante, nous avons retrouvé et brièvement caractérisé ces deux canaux dans un système plus simple à utiliser lors d'autres approches: les cellules en suspension d'*Arabidopsis thaliana*.

Tableau II-1: *Résumé des caractéristiques du canal anionique à cinétiques rapides au début du travail de thèse* (adapté de Thomine et al. 1995, 1997).

Dépendance vis à vis du voltage	Forte, canal activé par dépolarisation
Cinétiques	Rapides (ordre de la milliseconde)
Sélectivité	Anionique (étudié en chlorure interne)
Régulation	Canal fermé par les nucléotides internes
Sensibilité aux inhibiteurs (% d'inhibition pour 100 µM)	Nif > NPPB > DIDS 80 % 0 %

A- Contribution à la caractérisation d'un canal anionique à cinétiques rapides sur la membrane plasmique des cellules épidermiques de l'hypocotyle d'*Arabidopsis thaliana*

1- Le canal anionique à cinétiques rapides: une activité déjà bien caractérisée

A mon arrivée au laboratoire, le canal anionique rapide des cellules épidermiques de l'hypocotyle d'*Arabidopsis thaliana* était déjà connu et son étude était poursuivie (tableau II-1). Sébastien Thomine durant sa thèse (Thomine, 1997) l'avait décrit comme un canal activé par dépolarisation avec des constantes cinétiques extrêmement rapides, de l'ordre de la milliseconde, et dépendantes du potentiel de membrane (Thomine *et al.*, 1995). L'activité de ce canal fluctue avec le temps: il s'active généralement après le passage en configuration cellule-entière puis disparaît en quelques dizaines de minutes. Ce phénomène de "run-down" est à la fois une limite technique et probablement un élément de régulation cruciale du canal encore mal compris. Le premier article apporte un élément d'explication sur la nature de ce phénomène, découvert lors de l'étude de la sélectivité du canal.

Un autre des éléments de régulation découvert assez tôt dans "l'histoire" du canal rapide et qui n'a cessé d'être étudié depuis, est la régulation de l'ouverture dépendante du voltage par les nucléotides (Thomine, 1997; Thomine *et al.*, 1997b; Thomine *et al.*, 1995). Cette régulation est de mieux en mieux appréhendée: la fermeture dépendante du voltage du canal est régulée de façon dépendante de la dose par tous les nucléotides testés dans le milieu intracellulaire (nature de la base et nombre de phosphates différents), avec différentes efficacités. De plus, des analogues non hydrolysables de l'ATP comme l'ATP γ S ou l'AMP-PnP ont les mêmes effets, ce qui semble indiquer qu'il ne s'agit pas d'un mécanisme requérant l'hydrolyse du nucléotide. Il a donc été proposé l'existence d'un site de liaison des nucléotides sur la face cytosolique. L'objet du second article consiste en la possibilité que les nucléotides régulent le canal en le bloquant aux potentiels les plus négatifs par une pénétration directe dans le pore.

2- Le canal rapide présente une perméabilité originale des anions et son activité est régulée par le statut des anions internes

Il est important de connaître la sélectivité d'un canal pour imaginer sa fonction, surtout dans le cas de canaux d'origine végétale. En effet, tous les anions n'ont pas les mêmes caractéristiques chimiques et une modification de la compartimentation peut être importante lors de phénomènes de signalisation, d'osmorégulation ou de régulation et des activités du métabolisme. Nous avons donc entrepris l'étude de la sélectivité du canal à cinétiques rapides, puis nous nous sommes rendus compte que certains anions étaient aussi capables de réguler l'activité du canal.

a- Article n°1: "Sulfate is Both a Substrate and an Activator of the Voltage-Dependent Anion Channel of Arabidopsis Hypocotyl Cells"

Sulfate Is Both a Substrate and an Activator of the Voltage-Dependent Anion Channel of Arabidopsis Hypocotyl Cells¹

Jean-Marie Frachisse*, Sébastien Thomine², Jean Colcombet, Jean Guern, and Hélène Barbier-Brygoo

Institut des Sciences Végétales, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Propre de Recherche 40, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif sur Yvette cedex, France

On the basis of the anion content of in vitro-cultured Arabidopsis plantlets, we explored the selectivity of the voltage-dependent anion channel of the plasma membrane of hypocotyl cells. In the whole-cell configuration, substitution of cytosolic Cl⁻ by different anions led to the following sequence of relative permeabilities: NO₃⁻ (2.6) ≥ SO₄²⁻ (2.0) > Cl⁻ (1.0) > HCO₃⁻ (0.8) ≫ malate²⁻ (0.03). Large whole-cell currents were measured for NO₃⁻ and SO₄²⁻, about five to six times higher than the equivalent Cl⁻ currents. Since SO₄²⁻ is usually considered to be a weakly permeant or non-permeant ion, the components of the large whole-cell current were explored in more detail. Aside from its permeation through the channel with a unitary conductance, about two-thirds that of Cl⁻, SO₄²⁻ had a regulatory effect on channel activity by preventing the run-down of the anion current both in the whole-cell and the outside-out configuration, increasing markedly the whole-cell current. The fact that the voltage-dependent plasma membrane anion channel of hypocotyl cells can mediate large NO₃⁻ and SO₄²⁻ currents and is regulated by nucleotides favors the idea that this anion channel can contribute to the cellular homeostasis of important metabolized anions.

Plant anion channels play central roles in signal transduction and cell turgor regulation. They have been implicated in stomatal function, where their activation is thought to be one of the limiting steps in the loss of guard cell turgor leading to stomatal closure (for review, see Ward et al., 1995). Pharmacological arguments in favor of the involvement of anion channels in elicitor signal transduction have been obtained in cultured parsley and soybean cells (Ebel and Cosio, 1994; Jabs et al., 1997). Recent studies in Arabidopsis hypocotyls have also shown that anion channel activation might be a step in the transduction of two signals modulating hypocotyl growth: blue light (Cho and Spalding, 1996) and auxin (Thomine et al., 1997b). Although anion channels are implicated in a wide range of physiological functions in plant cells, their detailed characterization is still far from complete in differentiated cells other than stomatal guard cells.

The determination of ions that permeate a channel is important, as it may be indicative of its specific physiological role. In particular, the ability of a given channel to transport a particular anion species suggests that this channel could be involved not only in the general processes of membrane depolarization and cell turgor decrease but also, more specifically, in the regulation of the concentration of this anion. For some anions such as NO₃⁻, which are substrates for intracellular metabolic enzymes, this type of regulation might be important to maintain a suitable intracellular concentration. In parallel with patch-clamp studies of animal systems, the properties of most plant anion channels have been explored with Cl⁻ as the permeating anion, in spite of the fact that Cl⁻ is rarely accumulated in plant cells at high concentrations. Anions other than Cl⁻ could be more relevant substrates for plant anion channels, but only in a few cases has the selectivity of anion channels been extensively studied (Hedrich and Marten, 1993; Elzenga and VanVolkenburgh, 1994; Schmidt and Schroeder, 1994; Skerrett and Tyerman, 1994).

Previous studies of anion channels residing at the plasma membrane in the hypocotyl epidermal cells of Arabidopsis allowed us to characterize a voltage-dependent anion channel (Thomine et al., 1995). This channel is tightly controlled by the transmembrane voltage, being deactivated at resting membrane potentials and activated by depolarization. In a detailed study, we recently showed that voltage regulation is under the control of cytoplasmic nucleotides and does not require nucleotide hydrolysis (Thomine et al., 1997a). A pharmacological characterization of the channel has revealed a poor sensitivity to most anion channel blockers except niflumic acid (Thomine et al., 1997a). We explored the selectivity of this channel toward physiological anions, which has not been previously investigated to our knowledge. Analysis of the anion content of in vitro-grown Arabidopsis plantlets showed that NO₃⁻, SO₄²⁻, and PO₄²⁻ are the major accumulated anions. This gave hints about which anions might be substrates for the voltage-dependent anion channel. Indeed, whole-cell patch-clamp recording with various internal anions revealed a high current amplitude for NO₃⁻ and, unexpectedly, for SO₄²⁻ compared with Cl⁻. Further experiments using SO₄²⁻, which is usually considered to be a non-permeant anion, provided arguments that this anion not only permeates the channel but also regulates its activity.

¹ This research was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (grant no. UPR0040).

² Present address: Department of Biology, University of California at San Diego, 9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093–0116.

* Corresponding author; e-mail frachisse@isv.cnrs-gif.fr; fax 33–169823768.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Protoplast Isolation

Arabidopsis (ecotype Columbia) seedlings were grown on a medium containing 5 mM KNO₃, 2.5 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 6.0, 2 mM MgSO₄, 1 mM Ca(NO₃)₂, 1 mM MES, 50 μM Fe-EDTA, Murashige and Skoog micro-elements (Murashige and Skoog, 1962), 10 g/L Suc, and 7 g/L agar. Culture conditions were 21°C and a 16-h daylength at lighting levels of 120 μE m⁻² s⁻¹ with neon tubes (a combination of Mazdafluor, Blanc Industrie, Lille, France, and Mazdafluor, Prestiflux, Lille, France). Seedlings aged 7 to 12 d were used for electrophysiological investigations. Hypocotyls were excised from 30 to 40 seedlings, and protoplasts were isolated according to the method of Elzenga (1991) as described in Thomine et al. (1995).

Electrophysiological Investigations

Patch-clamp experiments were performed as described by Hamill et al. (1981) using a patch-clamp amplifier (EPC 7, List Electronic, Darmstadt, Germany) with a low-pass filter (8-pole Bessel filter) for whole-cell recordings, and an amplifier (model 200A, Axon Instruments, Foster City, CA) for single-channel recordings. During measurements, freshly isolated epidermal protoplasts from Arabidopsis hypocotyls were maintained in bathing medium: 50 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, and 10 mM MES-Tris, pH 5.6. The pipettes were filled with 150 mM KCl (or other K⁺ salts as indicated), 2 mM MgCl₂, and 10 mM Tris-HEPES, pH 7.2, supplemented with either 5 mM MgATP and LiGTP or 1 or 3 mM MgATP, as indicated in the figure legends. The free Ca²⁺ concentration of 1 μM in the pipette, calculated with Ligand software (Steinhardt Software Bank, Berkeley, CA), was obtained with 5 mM EGTA and 4.2 mM CaCl₂. The osmolalities of both solutions were adjusted to 450 mosmol with mannitol using a vapor pressure osmometer (model 5500, Wescor, Logan, UT). Gigaohm resistance seals between pipettes (pipette resistance, 1–5 MΩ) coated with Sylgard (General Electric) pulled from capillaries (Kimax-51, Kimble Glass, Owens, IL) and protoplast membranes were obtained with gentle suction leading to the whole-cell configuration. The liquid junction potentials were measured according to the method of Neher (1992), and all potentials given, including reversal potentials (E_{rev}), have been corrected by subtracting the junction potentials for each ionic condition (150 mM Cl⁻, 2 mV; 150 mM NO₃⁻, 4 mV; 75 mM SO₄²⁻, 11 mV; 75 mM malate, 19 mV; and 150 mM HCO₃⁻, 13 mV). Whole-cell currents were measured in response to 10-s voltage ramps from -180 mV to +80 mV. We checked that the estimation of the E_{rev} was independent of the voltage protocol, and similar values were measured using voltage pulse protocols or ramps starting from a positive voltage. We also ensured that, even when we used a two-times faster ramp, the I-V relationship stayed at steady state. To exclude recordings presenting a voltage-independent current, a leak was determined as the linear component between a hyperpolarized potential at which the voltage-dependent current is completely deactivated,

and 0 mV, the value at which the leak current is null. The I-V relationships for which the contribution of leak at the peak potential was larger than 30% of the peak current were rejected. Therefore, the permeability ratio has not been corrected.

Outside-out patches were obtained by withdrawing the pipette from the whole-cell configuration. The single-channel recordings were stored on videotape, and digitized with a sample interval of 0.1 ms (five times the filter frequency) using Fetchex (pClamp 6.0.2, Axon Instruments) for analysis. The distribution of amplitudes was fitted by a Gaussian model in pSTAT patch-clamp software (pClamp version 6.0.2., Axon Instruments).

Application of voltage programs and handling of the data were performed using a Digidata 1200 interface (Axon Instruments) and pClamp software with Clampex and Clampfit. The filter frequency was set to 2 kHz, and capacitive transients were corrected during the patch-clamp experiments. The series resistance was compensated to more than 85% when the access resistance was higher than 5 MΩ. Unless otherwise indicated, figures are shown for one representative protoplast, and statistics are given as means ± SE (n indicates the number of protoplasts tested).

Permeability ratios for mixtures of Cl⁻ and other monovalent anions ($P_{monoval}/P_{Cl}$) or for mixtures of Cl⁻ and divalent anions (P_{dival}/P_{Cl}) were calculated from E_{rev} measurements with Equations 1 and 2, respectively. Both equations were derived from the Goldman-Hodgkin-Katz equation (Lewis, 1979) and adapted to anions.

$$P_{monoval}/P_{Cl} = (Cl_e e^{(EF/RT)} - Cl_i) / (A_{i(monoval)}) \quad (1)$$

$$P_{dival}/P_{Cl} = (Cl_e e^{(EF/RT)} - Cl_i) / (1 + e^{(EF/RT)}) / 4(A_{i(dival)}) \quad (2)$$

where E is the E_{rev} , R is the gas constant, T is the absolute temperature, F is the Faraday's constant, Cl_e and Cl_i are the extracellular and intracellular activities of Cl⁻, respectively, and $A_{i(monoval)}$ and $A_{i(dival)}$ are the extracellular and intracellular activities of the other intracellular monovalent or divalent anions, respectively. Activity coefficients were estimated according to the method of Dean (1985).

Anion Content Analysis

Eleven-day-old plantlets grown in vitro on the same medium and in the same conditions as for electrophysiological investigations were harvested. Plants were gathered in pools of five and cut at the level of the crown in order to remove the roots. Each sample (fresh weight around 20 mg) was ground in liquid nitrogen, transferred into an eppendorf tube, suspended in 500 μL of ultrapure water, and centrifuged for 2 min at 4,000g. The supernatant was collected and stored. The pellet was re-extracted three times using the same procedure. The four supernatants of each sample were pooled, filtered on 0.2-μm sterilized filters (DynaGard, Microgon, Laguna Hills, CA), and used for capillary microelectrophoresis ion determination. The anion concentrations were expressed relative to the plant volume (moles per liter of plant) assuming that the plantlet density is 1 g mL⁻¹.

Capillary electrophoresis was performed with an automated analyzer (Quanta 4000, Waters) controlled by a computer fitted with Millennium 2010 software (Waters) running in a Windows environment. Analog data (20-Hz sampling rate) were collected from the column absorbance inverse-UV detector (254 nm). The silica capillary dimensions were 75 μm i.d. and 60 cm length. The electrolyte solution used for migration was 4.6 mM chromate and 0.5 mM OFM-Br⁻ at pH 8.0. Separations were performed using a 20-kV applied potential.

RESULTS

Anion Selectivity and Permeability of the Voltage-Dependent Anion Channel

We previously identified a channel with a strong voltage-dependence at the plasma membrane of protoplasts from epidermal cells of *Arabidopsis* hypocotyls. Using Cl⁻ as the permeant anion, this channel was shown to carry essentially anion currents (Thomine et al., 1995). In the presence of 5 mM intracellular ATP (Thomine et al., 1997a), a voltage ramp from -180 to 80 mV applied at the plasma membrane in the whole-cell configuration allowed

us to record an anion current with the characteristic voltage dependence displayed in Figure 1A. For potentials more negative than -130 mV, no current was recorded. Depolarization of the membrane to potentials more positive than -130 mV activated an inward current corresponding to an outward anion flux. For voltages more positive than the peak potential, the current decreased with the diminution of the driving force for anions and reversed as this driving force became in favor of anion influx. The flattening of the curve in the vicinity of the E_{rev} indicated a marked rectification of the current in this voltage range.

To get hints about the possible substrates for plant anion channels, we analyzed the anion content of young plantlets used to prepare hypocotyl protoplasts. The anion content analysis was performed on the aerial part of *Arabidopsis* seedlings grown and harvested in the same conditions as for patch-clamp experiments. In 11-d-old plantlets, the aerial part consists of a hypocotyl that had already reached its maximum length of about 2 mm, two cotyledons, two fully expanded leaves, and two immature leaves. Ions were separated from aqueous plant extracts by capillary ion electrophoresis (Fig. 2A) as described in "Materials and Methods." Comparison of electrophoregrams of plant ex-

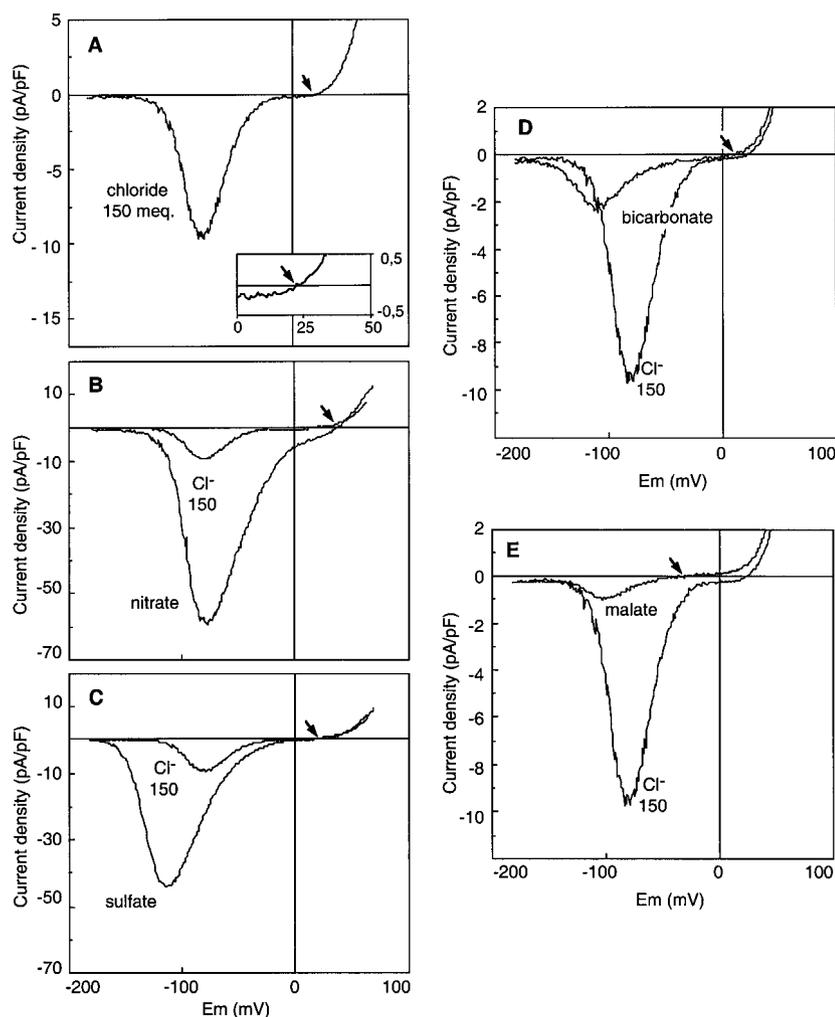


Figure 1. Current-voltage relationships of the voltage-dependent anion channel for various intracellular anions. Whole-cell currents were measured on hypocotyl epidermal protoplasts. The currents result from a 10-s voltage ramp from -180 mV to +80 mV applied at the plasma membrane. I-V curves were obtained in the presence of 150 meq Cl⁻ (A), 150 meq NO₃⁻ (B), 150 meq SO₄²⁻ (C), 150 meq HCO₃⁻ (D), or 150 meq malate²⁻ (E). For comparison, each I-V curve is presented with the Cl⁻ current corresponding to 150 meq Cl⁻. Note the different current scalings for A and B, C and D, and E. The bath solution contained 110 mM Cl⁻ and the pipette solution contained 5 mM ATP, 5 mM GTP, 150 meq of the anion to be tested, and 12.4 mM Cl⁻. Representative I-V curves from data sets of five to 10 independent recordings for each anion are shown, and arrows indicate the position of E_{rev} on the voltage axis. The inset in A shows an expanded picture of the E_{rev} region.

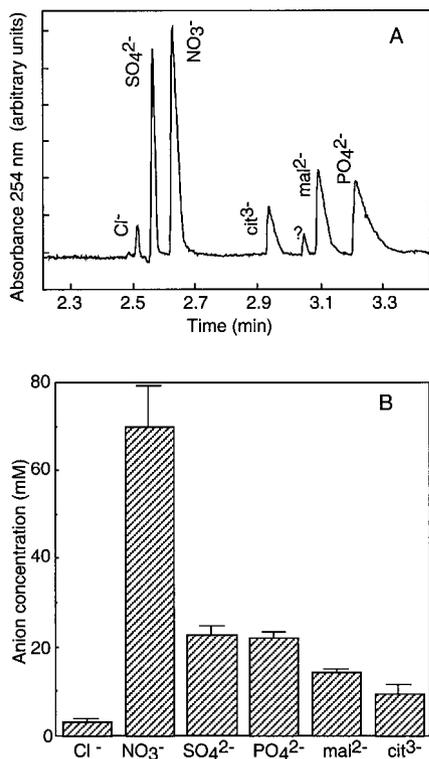


Figure 2. Quantitative analysis of the anion content in the aerial parts of 11-d-old *Arabidopsis* plantlets. A, Capillary ion electropherogram of a water-soluble extract showing the six identified peaks. B, Mean values \pm SE of the anion concentrations ($n = 9$).

tracts and solutions containing reference anions at different concentrations, we identified six peaks corresponding to Cl⁻, SO₄²⁻, NO₃⁻, citrate, malate, and PO₄²⁻ (Fig. 2A). The quantification of these peaks (Fig. 2B) revealed a high concentration of NO₃⁻ (close to 70 mM), a concentration for both SO₄²⁻ and PO₄²⁻ (around 22 mM), and a low concentration for Cl⁻ (3 mM). For the identified organic anions, malate and citrate, the concentrations were 14.4 and 9.7 mM, respectively.

To determine whether the voltage-dependent channel can allow effluxes of anions other than Cl⁻, the 150 meq of Cl⁻ contained in the patch pipette was substituted with 150 meq of NO₃⁻, SO₄²⁻, malate²⁻, HCO₃⁻, or Glu provided as K⁺ salts. The substitution of the cytosolic rather than extracellular anions was favored as closer to the *in vivo* conditions in which the different anions concentrated inside the cell tend to flow out at physiological membrane potentials, and because it also integrates putative internal regulatory effects of the anions. As previously reported (Thomine et al., 1995), the anion current intensity slowly increased, reached a maximum 3 to 10 min after getting the whole-cell configuration, and started to decrease after a few minutes of steady state. All of the curves presented in the figures and used for the determination of E_{rev} and maximum peak current amplitudes were recorded at the time of maximum activation.

Comparison of the I-V curves in Figure 1 shows a similar voltage dependence for the different channel-mediated an-

ion currents. Some differences appear in the threshold activation potential according to the anion tested; this potential was the most negative for SO₄²⁻ and the least negative for Cl⁻. Figure 1 reveals large differences in the current amplitude at the peak potential and in the position of the E_{rev} depending on the anion species loaded into the cytosol. The current recorded in the whole-cell configuration reflects the activity of the entire channel population. Two types of information can be deduced from this current. The first one is the current density for each ion tested. The macroscopic whole-cell current (I) is the product of the number of functional channels in the cell membrane (N), by the open probability of a channel at the peak potential (P_o), and the single-channel current (i) ($I = iNP_o$). Although the measurement of whole-cell current density combines information about regulatory and permeation properties of an anion toward the channel, it is most likely a physiologically relevant parameter. The second one concerns the selectivity of the channel that can be deduced from the E_{rev} . This potential is indicative of the relative affinity of anions for the channel pore, but does not presume the ion permeation through the channel (Hille, 1992).

We compared the whole-cell current at the peak potential for the different intracellular anions (Table I; Fig. 1). The highest current amplitudes were reached when 92% of the intracellular Cl⁻ was replaced by NO₃⁻ (Fig. 1B) or SO₄²⁻ (Fig. 1C). Interestingly, small but reproducible currents representing about 25% of the Cl⁻ current were observed when 92% of the intracellular Cl⁻ was replaced by HCO₃⁻ (Fig. 1D). Very low currents with high variability were observed in the presence of malate (Fig. 1E). For these small HCO₃⁻ and malate currents there was the question of their contamination by inward Cl⁻ currents corresponding to the 12.4 mM Cl⁻ left in the pipette solution. Figure 3 shows the peak current amplitudes measured when varying the Cl⁻ concentration in the pipette (for a total pipette anion content adjusted in each case to 162.4 mM with the non-permeant anion Glu), with Cl⁻ in the bath kept constant at 110 mM. The intensity of the Cl⁻ current decreased linearly when Cl⁻ was replaced by Glu, extrapolating to zero for zero Cl⁻ in the pipette. This confirmed that Glu could effectively be considered a non-permeant anion. The small current measured with 12.4 mM Cl⁻ (+150 mM non-permeant Glu) was 1.0 ± 0.2 pA/pF ($n = 10$), thus representing the contribution of the residual 12.4 mM Cl⁻ present in all of the pipette solutions. When corrected for this value, the HCO₃⁻ current appeared 6-fold lower than the Cl⁻ current. For malate, the high variability of the small corrected current precluded any precise quantitative comparison.

The channel selectivity for each anion was investigated by measuring the E_{rev} . The relative permeability ratios for different anions over Cl⁻ were calculated from the E_{rev} with Equations 1 or 2 (see "Materials and Methods") derived from the Goldman-Hodgkin-Katz current equation. The E_{rev} of the whole-cell current in the presence of 162.4 mM Cl⁻ in the pipette and 110 mM Cl⁻ in the bath (20.4 ± 5.6 mV, $n = 10$) was similar to the calculated equilibrium potential for Cl⁻ (20.1 mV), indicating that the voltage-dependent inward current is highly selective for anions.

Table I. Peak current amplitudes and permeability ratios for different anions

Peak current amplitudes and reversal potentials were measured in the whole-cell configuration, with 150 meq L⁻¹ of the anion to be tested, 12.4 mM Cl⁻ in the pipette, and 110 mM Cl⁻ in the bath. The relative permeability ratios were calculated from Equations 1 and 2 as described in "Materials and Methods." Mean values of peak current and permeability ratios are expressed as \pm SE for the number of seals indicated within parentheses.

	Cl ⁻ (n = 10)	NO ₃ ⁻ (n = 10)	SO ₄ ²⁻ (n = 7)	Malate ²⁻ (n = 5)	HCO ₃ ⁻ (n = 10)
I_{Peak} (pA/pF)	-12.0 \pm 1.8	-64.9 \pm 9.5	-67.3 \pm 3.4	-2.0 \pm 1.5	-3.1 \pm 0.5
P_x/P_{Cl}	1.0 \pm 0.1	2.6 \pm 0.3	2.0 \pm 0.2	0.03 \pm 0.03	0.8 \pm 0.1

When using a Cl⁻-free bath solution (CaOH neutralized with MES), no outward current could be detected ($n = 5$). This shows that in our experimental conditions the outward current is essentially carried by Cl⁻, excluding any large error in E_{rev} measurement due to an outward K⁺ current. This was confirmed by showing that the exchange of K⁺ by Cs⁺ in the pipette solution did not influence significantly the E_{rev} (40.7 \pm 8.5 mV, $n = 10$ with 150 mM CsNO₃, and 41.2 \pm 4 mV, $n = 10$ with 150 mM KNO₃). The permeability ratios for a range of physiological anions are reported in Table I. The largest values were obtained for NO₃⁻ ($P_{\text{NO}_3^-}/P_{\text{Cl}^-} = 2.6 \pm 0.3$) and SO₄²⁻ ($P_{\text{SO}_4^{2-}}/P_{\text{Cl}^-} = 2.0 \pm 0.2$). The relative permeability of HCO₃⁻ compared with Cl⁻ was slightly lower than 1, and malate appeared almost non-permeant. Different ionic conditions were tested to ascertain the relative permeabilities of NO₃⁻ and SO₄²⁻ over Cl⁻. For example, a $P_{\text{NO}_3^-}/P_{\text{Cl}^-}$ of 2.9 \pm 0.4 ($n = 3$) was calculated when NO₃⁻ was added in the bath (100 mM NO₃⁻ and 10 mM Cl⁻); the pipette solution contained 150 mM Glu and 12.4 mM Cl⁻. This value is not significantly different from that obtained in the ionic conditions described in Table I. In summary, these results lead to the following selectivity sequence:

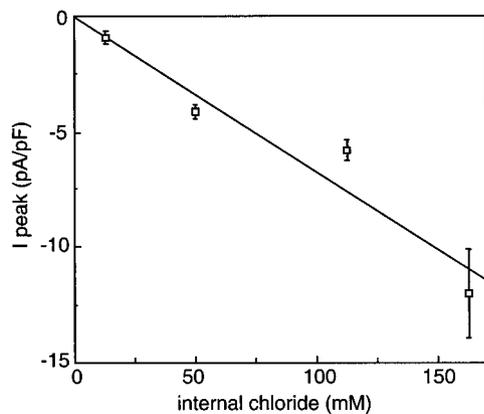


Figure 3. Amplitude of the peak current as a function of the internal Cl⁻ concentration. Internal Cl⁻ was varied from 12.4 to 162.4 mM while maintaining the total anion concentration in the pipette to 162.4 mM by adding the non-permeant anion Glu. External Cl⁻ was kept at 110 mM. Peak current amplitudes were measured from 10-s voltage ramps as described in "Materials and Methods." Each current amplitude is the mean \pm SE of five to 13 measurements. The line represents the linear regression of the data ($r^2 = 0.93$).

Considering the above results, the most surprising finding was that SO₄²⁻ appears to be a good substrate of the voltage-dependent anion channel. As this anion is usually considered as non-permeant, we performed additional experiments to demonstrate that the current recorded in our experimental conditions of high external Ca²⁺ (50 mM CaCl₂) was not a voltage-dependent inward Ca²⁺ current like the one described in carrot cells and Arabidopsis (Thu-leau et al., 1994; Thion et al., 1998). Using SO₄²⁻ as the intracellular anion, we applied a voltage ramp every 30 s to monitor the current as a function of time. After getting stable I-V curves for 5 min, we substituted the extracellular solution (50 mM CaCl₂ and 5 mM MgCl₂) with a Ca²⁺-free solution containing the same amount of Cl⁻ and a large-spectrum Ca²⁺-channel blocker, La³⁺ (95 mM TEA-Cl and 5 mM LaCl₃). Following Ca²⁺ removal, the properties of the current remained unchanged ($n = 3$; Fig. 4); neither the amplitude nor its E_{rev} was modified. This result rules out the hypothesis that the inward current under investigation bears any significant contribution of Ca²⁺ ions and confirms that it is only carried by SO₄²⁻. Furthermore, the

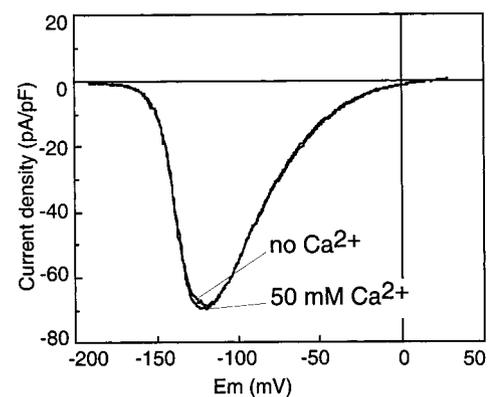


Figure 4. Characteristics of the current-voltage relationship in the presence or absence of extracellular Ca²⁺. A 10-s voltage ramp between -180 mV to +30 mV was applied every 30 s. The pipette solution contained: 5 mM ATP, 5 mM GTP, 75 mM SO₄²⁻, and 12.4 mM Cl⁻. The I-V curve was recorded in the standard bath (50 mM CaCl₂ and 5 mM MgCl₂) 10 min after breaking to the whole-cell configuration when a stable current amplitude was reached (50 mM Ca²⁺), and after 5 min of perfusion with the Ca²⁺-free bath (no Ca²⁺) (95 mM TEA-Cl, 5 mM LaCl₃). Results are shown for one representative experiment out of three. In all cases, the current amplitude was unchanged and the E_{rev} was not significantly modified.

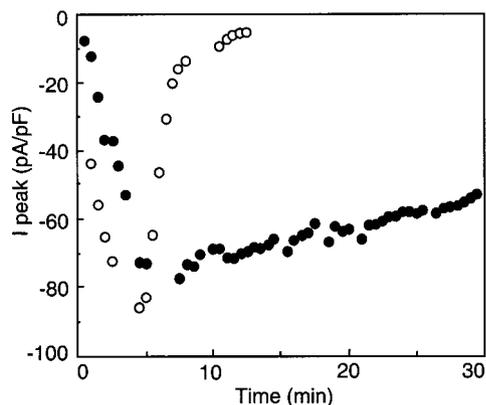


Figure 5. Time course of the NO_3^- and SO_4^{2-} currents in the whole-cell configuration. A 10-s voltage ramp between -180 mV to $+80$ mV was applied every 30 s. The NO_3^- current (\circ) and the SO_4^{2-} current (\bullet) amplitudes at the peak (I_{peak}) are displayed as a function of time after the establishment of the whole-cell configuration. The pipette solution included either 150 mM NO_3^- or 75 mM SO_4^{2-} , 12.4 mM Cl^- , and 3 mM ATP, while the bath included 110 mM Cl^- . Results are from one representative experiment out of eight for each condition.

nucleotide regulation, a characteristic feature of the Cl^- current mediated by this channel (Thomine et al., 1997a), was also observed with SO_4^{2-} as the intracellular anion (data not shown).

Regulatory Effects of SO_4^{2-} on the Anion Current

We reported previously (Thomine et al., 1995) that the amplitude of the Cl^- current changed after the establishment of the whole-cell configuration: the amplitude of the current first slowly increased, reached a maximum after 3 to 10 min, and then started to decrease. In all cases, the current completely disappeared within 10 to 30 min. A similar evolution of the current amplitude with time was observed for NO_3^- , HCO_3^- , and malate. Figure 5 compares the changes of the peak current when either NO_3^- or SO_4^{2-} was used as the internal anion. The NO_3^- current ran down and disappeared completely after 12 min of intracellular perfusion. In contrast, the SO_4^{2-} current decreased very slowly, with the maximal peak current being decreased by about 27% after 30 min. Overall, when a SO_4^{2-} -containing solution was perfused through the patch

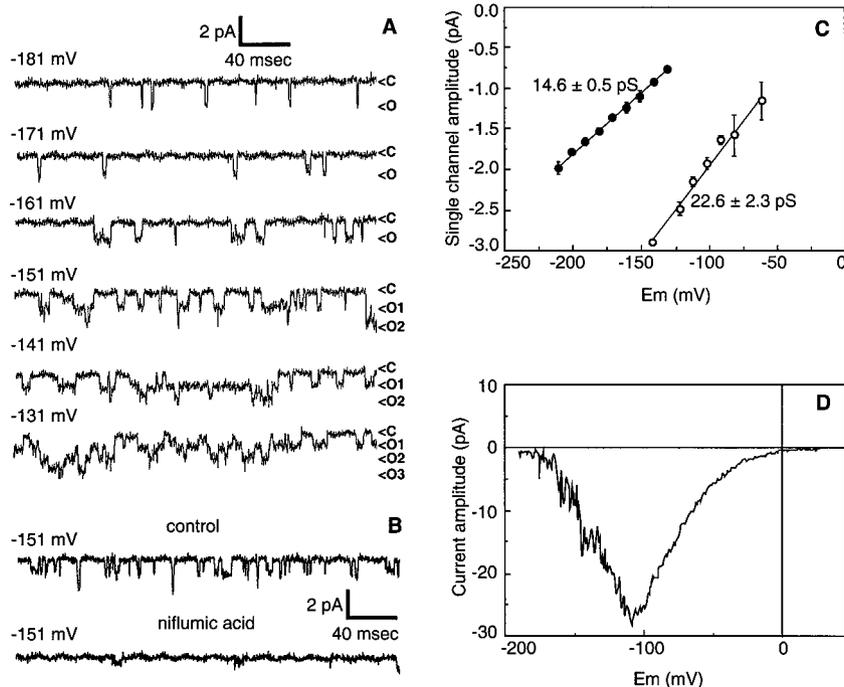


Figure 6. SO_4^{2-} permeation through single voltage-dependent anion channels. A, Single-channel currents were recorded in the outside-out configuration with membrane potential clamped in the range -131 mV to -181 mV (c, closed; o, open). The pipette solution included 75 mM SO_4^{2-} , 12.4 mM Cl^- , and 1 mM ATP, while the bath contained 110 mM Cl^- . B, Inhibition of single-channel current by 300 μM niflumic acid. Single-channel currents were recorded in the outside-out configuration with membrane potential clamped at -151 mV. The control trace was obtained 10 s before adding the channel blocker, while the trace in the presence of niflumic acid was obtained about 10 s after adding the blocker. The pipette solution included 75 mM SO_4^{2-} , 12.4 mM Cl^- , and 3 mM ATP, while the bath was 110 mM Cl^- . C, Single-channel I-V curve for SO_4^{2-} current (\bullet) gave a conductance of 14.9 ± 0.5 pS ($n = 3$). For comparison, channel I-V curve for Cl^- current (\circ) gave a conductance of 22.6 ± 2.3 pS ($n = 3$). The pipette solution included either 150 mM Cl^- or 75 mM SO_4^{2-} , 12.4 mM Cl^- , and 1 mM ATP, while the bath was 110 mM Cl^- . D, I-V relationship of an outside-out excised patch that exhibits both the activity of single channels in the range -200 to -100 mV and a typical current rectification in the range -70 to $+20$ mV, where single channels are not resolved. The pipette solution included 75 mM SO_4^{2-} , 12.4 mM Cl^- , and 1 mM ATP, while the bath was 110 mM Cl^- .

pipette in the whole-cell configuration, the peak current was only decreased by $12\% \pm 6\%$ after 15 min ($n = 8$) and by $19\% \pm 4\%$ after 25 min ($n = 4$), whereas at this latter time the voltage-dependent current was completely lost with all other anions tested. Thus, SO_4^{2-} is not only a substrate for the voltage-dependent anion channel, it also prevents its run-down. This suggests that SO_4^{2-} ions play a regulatory role on channel activity.

Single-Channel Analysis of the SO_4^{2-} Current

To analyze further the permeation of SO_4^{2-} ions through the voltage-dependent anion channel of the hypocotyl, we recorded the single-channel activity in the outside-out configuration. Again, in contrast with what happens with Cl^- , in the presence of intracellular SO_4^{2-} , the anion channel activity did not undergo any run-down. While this allowed us to record channel activity for over 1 h on the same patch, we could never isolate any patch containing less than about five to 10 active channels. This impaired the analysis of channel activity, allowing the single-channel amplitude to be resolved only for potentials more hyperpolarized than -100 mV, at which no more than three to four channel openings overlapped.

Figure 6A illustrates the single-channel activity of the anion channel in the outside-out configuration with an internal solution containing 75 mM SO_4^{2-} and 1 mM ATP. An increase in open probability when the membrane is depolarized was observed (compare -181 mV and -141 mV), which correlated with the voltage dependence of the current in the whole-cell configuration. Niflumic acid, the most potent blocker of the whole-cell anion current (Thomine et al., 1997b), inhibited the single-channel activity (Fig. 6B). The amplitude of single-channel currents was analyzed in the voltage range between -200 mV and -150 mV ($n = 3$). A linear regression of the I-V plot of single-channel amplitudes yielded a single-channel conductance of 14.6 ± 0.5 pS (Fig. 6C). When measured in otherwise identical conditions, the conductance was found to be higher with internal Cl^- (22.6 ± 2.3 pS) than with internal SO_4^{2-} (14.6 ± 0.5 pS) (Fig. 6C). Thus, the 5- to 6-fold increase in SO_4^{2-} whole-cell current compared with Cl^- current could not be accounted for by an increase in single-channel conductance.

A linear extrapolation of the experimental I-V curve obtained with SO_4^{2-} crosses the voltage axis for a value of -78 mV. This value is not in agreement with the E_{rev} value of $+16$ mV measured in the whole-cell configuration. This difference likely results from current rectification around the E_{rev} occurring at the single-channel level as it occurred at the whole-cell level. Evidence for single-channel current rectification is given by I-V curves from outside-out excised patches containing 20 to 50 channels: they exhibit both the activity of single channels in the range -200 to -100 mV and a typical current rectification in the range -70 to $+20$ mV, even though single channels cannot be resolved in this range (Fig. 6D).

DISCUSSION

Anion Channel Permeability

We investigated the anion selectivity and permeability of the voltage-dependent anion channel of Arabidopsis hypocotyl cells, and analyzed in parallel the anion content of Arabidopsis plantlets by capillary electrophoresis. Such analysis gives only a mean global concentration for each ion species and does not provide information on the localization within plant tissues and cell compartments, but helped us to identify putative substrates for the plasma membrane anion channels.

We found that Arabidopsis anion channels are highly permeable to NO_3^- . A large NO_3^- permeability was also found for the two types of anion channels of fava bean guard cells (rapid type: $\text{NO}_3^- [4.2] > \text{Cl}^- [1] \gg \text{malate}^{2-} [0.1]$, Hedrich and Marten, 1993; slow type: $\text{NO}_3^- [20.9] > \text{Cl}^- [1] \gg \text{malate}^{2-} [0.24]$, Schmidt and Schroeder, 1994), anion channels from wheat root (Skerrett and Tyerman, 1994), cotyledonary cells of amaranth ($\text{NO}_3^- [2.4] > \text{Cl}^- [1]$, Terry et al., 1991), pea epidermal cells ($\text{NO}_3^- [1.34] > \text{Cl}^- [1] \gg \text{malate}^{2-} [0.002]$, Elzenga and Van Volkenburgh, 1994), and suspension-cultured coffee cells (Dieudonné et al., 1997). High NO_3^- permeability thus seems to be a general feature of plant plasma membrane anion channels. The finding that SO_4^{2-} , which is usually considered to be a weakly permeant or non-permeant ion in anion channels, was indeed permeant in the Arabidopsis voltage-dependent anion channel is a striking and novel result from this study. Although the SO_4^{2-} uptake transporter of the plasma membrane has been extensively studied (Rennenberg et al., 1989; Clarkson et al., 1992), we report here the first example (to our knowledge) of large channel-mediated SO_4^{2-} currents.

Phosphate permeability has not been investigated because Ca^{2+} phosphate precipitation is a technical limitation that we have not yet been able to overcome. Malate is only weakly permeant through the Arabidopsis hypocotyl anion channel, as already shown for the rapid and slow anion channels in guard cells (Hedrich and Marten, 1993; Schmidt and Schroeder, 1994). Glu, with the highest M_r of the anions tested, is not significantly permeant and can thus be safely used as a reference nonpermeating anion. Our data showing small but reproducible HCO_3^- currents open an interesting new area of investigations. HCO_3^- permeability of plant anion channels has, to our knowledge, never been reported, and even information concerning the permeability of animal channels to HCO_3^- is scarce. However, HCO_3^- permeability can be quite significant, as exemplified by the anion channel of human secreting epithelia, for which a HCO_3^- permeability ratio PHCO_3^- to PCl^- in the range of 0.50 to 0.64 has been reported (Tabcharani et al., 1989) and by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator for which a PHCO_3^- to PCl^- ratio of 0.14 to 0.25 has been recently measured (Linsdell et al., 1997). Several technical difficulties, among which the small amplitude of the currents and the run-down of the channel, limit the study of the HCO_3^- currents mediated by the voltage-dependent anion channel

of *Arabidopsis* hypocotyls. Nevertheless, the potential roles of channel-mediated HCO_3^- fluxes in pH regulation and/or carbon metabolism call for such a study to be undertaken.

The high NO_3^- and SO_4^{2-} whole-cell currents mediated by the voltage-dependent anion channel of *Arabidopsis* hypocotyls, combined with the high concentrations of NO_3^- and SO_4^{2-} in plantlet tissues, suggest that these two ions are in vivo substrates of the channel and that the channel could play a role in the homeostasis of their cellular concentrations.

SO_4^{2-} Regulation of the Anion Channel

In addition to its unusual permeation, the second property of SO_4^{2-} is its regulatory effect on the channel. As measured on excised outside-out patches, the anion channel conductance was higher in the presence of internal Cl^- compared with SO_4^{2-} . This can be reconciled with the results of whole-cell E_{rev} measurements. These E_{rev} values indicate that SO_4^{2-} has a higher affinity for the channel pore than Cl^- . As SO_4^{2-} is more tightly bound inside the channel, it tends to reside longer in the channel pore, which results in a lower rate of permeation (as revealed by lower single-channel conductance). However, the high whole-cell current density cannot be accounted for by a higher permeation rate, since the single-channel conductance is actually lower. This indicates that SO_4^{2-} modifies other parameters that determine the whole-cell current density: the open probability (P_o) or the number of active channels (N).

From the single-channel amplitude of the SO_4^{2-} current at the peak potential (Fig. 6C) and the mean whole-cell current density at the same potential (Fig. 1C), we estimated at least 4,000 to 6,000 active channels for a cell 40 μm in diameter. A number of active channels about 10-fold lower was estimated to account for whole-cell Cl^- currents. These estimations suggest that the large amplitude of the whole-cell SO_4^{2-} currents compared with the Cl^- currents results not only from the more hyperpolarized activation potential (see Fig. 1) but also from a regulatory effect of SO_4^{2-} on the number of active channels. Another effect of SO_4^{2-} was to prevent the run-down of the anion current both in the whole-cell and in the outside-out configuration. Thus, SO_4^{2-} is able to maintain the channel in an active state. This effect was initially observed when this anion was used as the major substrate for the anion channel, i.e. with 75 mM internal SO_4^{2-} . No dose response of the regulatory effect of SO_4^{2-} has been constructed, but when the SO_4^{2-} solution was diluted in the Cl^- solution to one-half (75 mM Cl^- and 37.5 mM SO_4^{2-}), one-fourth (112.5 mM Cl^- and 18.8 mM SO_4^{2-}), and one-sixteenth (131.3 mM Cl^- and 9.4 mM SO_4^{2-}), the run-down remained slower than in the presence of Cl^- only (data not shown). The fact that SO_4^{2-} was also able to prevent run-down in excised patches suggests either a direct action on the channel or a membrane-delimited activation pathway. The mechanism underlying the regulatory effect of SO_4^{2-} is still unknown, but it appears to be quite different from other types of run-down prevented by effectors of tubulin (Thion et al., 1996, 1998), indicating the involvement of the cytoskeleton,

or by effectors of protein kinase or phosphatase (Wang et al., 1991), indicating a regulation via phosphorylation. The stabilizing effect of SO_4^{2-} suggests an original mechanism that could involve a regulatory site where most anions except SO_4^{2-} bind and induce run-down or where only SO_4^{2-} can bind to prevent run-down. Understanding this mechanism will require further investigation.

A Metabolic Link between NO_3^- and SO_4^{2-} Permeation and the Regulation of the Channel by Nucleotides?

Considering together the high NO_3^- and SO_4^{2-} whole-cell currents mediated by the channel and the channel regulation by nucleotides raises the hypothesis that this channel could function as a metabolic valve to avoid the cytoplasmic accumulation of NO_3^- and SO_4^{2-} ions when they cannot be extensively metabolized. SO_4^{2-} assimilation requires an ATP-sulfurylase whose activity is directly controlled by the ATP status (Schmidt and Jäger, 1992), while NO_3^- reduction and incorporation into amino acids is a highly energy-consuming process (Botrel and Kaiser, 1997). The voltage-dependent anion channel could be involved in the regulation of the cytosolic concentration of NO_3^- and SO_4^{2-} , depending on the variation of the energy balance of the cell. When the energy level of the cell is high, which is reflected by an increased cytosolic ATP concentration, the efflux channel is inhibited (Thomine et al., 1997a), NO_3^- and SO_4^{2-} are trapped in the cytoplasm, where they can be reduced and incorporated into amino acids. Alternatively, when the energy level of the cell is decreased, the ATP and ADP concentrations are reduced and the channel is not inhibited, allowing the efflux of these anions out of the cytoplasm, where no energy for their metabolism is available.

In conclusion, the voltage-dependent anion channel of *Arabidopsis* hypocotyl cells shares a high permeability to NO_3^- with the previously described plant anion channels. It exhibits a first original property of being permeable to SO_4^{2-} with a unitary conductance about two-thirds that of Cl^- . The second original property concerns the strong regulatory effect of SO_4^{2-} , increasing the number of active channels per cell and responsible for the large whole-cell SO_4^{2-} currents measured. These properties associated with high concentrations of NO_3^- and SO_4^{2-} in *Arabidopsis* plantlets highlight the likely participation of the voltage-dependent channel in in vivo NO_3^- and SO_4^{2-} fluxes through the plasma membrane contributing to the homeostasis of their cellular concentrations and metabolism.

Received January 4, 1999; accepted June 8, 1999.

LITERATURE CITED

- Botrel A, Kaiser WM (1997) Nitrate reductase activation state in barley roots in relation to the energy and carbohydrate status. *Planta* **201**: 496–501
- Cho MH, Spalding EP (1996) An anion channel in *Arabidopsis* hypocotyls activated by blue light. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 8134–8138

- Clarkson DT, Hawkesford MJ, Davidian JC, Grignon C (1992) Contrasting responses of sulfate and phosphate transport in barley (*Hordeum vulgare* L.) roots to protein-modifying reagents and inhibition of protein synthesis. *Planta* **187**: 306–314
- Dean JA (1985) Lange's Handbook of Chemistry, Ed 13. McGraw-Hill, New York
- Dieudonné S, Forero ME, Llano I (1997) Two different conductances contribute to the anion current in *Coffea arabica* protoplasts. *J Membr Biol* **159**: 83–94
- Ebel J, Cosio EG (1994) Elicitors of plant defense responses. *Int Rev Cytol* **148**: 1–36
- Elzenga JTM (1991) Patch clamping protoplasts from vascular plants. *Plant Physiol* **97**: 1573–1575
- Elzenga JTM, Van-Volkenburgh E (1994) Characterization of ion channels in the plasma membrane of epidermal cells of expanding pea (*Pisum sativum* arg.) leaves. *J Membr Biol* **137**: 227–235
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* **391**: 85–100
- Hedrich R, Marten I (1993) Malate induced feedback regulation of plasma membrane anion channels could provide a CO₂ sensor to guard cells. *EMBO J* **12**: 897–901
- Hille B (1992) Ionic Channels of Excitable Membranes, Ed 2. Sinauer Associated, Sunderland, MA
- Jabs T, Tschöpe M, Colling C, Hahlbrock K, Scheel D (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂²⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 4800–4805
- Lewis CA (1979) Ion-concentration dependence of the reversal potential and the single channel conductance of ion channels at the frog muscular junction. *J Physiol* **286**: 417–445
- Linsdell P, Tabcharani JA, Rommens JM, Hou Y-X, Chang X-B, Tsui L-C, Riordan JR, Hanrahan JW (1997) Permeability of wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane regulator chloride channels to polyatomic anions. *J Gen Physiol* **110**: 355–364
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473–497
- Neher E (1992) Correction for liquid junction potentials in patch-clamp experiments. *Methods Enzymol* **207**: 123–131
- Rennenberg H, Kemper O, Thoene B (1989) Recovery of sulphate transport into heterotrophic tobacco cells from inhibition by reduced glutathione. *Physiol Plant* **76**: 271–276
- Schmidt A, Jäger K (1992) Open questions about sulfur metabolism in plant. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **43**: 325–349
- Schmidt C, Schroeder JI (1994) Anion selectivity of slow anion channels in the plasma membrane of guard cells. *Plant Physiol* **106**: 383–391
- Skerrett M, Tyerman SD (1994) A channel that allows inwardly directed fluxes of anions in protoplasts derived from wheat roots. *Planta* **192**: 295–305
- Tabcharani JA, Jensen TJ, Riordan JR, Hanrahan JW (1989) Bicarbonate permeability of the outwardly rectifying anion channel. *J Membr Biol* **112**: 109–122
- Terry BR, Tyerman SD, Findlay GP (1991) Ion channels in the plasma membrane of *Amaranthus* protoplasts: one cation and one anion channel dominate the conductance *J Membr Biol* **121**: 223–236
- Thion L, Mazars C, Nacry P, Bouchez D, Moreau M, Ranjeva R, Thuleau P (1998) Plasma membrane depolarization-activated calcium channels, stimulated by microtubule-depolymerizing drugs in wild-type *Arabidopsis thaliana* protoplasts, display constitutively large activities and a longer half-life in *ton 2* mutant cells affected in the organization of cortical microtubules. *Plant J* **13**: 603–610
- Thion L, Mazars C, Thuleau P, Graziana A, Rossignol M, Moreau M, Ranjeva R (1996) Activation of plasma membrane voltage-dependent calcium-permeable channels by disruption of microtubules in carrot cells. *FEBS Lett* **393**: 13–18
- Thomine S, Guern J, Barbier-Brygoo H (1997a) Voltage-dependent anion channel of *Arabidopsis* hypocotyls: nucleotide regulation and pharmacological properties. *J Membr Biol* **159**: 71–82
- Thomine S, Lelièvre F, Boufflet M, Guern J, Barbier-Brygoo H (1997b) Anion channel blockers interfere with auxin responses in dark-grown *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Physiol* **115**: 533–542
- Thomine S, Zimmermann S, Guern J, Barbier-Brygoo H (1995) ATP-dependent regulation of an anion channel at the plasma membrane of epidermal cells of *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Cell* **7**: 2091–2100
- Thuleau P, Ward JM, Ranjeva R, Schroeder JI (1994) Voltage-dependent calcium-permeable channel in the plasma membrane of higher plant cell. *EMBO J* **13**: 2970–2975
- Wang L-M, Salter MW, MacDonald JF (1991) Regulation of kainate receptors by cAMP-dependent protein kinase and phosphatase. *Science* **253**: 1132–1134
- Ward JM, Pei Z-M, Schroeder JI (1995) Role of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants. *Plant Cell* **7**: 833–844

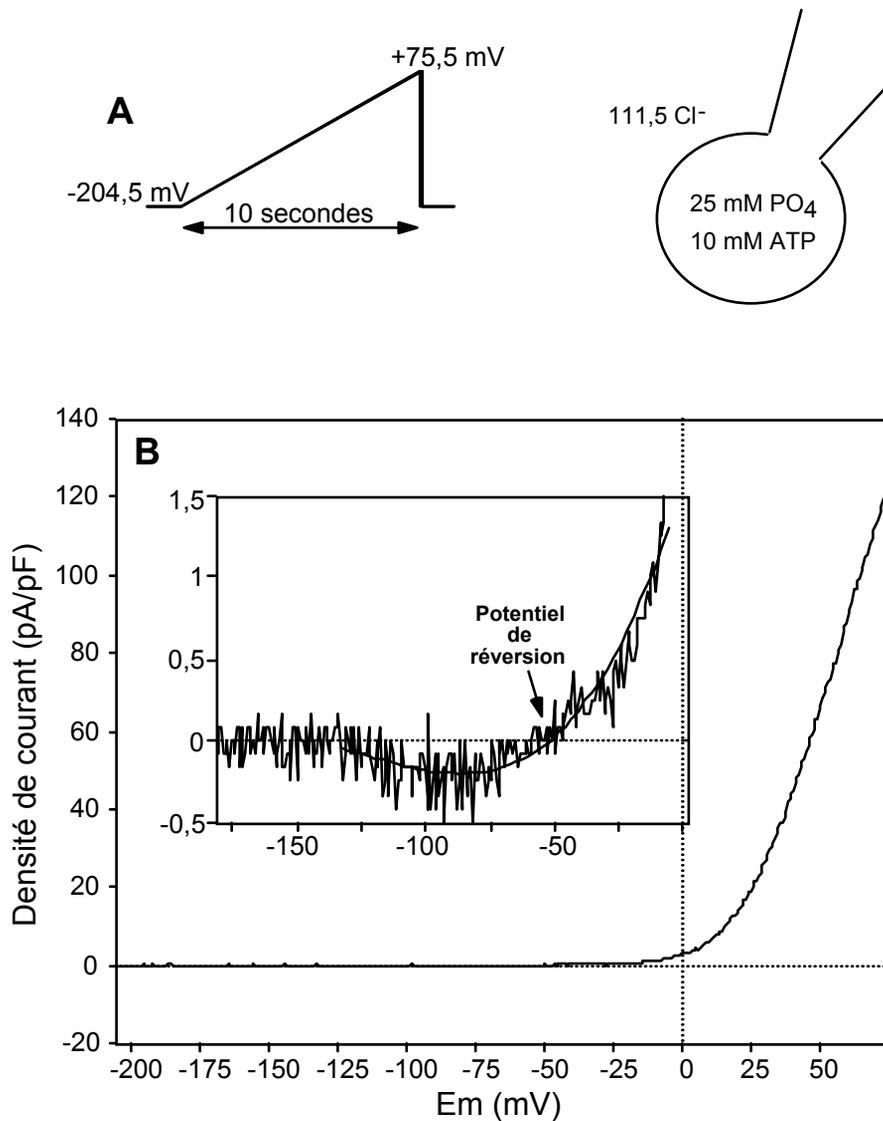


Figure II-1 : Le phosphate est imperméant dans le canal rapide. (A) Protocole électrique et solutions ioniques. Le protocole de voltage est une rampe de $-204,5 \text{ mV}$ à $75,5 \text{ mV}$ à 25 mV/sec . Milieu interne: 50 mM CsOH , $50 \text{ mM PO}_4\text{H}_3$, 2 mM MgCl_2 , 5 mM EGTA , 10 mM MgATP , 20 mM Hepes/Tris (pH 6,2), 450 mOsm . Milieu externe: 50 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , $0,5 \text{ mM LaCl}_3$, 10 mM Mes/Tris (pH 5,7). (B) Courbe courant-voltage. Encart: Grossissement de l'enregistrement montrant le pic de courant caractéristique du canal anionique rapide et son potentiel de réversion, très négatif.

b- Complément de résultat sur la perméabilité: le phosphate est un ion imperméant dans le pore du canal anionique à cinétiques rapides

Le dosage des anions dans la plantes a révélé de fortes concentrations en nitrate, en sulfate et en phosphate qui justifient l'étude de la sélectivité des canaux anioniques de la membrane plasmique. La perméation du sulfate est un résultat intéressant et nouveau. Par contre, le phosphate de par sa caractéristique de précipitation en présence de calcium, cation majeur dans le bain, n'avait été testé ni sur la perméabilité, ni sur son impact sur le run-down au moment de la parution de l'article n°1. En effectuant les scellements dans un bain sans calcium et en perfusant ce dernier avant de passer en configuration cellule-entière, il est possible d'enregistrer le comportement du courant rapide et de mesurer la perméabilité relative (figure II-1). Les quelques expériences effectuées, réalisées avec 50 mM CsH_2PO_4 dans la solution de pipette, semblent indiquer que le phosphate n'est pas perméant dans le canal rapide. Par exemple, dans le cas du protoplaste présenté dans la figure II-1, le potentiel de réversion est aux environs de -50 mV, ce qui est caractéristique d'un anion interne très peu perméant (le rapport de perméabilité $P_{\text{PO}_4}/P_{\text{Cl}}$ est proche de 0). Comme on peut s'y attendre, le pic caractéristique de courant aux environs de -100 mV, qui correspond à un efflux d'anions, est très réduit, et probablement du en majorité aux 12,4 mM Cl^- dont la présence est requise dans la solution de pipette.

c- Sulfate et modulation de l'activité dans le temps

Une des caractéristiques la plus étonnante du canal est la fluctuation de son activité au cours du temps lorsque l'anion perméant dans la solution de pipette est le chlore ou le nitrate. Lors de l'expérience type de patch-clamp (article n°1, figure 5, point blanc), après le passage en configuration cellule-entière, on assiste à l'apparition d'un courant caractéristique de l'activité canal rapide, en particulier un pic de courant aux potentiels proches de -100 mV. Celui ci atteint un équilibre correspondant à une activité maximum qui est maintenu durant une période parfois très brève ou parfois de quelques dizaines de minutes. Au bout d'un certain temps, la conductance commence à décroître et finit par disparaître totalement. C'est ce que l'on appelle le "Run-down". Les durées relatives des différentes phases sont très variables ce qui rend leur étude difficile. Ce phénomène d'activation momentanée puis d'inactivation peut être redéclenché par une "suction", c'est à dire une perturbation du contenu du protoplaste grâce au système de contrôle de la tension membranaire du poste de patch-clamp. La perturbation du cytoplasme, observable au microscope lors des succions, provoque des phénomènes de tension membranaire locale, de rupture d'endomembrane et probablement de perturbation du cytosquelette. Des canaux anioniques ont été décrits comme étant activés par la tension, néanmoins cette activation est directe et rapide alors que dans notre cas les canaux sont activés petit à petit, ce qui prend plusieurs minutes voir plusieurs dizaines de minutes si la suction est douce. Ce phénomène de recrutement peut aussi s'expliquer par la variation de la teneur de certaines molécules dans le cytoplasme ou la variation d'activité d'enzymes clefs. De nombreux candidats potentiels (phosphorylation, pH, cytosquelette, calcium...) ont été testés sans aucun résultat encourageant (Thomine, 1997). L'étude de la sélectivité du canal, et en particulier l'utilisation du sulfate comme anion perméant a, contre toute attente,

débloquée la situation. La figure 5 de l'article n°1 montre quelorsque l'on utilise une solution de pipette à base de sulfate, l'activité du canal se maintient dans le temps. Des expériences ultérieures confirment que cela est vrai pendant des heures.

Une question non tranchée à ce jour est de savoir si cet effet sulfate est direct sur la protéine canal ou non. C'est un point primordial à aborder si on envisage d'utiliser cette caractéristique de régulation dans un crible d'expression en système hétérologue. Néanmoins malgré nos efforts, cette question n'est à ce jour pas tranchée. Par exemple, certains protoplastes (<5%) ne présentent pas spontanément le courant anionique à cinétiques rapides lors du passage en configuration cellule-entière surtout si celui-ci se fait délicatement et ceci malgré d'importantes concentrations de sulfate. Dans la majorité des cas, la fameuse "succion", c'est à dire un brassage du cytoplasme, permet une activation ultérieure du canal qui ne subit pas de "run-down" par la suite. Ces résultats suggèrent que les canaux peuvent être occasionnellement muets en condition de sulfate interne. Le sulfate n'est donc pas directement un activateur mais pourrait plutôt être un agent stabilisant de l'activité du canal provoquée par la violence du passage en configuration cellule-entière. Cette constatation ne milite donc pas en faveur d'une activation directe due à l'interaction canal/sulfate. Par contre on peut stipuler l'existence probable d'un autre agent intervenant dans la régulation du canal. A ce jour et malgré les nombreuses conditions testées, sa nature reste inconnue. En configuration de patch isolé et de sulfate interne, le canal ne présente pas de diminution apparente d'activité alors que cette configuration est souvent présentée comme "lavant" efficacement une grande partie des protéines solubles. Ceci va dans le sens d'un agent non soluble.

Pour aller plus loin dans l'étude de cette régulation, il nous faudrait être capable de modifier la composition de la solution de pipette au cours du scellement. Malheureusement il n'existe pas à ma connaissance de sulfate "cagé", libéré conditionnellement, ni d'ionophore nous permettant de faire pénétrer le sulfate dans la solution de pipette à partir du bain. Enfin les systèmes de perfusions directes de la solution de pipette sont encore très délicats à utiliser et difficiles à mettre au point au laboratoire.

d- Avancées techniques en rapport avec la régulation/perméation du sulfate

La régulation de l'activité par le sulfate perméant, outre qu'elle soit une caractéristique tout à fait nouvelle et originale du canal, présente deux avantages évidents.

Le premier est d'ordre technique: en patch-clamp, la stabilité dans le temps de l'activité d'un canal est un atout majeur pour l'étude d'autres régulations: elle permet d'avoir des contrôles internes. Par exemple, l'étude qui est présentée dans l'article n°2 traitant de la régulation par le voltage du canal et qui a nécessité la perfusion de plusieurs bains différents sur chaque protoplaste en configuration cellule-entière, aurait été difficilement réalisable sans cette connaissance de la régulation par le sulfate. Par contre, on ne peut pas suivre l'impact des traitements sur le run-down, qui comme nous l'avons dit semble être une régulation majeure du canal.

L'autre avantage conféré par cette sélectivité étonnante en faveur du sulfate est la possibilité d'impliquer le canal rapide dans d'autres types d'investigation où l'on aura réussi à montrer un transport de sulfate. Cela représente à mon sens un argument

beaucoup plus convaincant que des arguments pharmacologiques dont on commence à appréhender les limites.

3- Etude de la fermeture dépendante du voltage du canal à cinétiques rapides: arguments pour une obstruction par les nucléotides cytosoliques

La fermeture du canal anionique à cinétiques rapides dépendante du voltage est probablement physiologiquement significative car elle intervient à des potentiels proches du potentiel de repos de la membrane plasmique des cellules végétales. Il nous a donc paru intéressant de mieux comprendre le mécanisme biophysique de cette régulation. Ce travail a été initié par Sébastien Thomine lors de la fin de sa thèse et part de la constatation que les nucléotides régulent de façon dépendante de la dose la fermeture du canal par le voltage grâce à un mécanisme ne faisant pas intervenir de phosphorylation (Thomine *et al.*, 1997a). L'hypothèse a été émise par Jacques Neyton que le pore puisse être directement obstrué par un nucléotide de façon similaire à l'obstruction du canal NMDA (pour *N-Méthyl D-Aspartate*) par le magnésium externe (Mayer *et al.*, 1984). L'objet de l'article qui suit est l'apport d'arguments en faveur de ce blocage dépendant du voltage par les nucléotides internes ainsi que la caractérisation de la régulation par ces nucléotides. L'annexe C traite de la modélisation informatique de ce phénomène.

a- Article n°2: "Nucleotides provide a voltage-sensitive gate for the rapid anion channel of Arabidopsis hypocotyl cells"

Nucleotides Provide a Voltage-sensitive Gate for the Rapid Anion Channel of *Arabidopsis* Hypocotyl Cells*

Received for publication, April 9, 2001, and in revised form, July 24, 2001
Published, JBC Papers in Press, July 25, 2001, DOI 10.1074/jbc.M103126200

Jean Colcombet^{‡§}, Sébastien Thomine[‡], Jean Guern, Jean-Marie Frachisse,
and Hélène Barbier-Brygoo

From the Institut des Sciences du Végétal, UPR 2355, Centre National de la Recherche Scientifique,
Avenue de la Terrasse, F-91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

The rapid anion channel of *Arabidopsis* hypocotyl cells is highly voltage-dependent. At hyperpolarized potentials, the channel is closed, and membrane depolarization is required for channel activation. We have previously shown that channel gating is regulated by intracellular nucleotides. In the present study, we further analyze the channel gating, and we propose a mechanism to explain its regulation by voltage. In the absence of intracellular nucleotides, closure at hyperpolarized voltages is abolished. Structure-function studies of adenylylated nucleotides show that the apparent gating charge of the current increases with the negative charge carried by nucleotides. We propose that the fast anion channel is gated by the voltage-dependent entry of free nucleotides into the pore, leading to a voltage-dependent block at hyperpolarized potentials. In agreement with this mechanism in which intracellular nucleotides need to be recruited to the channel pore, kinetic analyses of whole-cell and single-channel currents show that the rate of closure is faster when intracellular nucleotide concentration is increased, whereas the rate of channel activation is unchanged. Furthermore, decreasing the concentration of extracellular chloride enhances the intracellular nucleotide block. This result supports the hypothesis of a mechanism in which blocking nucleotides and permeant anions interact within the channel pore.

The molecular mechanisms of voltage gating are well understood for some channels. Those mechanisms can vary, but they always involve the movement of charged gating particles through the transmembrane electric field. These gating charges can be intrinsic to the channel protein, as described in potassium, sodium, and calcium channels (1). For instance, in the shaker-like potassium channels described in animal and plant membranes, mutations of basic amino acids of the S4 transmembrane domain drastically change the voltage regulation of the channel, indicating that these amino acids contribute to the gating charge (2). Alternately, voltage-dependent closure can be achieved by voltage-dependent block of the channel pore by a soluble charged molecule. This is the case for NMDA ionotropic receptors (3, 4) and inward rectifying potassium channels (5), which are gated by soluble cations. Except

for the channels belonging to the shaker family, the gating mechanisms of plant ion channels remain poorly understood.

Plasma membrane anion channels have been identified in a number of different plant tissues (6). Except in guard cells, for which a combination of electrophysiology, pharmacology, and genetic approaches has provided strong evidence that the slow-type anion channel is involved in stomatal closure (7–10), physiological functions of plant anion channels remain to be elucidated. Despite the large electrochemical gradient driving anions outside the cell, anions are accumulated in plant cells in resting conditions. However, signals such as elicitors of plant defense responses, hormones, or hypo-osmotic stress that depolarize the membrane induce anion effluxes that can be accounted for by the activation of anion channels (11–14). The tight control of anion channel activation by intra- and extracellular factors is thus an important step in signal transduction pathways.

Few studies on the regulation of the voltage gating have been performed on plant anion channels. The gating of the fast anion channel (GCAC1) of *Vicia faba* guard cells is affected by both extracellular factors such as chloride, malate (15, 16), and auxins (17) and intracellular factors such as nucleotides, which have been proposed to be allosteric regulators of the channel protein (18). A different mode of regulation by ATP through cytosolic protein phosphorylation has been described for the voltage-dependent anion channel of tobacco cell suspension (19). Whatever the complexity of their regulation, plant anion channels are basically voltage-sensitive and open upon membrane depolarization. Therefore, a good knowledge of the voltage-dependent gating mechanisms is needed to further understand how regulatory agents affect anion channel activity.

Two anion channels with distinct regulation characteristics reside at the plasma membrane of epidermal cells of *Arabidopsis* hypocotyls: (a) a highly nitrate-permeable channel with slow activation and deactivation kinetics (20), and (b) a rapid voltage-dependent anion channel permeable to sulfate (21–23). In a previous study, Thomine *et al.* (22) have shown, based on the activity of nonhydrolyzable nucleotides, that the nucleotide regulation of the rapid anion channel does not require ATP hydrolysis and suggested a regulation through a binding site for free ATP. However, the biophysical mechanism of nucleotide action was not elucidated. In the present study, we propose that the fast anion channel is gated mainly by the voltage-dependent entry of nucleotides into the channel pore, leading to a voltage-dependent block at hyperpolarized potentials. This model is supported by structure-function studies of nucleotides and kinetic analyses. Furthermore, we show that extracellular permeant anions can counteract the block by intracellular nucleotides, which indicates that blocking nucleotides and permeant anions interact within the channel pore.

* This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[‡] Both authors contributed equally to this work.

[§] To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-1-69823870; Fax: 33-1-69823768; E-mail: colcombet@isv.cnrs-gif.fr.

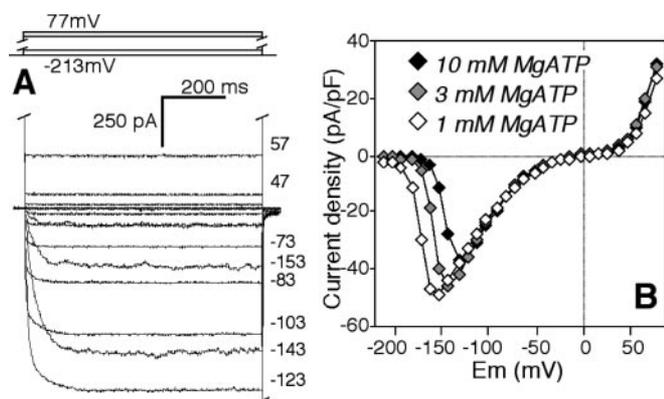


FIG. 1. Rapid anion current of epidermal cells from *Arabidopsis hypocotyls*. *A*, typical whole-cell currents recorded from plasma membrane with an activating pulse protocol. From a holding potential of -213 mV, 794-ms pulses were applied from -213 to 77 mV with a 10 -mV increment every 3 s. The pipette contained 25 mM Cs_2SO_4 , 2 mM MgCl_2 , 4.2 mM CaCl_2 , 5 mM EGTA, 10 mM Hepes-Tris (pH 7.2), and 10 mM MgATP, adjusted to 450 mosmol. The bath contained 50 mM CaCl_2 , 0.5 mM LaCl_3 , and 10 mM MES-Tris (pH 6), adjusted to 450 mosmol. *B*, examples of I-V plots of the steady-state current obtained from the protocol shown in *A* for protoplasts loaded with 1 , 3 , and 10 mM MgATP.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plant Material, Protoplast Isolation, and Electrophysiological Investigations—*Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia) plantlets were grown, and protoplasts from hypocotyl epidermal cells (diameter, 25 – 75 μm ; membrane capacity, 20 – 50 pF) were prepared as described previously (21). Patch clamp experiments were performed as described by Hamill *et al.* (24) using an Axon 200A amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA) for whole-cell and single-channel recordings. During measurements, freshly isolated protoplasts were maintained in a bath medium containing 50 mM CaCl_2 , 0.5 mM LaCl_3 , and 10 mM MES¹-Tris (pH 6). The nitrate bath contained 50 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ instead of 50 mM CaCl_2 . The Cl-free bath solution contained 50 mM CaOH_2 and 0.5 mM LaOH_3 adjusted to pH 6 with MES (CaMES₂). Bath solutions with variable Cl concentrations were prepared either by mixing the 50 mM CaCl_2 , 0.5 mM LaCl_3 , and 10 mM MES-Tris (pH 6) with the Cl-free bath in different proportions or by mixing a low MES, high chloride bath (0.5 mM LaCl_3 , 149.25 mM CaCl_2 , and 1 mM MES/CaOH, pH 6) with a low MES, low chloride bath (0.5 mM LaCl_3 , 0.75 mM CaCl_2 , 1 mM MES/CaOH, pH 6) to reduce a possible effect of MES.

The patch pipettes were filled with 25 mM Cs_2SO_4 for whole-cell experiments or with 140 mM Cs_2SO_4 for single-channel experiments, together with 2 mM MgCl_2 , 10 mM Hepes-Tris (pH 7.2), 5 mM EGTA, and 4.2 mM CaCl_2 (free $[\text{Ca}^{2+}] = 1$ μM). Nucleotides were added in the intracellular solution as indicated in the figure legends. ATP was added to the pipette solution as MgATP salts, and the corresponding free ATP concentrations were calculated by assuming that the main species of ATP were ATP^{4-} , ATPH^{3-} , MgATP^{2-} , and MgATPH^- with $\text{pK}_a = 6.63$ and 4.72 for ATP and MgATP, respectively, and a dissociation constant of $10^{-4.7}$ for the MgATP complex (25). The osmolarities of bath and pipette solutions were adjusted to 450 mosmol with mannitol using a Wescor 5500 vapor pressure osmometer (Wescor, Logan, UT).

Patch clamp experiment and data acquisition were performed as described previously (23). To change the bath solution, the reference electrode was filled with 100 mM KCl prolonged by a plug (1% agarose and 3 M KCl), and the bath solutions were continuously perfused at a rate of 1 – 2 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

RESULTS

Intracellular Nucleotides Affect the Voltage Dependence of the Rapid Anion Channel—To study the characteristics of the rapid anion channel, depolarizing voltage steps were applied to the plasma membrane (Fig. 1A). Fig. 1B shows representative steady-state I/V relationships obtained with 50 mM CaCl_2 in the bath and 25 mM Cs_2SO_4 in the pipette solution, with 1 , 3 , or 10 mM MgATP corresponding to 9.8 , 28.9 , and 92.8 μM intra-

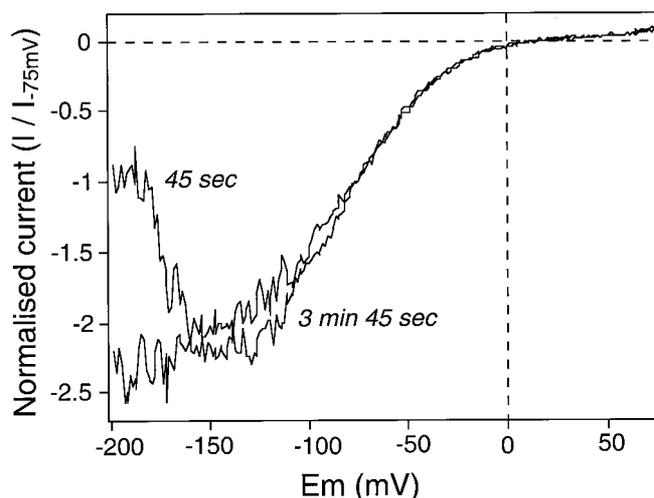


FIG. 2. Voltage-dependent closure is abolished in the absence of intracellular nucleotides. I-V curves obtained on an outside-out macropatch with a voltage ramp from -205 to 75 mV at 60 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Time after the whole-cell establishment is indicated, and excision occurred at 30 s. The holding potential is -205 mV. I-V curves are normalized with currents at -75 mV, which are -53.9 pA at 45 s and -42.6 pA at 3 min 45 s. The pipette contained 140 mM Cs_2SO_4 , 2 mM MgCl_2 , 4.2 mM CaCl_2 , 5 mM EGTA, 10 mM Hepes-Tris (pH 7.2), and no nucleotide, adjusted to 450 mosmol. The bath contained 50 mM CaCl_2 , 0.5 mM LaCl_3 , and 10 mM MES-Tris (pH 6), adjusted to 450 mosmol.

cellular free ATP (ATPi) (25). At very negative potentials, the voltage pulses did not activate any current, indicating that voltage-dependent sulfate-permeable channels are closed. Depolarization of the membrane activated an inward current corresponding to a sulfate efflux. When the membrane was further depolarized, the inward anion current decreased and reversed, and then an outward current corresponding to a chloride influx increased. Under these conditions, when MgATP was raised from 1 to 3 and 10 mM, the peak of sulfate current shifted toward less negative potentials, indicating a shift of the activation threshold (Fig. 1B) as expected from a previous report (22). In addition, when intracellular nucleotides were removed, the channel gating at hyperpolarized voltages was strongly reduced (Fig. 2). Taken together, these initial results suggest a major role of intracellular nucleotides in the gating of the fast anion channel of *Arabidopsis* cells and led us to investigate in more detail the mechanisms by which nucleotides alter anion channel gating.

The Gating Charge Increases with the Negative Charge Carried by a Nucleotide Molecule—To further analyze the gating of the fast anion channel by voltage, a tail protocol (Fig. 3A) was performed. In this protocol, a depolarizing prepulse induces the activation of the fast anion current. The current deactivates rapidly when the membrane potential is stepped back to hyperpolarized values. The instantaneous amplitude at the beginning of the hyperpolarizing step (tail current amplitude) reflects the activation status of the fast anion current at the end of the preceding depolarizing step. Fig. 3B shows the plot of normalized tail current amplitudes against the prepulse potentials, illustrating the voltage-dependent activation of the fast anion channel by depolarization with either 10 mM AMP or 10 mM MgATP in the cytosol. The gating charges deduced from the fit of the data with Boltzmann functions were -3.63 ± 0.12 for free ATP ($n = 7$) and -1.96 ± 0.12 for AMP ($n = 4$), indicating a correlation between the theoretical valence of the free nucleotide and the gating charge of the fast anion current (Fig. 3C). This result shows that the charge carried by the free nucleotide accounts for the gating charge of the current. When raising the MgATP concentration from 1 to 10 mM, the activation curve

¹ The abbreviations used are: MES, 4-morpholineethanesulfonic acid; ATPi, intracellular free ATP; Cle, extracellular chloride.

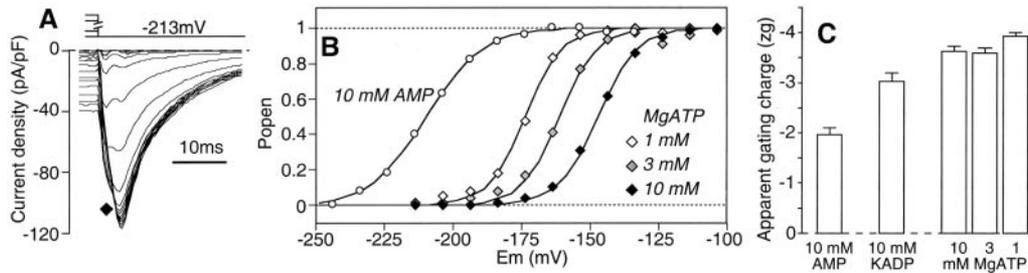


FIG. 3. ATP concentration affects the half-activation potential, whereas the adenosine nucleotide valence affects the apparent gating charge. *A*, typical tail currents recorded from a voltage protocol consisting of a holding potential of -213 mV and 610-ms pulses from -213 to -23 mV with a 10-mV increment every 2 s. Pipette and bath compositions were the same as those described in Fig. 1*A*. *B*, representative examples of normalized gating curves with 10 mM intracellular AMP or 10, 3, or 1 mM intracellular MgATP. The tail currents were measured at the peak after a jump to -243 mV for AMP or a jump to -213 mV for MgATP using the tail protocol described in *A*. The parameters of the fits with Boltzmann curves for the data presented were: $z_g = -2.5, -3.5, -3.7,$ and -3.8 and $V_{1/2} = -209, -147, -161,$ and -173 mV for 10 mM AMP and 10, 3, and 1 mM MgATP, respectively. *C*, values of the apparent gating charge as a function of adenine nucleotide concentrations. The tail protocol described in *A* was used to measure the z_g for different nucleotides. Data were fitted with Boltzmann equations. Pipettes contained either 10 mM AMP, 10 mM KADP, or 1, 3, or 10 mM MgATP, and the $V_{1/2}$ were $-202.6 \pm 2.1, -144.0 \pm 2.6, -169.4 \pm 1.1, -154.9 \pm 2.1,$ and -146.8 ± 1.4 mV ($n = 4-7$), respectively. Each point is the mean \pm S.E. The bath contained 50 mM CaCl_2 , 0.5 mM LaCl_3 , and 10 mM MES-Tris (pH 6), adjusted to 450 mosmol.

was shifted toward less negative potentials, with no change in the apparent gating charge (Fig. 3*B*). Fitting with Boltzmann curves yielded half-activation potentials ($V_{1/2}$) of $-169.4 \pm 1.1, -154.9 \pm 2.1,$ and -146.8 ± 1.4 mV and apparent gating charges (z_g) of $-3.93 \pm 0.08, -3.59 \pm 0.12,$ and -3.63 ± 0.12 ($n = 5, 4,$ and 7) for 9.8, 28.9, and 92.8 μM ATPi, respectively.

Increasing the Internal ATP Concentration Accelerates Fast Anion Channel Deactivation without Altering Its Activation Kinetics—To analyze the effect of intracellular nucleotides on the fast anion current kinetics, we studied the activation and deactivation kinetics in the whole-cell configuration. Stepping from a hyperpolarized potential, where channels are mostly closed, to depolarized potentials, where channels are mostly open, allowed us to monitor the activation kinetics. Upon depolarization of the membrane, the fast anion current activated with biexponential kinetics. The fast time constant that accounts for the activation of 80% of the current was studied. The fast activation time constant was voltage-dependent (Fig. 4*A*). When the activation kinetics were studied using various concentrations of MgATP, the time constants were not significantly different at a given potential. For example, at -93 mV (Fig. 4*B*), a potential at which maximal activation is reached for 9.8, 28.9, and 92.8 μM ATPi, the activation time constants were $1.84 \pm 0.25, 1.62 \pm 0.20,$ and 1.77 ± 0.23 ms ($n = 5, 5,$ and 7), respectively.

Alternatively, stepping back from -13 mV to hyperpolarized potentials at which the channel is closed allowed us to monitor the deactivation kinetics of the current. Under these conditions, the current decayed with biexponential kinetics, and both time constants were voltage-dependent. In contrast with what we observed for the activation kinetics, both deactivation time constants were strongly altered when ATPi was changed (Fig. 4*C*). For example, at -203 mV, a potential at which the fast anion current is completely deactivated with 9.8, 28.9, and 92.8 μM ATPi, the slow deactivation time constants were $7.20 \pm 1.24, 1.27 \pm 0.25,$ and 0.66 ± 0.13 ms ($n = 4, 3,$ and 7), respectively. The relative ratio of the current corresponding to the two time constants was voltage-dependent, with slow deactivating current dominating at moderately hyperpolarized potentials (more depolarized than -193 mV for 10 mM MgATP), and fast deactivating current dominating at moderately hyperpolarized potentials (more hyperpolarized than -193 mV for 10 mM MgATP). Thus, the biexponential kinetics likely reflects the distribution of the channel between two different closed states in a voltage-dependent manner.

To test directly the effect of intracellular free ATP on the rate

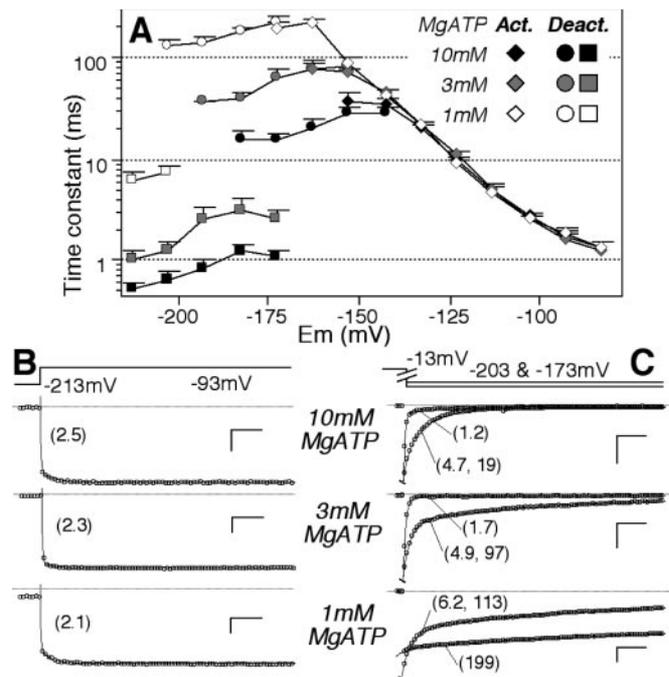


FIG. 4. The deactivation kinetics is dependent on intracellular MgATP concentration. Pipette and bath compositions are the same as those described in Fig. 1*A* with the indicated internal MgATP concentrations. *A*, activation and deactivation kinetics were both voltage-dependent, but only the deactivation was affected by intracellular ATP. Activation kinetics (diamonds) and deactivation kinetics (circles and squares) were fitted by biexponentials. For the activation, only the time constant for the major component was plotted (diamonds). Each point represents the mean \pm S.E. ($n = 3-7$). *B*, ATP dependence of the activation kinetics. The white circles correspond to data samples before and after a step from -213 to -93 mV, showing the time dependence of current activation. Horizontal bar, 100 ms; vertical bar, 200 pA. Lines correspond to biexponential fits, but only the prominent kinetic constants (in ms) are indicated. *C*, ATP dependence of the deactivation kinetics. The white circles correspond to data samples before and after a step from -13 to -213 or -93 mV, showing the time dependence of current deactivation. The membrane potential was clamped at -13 mV, and 488-ms voltage pulses from -213 to -23 mV with a 10-mV increment were applied every 3 s. Horizontal bar, 20 ms; vertical bar, 1 nA. Lines correspond to biexponential fits, and prominent kinetic constants (in ms) are indicated.

of channel closure, we recorded single-channel events with different MgATP concentrations. These outside-out signals were previously shown to carry the fast anion whole-cell cur-

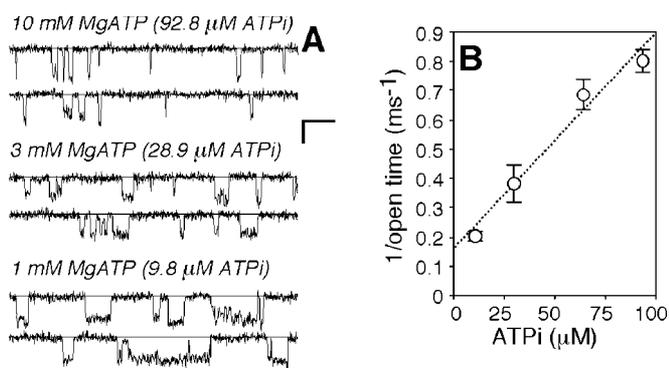


FIG. 5. Intracellular MgATP alters the rate of channel closure. A, example of single-channel recordings at -205 mV with 10, 3, and 1 mM intracellular MgATP. The pipette has the same composition as that described in Fig. 2, except for the indicated MgATP concentrations. Bath is the same as that described in Fig. 2. Horizontal bar, 10 ms; vertical bar, 2 pA. B, the closing rate constant ($1/\text{open time}$) varies linearly with ATPi. Same data acquisition as described in A. Each point is the mean \pm S.E. ($n = 3-4$).

rent (21, 23). Because the channel number in an outside-out patch is in the range of 50–100, we studied the distribution of single channel open times at -205 mV, a potential for which channels are mostly closed, and opening events are distinct. At this potential, the closed state that is reached by fast kinetics strongly predominates, and the fitting of the single-channel mean time histogram yields a single time constant (mean open time). Under these conditions, the open times clearly became longer when ATPi was decreased (Fig. 5A). At a given voltage, the rate of channel closure can be measured directly as the inverse of the mean open time. When the inverse of the mean open time was plotted against ATPi, a linear relationship was obtained (Fig. 5B).

Increasing the External Chloride Concentration Attenuates the Effect of Nucleotides—To further investigate the mechanism by which nucleotides alter the voltage dependence of anion channels, we tested the effect of changing the concentration of extracellular permeant anions on the voltage dependence of the fast anion current. The gradual substitution of the CaCl_2 bath by a CaMES_2 bath led to a shift of the peak current toward less negative potentials (Fig. 6A). Fitting the normalized tail current amplitudes recorded under these conditions with Boltzmann function shows that the $V_{1/2}$ was shifted from -146.8 ± 1.4 mV ($n = 7$) to -98.2 ± 2.0 mV ($n = 3$) using a pipette solution containing internal 10 mM MgATP (Fig. 6, B and C). Similar effects were observed with 1 and 3 mM MgATP (Fig. 6C). The dose-dependent effect of external chloride did not show any saturation up to 100 mM, suggesting a low affinity mechanism (Fig. 6C). To exclude the possibility that the increase in the concentration of MES rather than the decrease in external chloride concentration could be responsible for the modifications of the channel gating, we performed a similar experiment in which the MES concentration was maintained constant and low (1 mM), whereas the CaCl_2 concentration varied (1.5–150 mM). Under these conditions, decreasing the extracellular chloride concentration from 100 to 3 mM led to a shift of $V_{1/2}$ from -144.0 ± 2.2 to -112.7 ± 10.2 mV ($n = 4$) (Fig. 6C). This shift is similar to the shift observed when MES was substituted for chloride. These results show that external anions are able to reduce the effect of intracellular nucleotides on the gating of the fast anion channel. For example, a similar $V_{1/2}$ was obtained with a pipette solution containing 10 mM ATP and a bath containing 100 mM Cl or with a pipette solution containing 1 mM ATP and a bath containing 10 mM Cl. (Fig. 6C). In parallel, we observed an apparent decrease of the gating charge when the external chloride concentration was decreased (Fig.

6B). For example, with 10 mM MgATP in the pipette solution, z_g decreased from -3.63 ± 0.12 to -3.47 ± 0.42 , -2.55 ± 0.19 , and -1.56 ± 0.15 when the Cl concentration was reduced from 100 to 10, 1, and 0 mM, respectively, by substituting CaMES_2 for CaCl_2 . This effect was most obvious at low Cl concentrations, when the chloride concentration was reduced from 10 mM to nominally 0 mM. This result indicates that external anions might also affect the gating charge of the fast anion current.

We then investigated the effect of external chloride on the activation and deactivation kinetics. Depolarizing pulses allowed the analysis of the Cl dependence of activation time constants (Fig. 7A). The biexponential nature of the activation kinetics suggests the existence of at least two distinct closed states for the channel under these conditions (Fig. 7A), as expected from our previous results. Only the time constant corresponding to the major kinetic component is shown in Fig. 7C. The activation time constants were voltage-dependent (Fig. 7C). Decreasing Cl by replacing CaCl_2 with CaMES_2 in the bath solution slowed down the activation kinetics of the fast anion current (Fig. 7, A and C). For instance, at -93 mV, the activation constants were 1.77 ± 0.22 , 18.75 ± 1.90 , 140.50 ± 16.80 , and 322.25 ± 19.58 ms ($n = 7, 4, 4, 4$) for 101.5, 10.15, 1.015, and 0 mM Cl, respectively (Fig. 7A). In contrast, deactivation constants were poorly affected by changes in the external chloride concentration (Fig. 7, B and C). Similar results were obtained when the Cl concentration was reduced by decreasing CaCl_2 in the bath while maintaining a constant concentration of 1 mM MES (data not shown). Thus, the faster channel activation upon depolarization accounts largely for the effect of Cl on the gating of the fast anion channel.

The results obtained in the whole-cell configuration suggest that, at the single-channel level, the rate of opening of the channel should increase with the external chloride activity, whereas the rate of closure should not be strongly affected. We could only measure the mean open time because of the high channel density. At -205 mV, a potential for which open events are distinct, when the external chloride concentration was decreased gradually from 101.5 to 60.9, 30.45, and 0 mM, the mean open times were 4.22 ± 0.41 , 3.58 ± 0.67 , 3.82 ± 0.84 , and 3.42 ± 0.52 ms ($n = 6, 3, 2, 3$; Fig. 7D). Thus, as expected from the whole-cell data, changing the Cl concentration did not significantly affect the mean open time.

Nitrate, a More Permeant Anion, Is More Efficient than Chloride in Attenuating the Effect of Nucleotides—To confirm that the interaction between internal nucleotides and external anions is related to their ability to permeate the channel pore, we studied the effects of external nitrate that has a high permeability ratio relative to chloride (23). When the CaCl_2 bath was replaced by a $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ bath, we observed a shift of the voltage dependence toward more negative potentials. The half-activation potential shifted from -145.6 ± 4.0 to -169.3 ± 5.5 mV ($n = 5$; Fig. 8A), but the apparent gating charge did not change after replacement of chloride ($z_g = -3.49 \pm 0.18$) with nitrate ($z_g = -3.36 \pm 0.16$), indicating that nitrate is more efficient than chloride in counteracting the effect of nucleotides. The two-component deactivation kinetics was poorly affected by the nature of the extracellular anion in the bath (Fig. 8B). However, at a given potential, the activation kinetics became faster when extracellular chloride was replaced by the more permeant anion nitrate. For example, at -133 mV, the activation time constant was 14.6 ± 1.7 ms ($n = 5$) with the CaCl_2 bath and 3.8 ± 0.2 ms ($n = 5$) with the $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ bath (Fig. 8B).

External Nucleotides Induce a Rectification of the Inward Anion Current—Because intracellular nucleotides modify the voltage dependence of the inward current carried by the fast anion channel, we tested whether extracellular perfusion of

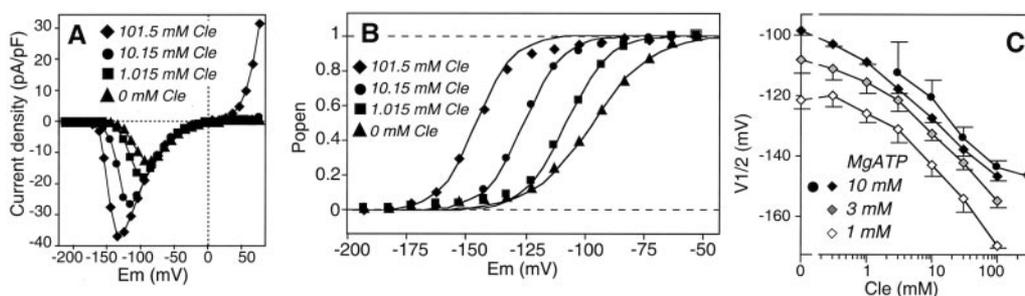


FIG. 6. **Decreasing Cle shifts the half-activation potential of the rapid anion channel toward depolarized voltages.** *A*, examples of steady-state I-V plots obtained from the protocol described in Fig. 1*A*. Pipette has the same composition as described in Fig. 1*A*. The bath chloride concentrations varied from 101.5 to 0 mM as indicated in the figure and were obtained by replacing CaCl_2 with CaMES_2 . *B*, representative examples of normalized gating curves obtained using the tail protocol described in Fig. 3*A* and the conditions described in *A*. The parameters of the fits with Boltzmann curves for the data presented were: $z_g = -3.3, -3.1, -2.9,$ and -2 and $V_{1/2} = -146, -126, -108,$ and -97 mV for 101.5, 10.15, 1.015, and 0 mM extracellular chloride, respectively. *C*, half-activation potential ($V_{1/2}$) as a function of Cle at 1, 3, and 10 mM MgATP. The bath chloride concentrations were modified either by replacing CaCl_2 with CaMES_2 (diamonds) or by decreasing the CaCl_2 concentration while maintaining a 1 mM concentration of MES (circles). Each point represents the mean \pm S.E. ($n = 3-7$). $V_{1/2}$ values were obtained by fitting with Boltzmann equations.

nucleotides could also alter the gating of the outward current generated by this channel. Indeed, when 1 mM MgATP was perfused in the extracellular bath, the gating of the outward rectifying current was strongly affected (Fig. 9). The steady-state current was reduced at depolarized potential, suggesting that external ATP could block the channel in a voltage-dependent manner. Kinetic analysis showed that the block by ATP occurred in a time-dependent manner upon membrane depolarization.

DISCUSSION

In this study, we have conducted experiments to analyze the mechanism by which intracellular nucleotides regulate the voltage dependence of the fast anion channel of *Arabidopsis* hypocotyl cells. Raising ATPi shifts the activation curve of the fast anion current toward less negative potentials without affecting the apparent gating charge. In addition, in the absence of intracellular nucleotides, the channel becomes essentially voltage insensitive. Taken together, these two initial results provide evidence that nucleotides play a key role in the gating mechanism of the channel. This nucleotide regulation is clearly distinct from the voltage-independent regulation reported for the guard cell anion channel GCAC1 (18).

Nucleotides Confer Voltage Dependence to the Channel Through an Open Channel Voltage-dependent Block Mechanism—Our finding that the gating charge increases with the negative charge carried by a nucleotide molecule led us to propose that nucleotides act as gating charges for the fast anion channel by entering the channel pore in a voltage-dependent manner. A similar mechanism of open channel voltage-dependent block has been demonstrated for NMDA ionotropic receptors (3, 4) and inward rectifying potassium channels (K_{in} ; Ref. 5). However, these cation-selective channels are blocked by the entry of soluble cations in the pore such as Mg^{2+} in the case of NMDA receptors or Mg^{2+} and spermidine in the case of K_{in} channels, whereas for the plant fast anion channel, the gating is achieved by the entry of an anionic nucleotide in the pore.

The voltage-dependent open channel block mechanism predicts that channel closure, which requires recruitment of a nucleotide molecule from the cytosol to the channel pore, should be affected by ATPi, whereas channel opening should not. In agreement with the proposed mechanism, we found that the deactivation kinetics of the fast anion current, which reflects the rate of channel closure, is accelerated when the concentration of intracellular nucleotides is increased, whereas the activation kinetics remains unchanged. Under our experimental conditions, biphasic deactivation kinetics could be observed, suggesting that the blocking by nucleotides can lead to

two different closed states. One of them is reached by slower kinetics and predominates at moderately hyperpolarized potentials, whereas the other is reached by fast deactivation kinetics and predominates at very hyperpolarized potentials. Compared with the open channel voltage-dependent block of NMDA receptor by Mg^{2+} (3, 4), the mechanism of nucleotide voltage-dependent block of the fast anion channel is more complex. This is likely due to the fact that nucleotides are larger and more complex blocking particles than Mg^{2+} that can take several different positions in the channel pore and possibly even modify the conformation of the channel protein. Despite this complexity, it is important to note that because both deactivation constants are sensitive to ATP, both closed states correspond to conformations of the channel blocked by ATP. Our data showing that nucleotides can also induce a voltage-dependent block when perfused in the extracellular solution further support the hypothesis that nucleotides block the channel by entering the channel pore. The fact that nucleotides can act from both sides suggests that the blocking mechanism relies on the basic geometry of the pore.

In addition, we studied the effect of intracellular nucleotides on the rate of channel closure at the single-channel level. In agreement with a block of the channel by nucleotides, the rate of channel closure follows the equation:

$$1/t_{\text{open}} = K_{\text{on}}[\text{ATP}] + A \quad (\text{Eq. 1})$$

where K_{on} is the rate constant of free ATP entry into the channel pore at the voltage studied ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), and A reflects the ATP-independent closure. A linear fitting of Fig. 5*B* allowed us to determine a value of $7.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ for K_{on} at -205 mV. This constant is much faster than what is expected for simple diffusion in water and likely reflects the fact that the membrane voltage accelerates nucleotide motion inside the pore. Thus, the binding of ATP, leading to channel closure, occurs within the transmembrane electric field. When the linear relationship is extrapolated to $[\text{ATP}] = 0$, the rate of closure is low. On one hand, this indicates that the voltage-dependent block by intracellular nucleotides largely accounts for the closure of the channel at hyperpolarized potentials. On the other hand, this residual rate of channel closure extrapolated for 0 ATPi, together with the incomplete loss of voltage dependence when the inside of the cell was perfused with an ATP-free solution, suggests the existence of some ATP-independent voltage gating. Finally, it is important to note that this ATP-independent gating would occur at a highly hyperpolarized potential and would only account for a minor fraction of the channel voltage dependence under physiological conditions.

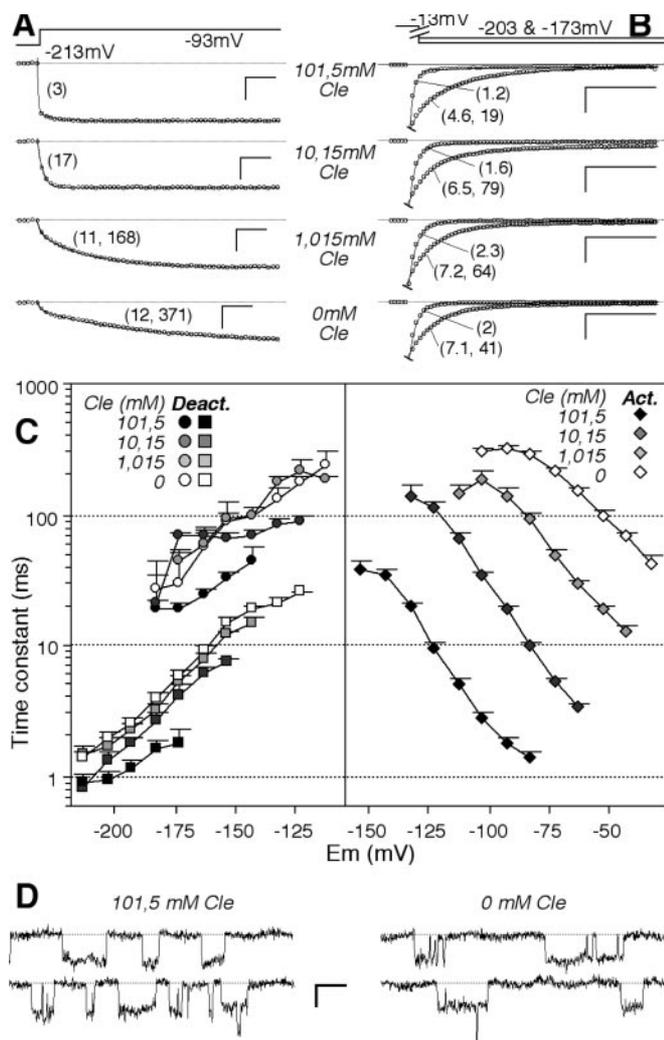


FIG. 7. Changes in Cle modify the activation kinetics but only slightly affect the rate of channel closure. Pipette composition is the same as that described in Fig. 1A with 10 mM MgATP. The bath chloride concentrations varied from 101.5 to 0 mM as indicated in the figure and were obtained by replacing CaCl_2 with CaMES_2 . **A**, Cle dependence of the activating currents (white circles) at -93 mV. Horizontal bar, 100 ms; vertical bar, 200 pA. Lines correspond to biexponential fits, and the significant kinetic constants are indicated. **B**, Cle dependence of the deactivating currents (white circles) at -203 and -173 mV. Horizontal bar, 20 ms; vertical bar, 1 nA. Lines correspond to biexponential fits, and significant kinetic constants are indicated. **C**, activation and deactivation kinetics were both voltage-dependent, but only the activation was affected by Cle. Activation kinetics (diamonds) were fitted with monoexponentials at high Cle and with biexponentials at low Cle. Only the kinetics of major weight (≈ 60 – 70%) are represented. Deactivations kinetics (circles and squares) were fitted by biexponentials. Each point represents the mean \pm S.E. ($n = 3$ – 7). **D**, Cle does not significantly alter single-channel mean open times. The pipette solution contained 140 mM Cs_2SO_4 , 2 mM MgCl_2 , 4.2 mM CaCl_2 , 5 mM EGTA, 10 mM Hepes-Tris (pH 7.2), and 1 mM MgATP. Representative single-channel traces with bath containing either 50 mM CaCl_2 , 0.5 mM LaCl_3 , and 10 mM MES-Tris (pH 6) (left panel, 101.5 mM Cle) or 50 mM CaCO_3 , 0.5 mM LaCl_3 , and 10 mM MES (adjusted to pH 6 with MES) (right panel, 0 mM Cle) are shown.

Extracellular Permeant Anions Participate in Channel Gating by Counteracting the Effect of Nucleotides and Directly Sensing the Voltage—In addition to the effect of intracellular nucleotides, we also show that external permeant anions can alter the gating of the fast anion channel. Similar results have already been reported for the fast anion channel in *V. faba* guard cells (15, 26, 27). In this case, extracellular malate was shown to be especially efficient in modifying the gating (15, 16). However, in our study, we consider for the first time the inter-

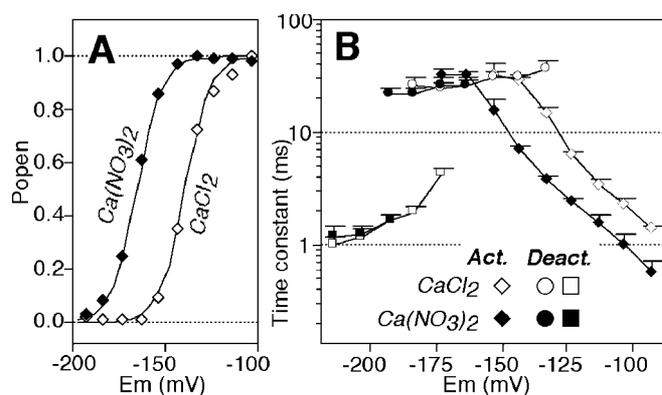


FIG. 8. External nitrate shifts the gating of the rapid anion channel toward more negative voltage. Pipette solution was the same as that described in Fig. 1A and contained 10 mM ATPi. Chloride bath contained 50 mM CaCl_2 , 0.5 mM LaCl_3 , and 10 mM MES/Tris (pH 6), adjusted to 450 mosmol; nitrate bath contained 50 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.5 mM $\text{La}(\text{NO}_3)_3$, and 10 mM MES-Tris (pH 6), adjusted to 450 mosmol. **A**, representative examples of normalized gating curves obtained with the tail protocol described in Fig. 3A and chloride bath (\diamond) or nitrate bath (\blacklozenge) on the same protoplast. The parameters of the presented fits with Boltzmann curves were: $z_g = -3.7$ and -3.7 and $V_{1/2} = -139$ and -165 mV for chloride bath and nitrate bath, respectively. **B**, nitrate dependence compared with the chloride dependence of the activation (diamonds) and deactivation (circles and squares) kinetics. Each point is the mean \pm S.E. ($n = 4$ – 5).

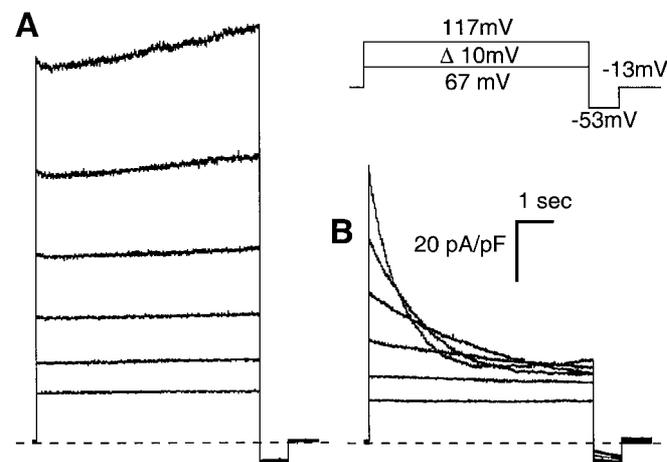


FIG. 9. Extracellular MgATP induces new deactivating kinetics. Pipette is the same as that described in Fig. 1A. Bath is the same as that described in Fig. 1A, but with or without 1 mM MgATP. **A**, current recordings obtained during pulses from -13 mV to positive voltages as indicated. **B**, same pulse protocol on the same protoplast obtained 1 min after the addition of 1 mM MgATP to the bath. The dashed line is zero current.

action between extracellular permeant anions and an intracellular blocking particle. Our data show that external anions are able to reduce the effect of intracellular nucleotides on the fast anion channel. This dose-dependent effect does not saturate at external chloride concentrations as high as 100 mM, suggesting a low affinity mechanism associated with ion permeation in the channel. This is supported by the observation that replacing chloride with a more permeant anion, nitrate, also reduces the effect of intracellular nucleotides. Because the interaction between external permeant anions and internal nucleotides can only take place inside the channel pore, this result provides further argument in favor of our hypothesis that nucleotides gate the fast anion channel by blocking the pore in a voltage-dependent manner. Furthermore, kinetic analysis of the effect of external chloride shows that increasing external chloride or replacing chloride with nitrate, a more permeant anion, accelerates fast anion channel activation while only slightly modi-

fyng the rate of closure. According to our hypothesis, channel activation reflects the expulsion of ATP from the channel pore. This result shows that rather than competing with ATP for a common or overlapping binding site within the pore, permeant external anions are able to trigger channel relief from block by kicking the nucleotide out from the pore. In this view, a more permeant anion, such as nitrate, is more efficient in triggering the expulsion of a nucleotide molecule from the channel pore.

The analysis of the effect of external permeant anions also reveals a role for permeant anions in voltage sensing. Indeed, a reduction of the external permeant anion concentration results in a decrease of the gating charge of the current. Most of the variation of the gating charge occurs when the chloride concentration is raised from 0 to 10 mM, suggesting that this effect involves a high affinity mechanism distinct from the nucleotide expulsion described above. The effect of chloride on the gating charge suggests that the charge carried by the permeating anions contributes to the sensing of membrane voltage by the fast anion channel. This is in agreement with the results obtained by Dietrich and Hedrich (27) on the fast anion channel from *V. faba* guard cells. It is also reminiscent of the gating of the torpedo voltage-dependent chloride channel CLC-0. For CLC-0, channel activation is strongly facilitated by external chloride, and Pusch *et al.* (28) have suggested that voltage-dependent gating is conferred by the permeating charge itself, acting as the gating charge. Additional studies on the role of Cl⁻ ions in the fast voltage-dependent gating of CLC-0 confirmed that Cl⁻ movement within the channel is the major source of voltage dependence, whereas charge movement intrinsic to the channel protein contributes little to this process (29).

Physiological Relevance of Nucleotide and Extracellular Anion Regulations—The various regulations of its gating likely enable the fast anion channel to sense important cellular parameters such as the concentrations of internal nucleotides and external anions. The regulation of the channel by intracellular nucleotides could couple the metabolic status of the cell and its membrane excitability (22). A similar role has been demonstrated in the case of K-ATP channels from pancreatic β cells (30). In this case, an increase in the metabolic energy charge increases the inhibition of the channel by ATP (30). This allows membrane depolarization that favors insulin secretion. In the case of the fast anion channel, the regulation by ATP could represent a means to generate a depolarization signal in response to a decrease in the metabolic charge of the cell under stress conditions, such as hypoxia, for example (31). The regulation by extracellular permeant anions would then act as a feed forward regulatory loop to amplify and maintain a depolarization sufficient to trigger downstream signaling events, as already suggested for the fast anion channel in *V. faba* guard cells (15, 16, 26).

In conclusion, our results showing that intracellular nucleotides affect the voltage dependence of the fast anion channel and that the gating charge correlates with the valence of the nucleotide led us to propose that the voltage-dependent closure

of the channel at hyperpolarized membrane potentials results from voltage-dependent occlusion of the channel pore by intracellular nucleotides. From our data, we also suggested that permeant anions such as chloride or nitrate can chase the nucleotide from the channel pore by a repulsion mechanism, thus favoring channel relief from block. In addition, voltage sensing by permeant anions going through the pore could also contribute to the activation process. To our knowledge, this study represents the first evidence that plant anion channels can be gated by a voltage-dependent block mechanism and also represents the first demonstration that nucleotides, at physiological concentrations, can gate a channel through a simple biophysical mechanism.

Acknowledgments—We thank Jacques Neyton for initial discussion. We gratefully acknowledge the skillful technical assistance of Françoise Lelièvre.

REFERENCES

- Catterall, W. A. (1995) *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 493–531
- Papazian, D. M., Timpe, L. C., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (1991) *Nature* **349**, 305–310
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., and Prochiantz, A. (1984) *Nature* **307**, 462–465
- Mayer, M. L., Westbrook, G. L., and Guthrie, P. B. (1984) *Nature* **309**, 261–263
- Matsuda, H., Saigusa, A., and Irisawa, H. (1987) *Nature* **325**, 156–159
- Barbier-Brygoo, H., Vinauger, M., Colcombet, J., Ephritikhine, G., Frachisse, J.-M., and Maurel, C. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1465**, 199–218
- Pei, Z.-M., Kuchitsu, K., Ward, J. M., Schwarz, M., and Schroeder, J. I. (1997) *Plant Cell* **9**, 409–423
- Pei, Z.-M., Ghassemian, M., Kwak, C. M., McCourt, P., and Schroeder, J. I. (1998) *Science* **282**, 287–290
- Schroeder, J. I., Schmidt, C., and Scheaffer, J. (1993) *Plant Cell* **5**, 1831–1841
- Schwarz, M., and Schroeder, J. I. (1998) *FEBS Lett.* **428**, 177–182
- Nürnberg, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W. R., Hahlbrock, K., and Scheel, D. (1994) *Cell* **78**, 449–460
- Pugin, A., Frachisse, J.-M., Tavernier, E., Bligny, R., Gout, E., Douce, R., and Guern, J. (1997) *Plant Cell* **9**, 2077–2091
- Cazalé, A.-C., Rouet-Mayer, M.-A., Barbier-Brygoo, H., Mathieu, Y., and Laurière, C. (1998) *Plant Physiol.* **116**, 659–669
- Zimmermann, S., Frachisse, J.-M., Thomine, S., Barbier-Brygoo, H., and Guern, J. (1998) *Plant Physiol. Biochem.* **36**, 665–674
- Hedrich, R., and Marten, I. (1993) *EMBO J.* **12**, 897–901
- Hedrich, R., Marten, I., Lohse, G., Dietrich, P., Winter, H., Lohaus, G., and Heldt, H.-W. (1994) *Plant J.* **6**, 741–748
- Marten, I., Lohse, G., and Hedrich, R. (1991) *Nature* **353**, 758–762
- Schulz-Lessdorf, B., Lohse, G., and Hedrich, R. (1996) *Plant J.* **10**, 993–1004
- Zimmermann, S., Thomine, S., Guern, J., and Barbier-Brygoo, H. (1994) *Plant J.* **6**, 707–716
- Frachisse, J. M., Colcombet, J., Guern, J., and Barbier-Brygoo, H. (2000) *Plant J.* **21**, 361–371
- Thomine, S., Zimmermann, S., Guern, J., and Barbier-Brygoo, H. (1995) *Plant Cell* **7**, 2091–2100
- Thomine, S., Guern, J., and Barbier-Brygoo, H. (1997) *J. Membr. Biol.* **159**, 71–82
- Frachisse, J. M., Thomine, S., Colcombet, J., Guern, J., and Barbier-Brygoo, H. (1999) *Plant Physiol.* **121**, 253–261
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F. J. (1981) *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **391**, 85–100
- Pecoraro, V. L., Hermes, J. D., and Cleland, W. W. (1984) *Biochemistry* **23**, 5262–5271
- Lohse, G., and Hedrich, R. (1995) *Planta (Berl.)* **197**, 546–552
- Dietrich, P., and Hedrich, R. (1998) *Plant J.* **15**, 479–487
- Pusch, M., Ludewig, U., Rehfeldt, A., and Jentsch, T. J. (1995) *Nature* **373**, 527–531
- Chen, T.-Y., and Miller, C. (1996) *J. Gen. Physiol.* **108**, 237–250
- Ashcroft, F. M. (1988) *Annu. Rev. Neurosci.* **11**, 97–118
- Saint-Ges, V., Roby, C., Bligny, R., Pradet, A., and Douce, R. (1991) *Eur. J. Biochem.* **200**, 477–482

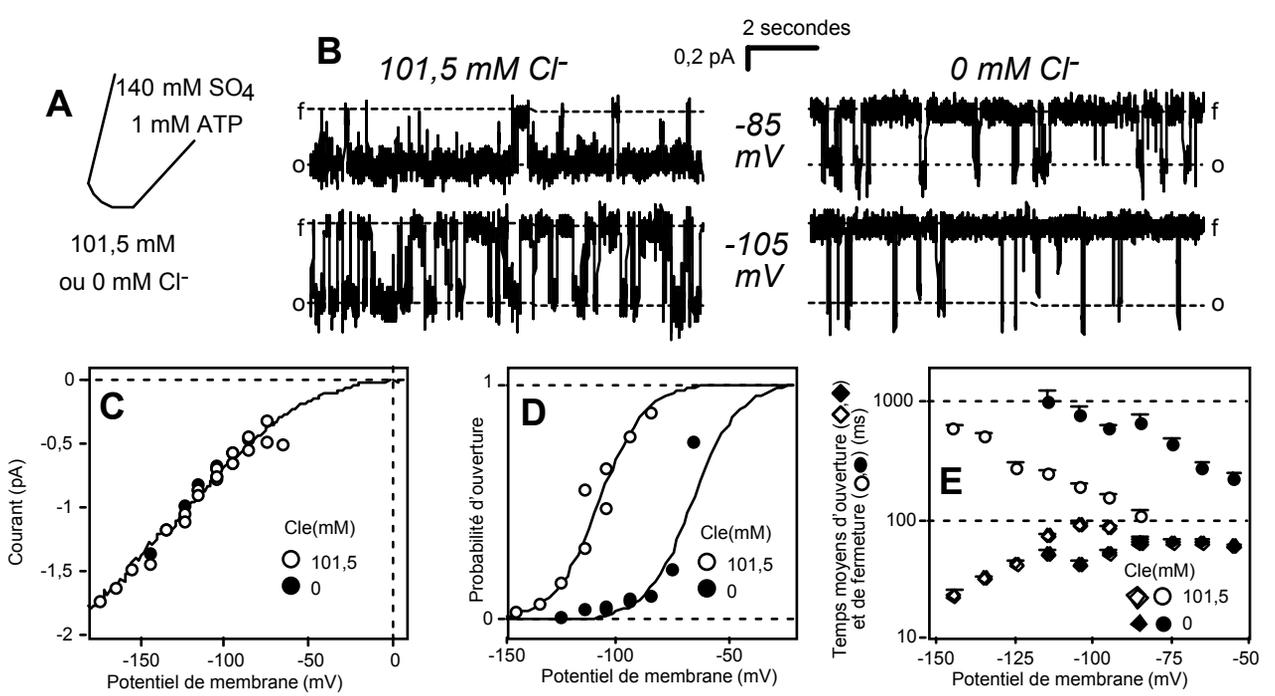


Figure II-2: Analyse en canal unitaire de l'effet du chlorure externe sur la régulation par le voltage du canal rapide. (A) Solution de pipette: 140 mM Cs₂SO₄, 2 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 4,2 mM CaCl₂, 1 mM MgATP, 10 mM Hepes/Tris (pH 7,2). Bain avec Chlorure: 50 mM CaCl₂, 0,5 mM LaCl₃, 10 mM Mes/Tris (pH 6). Bain sans Chlorure: 50 mM CaOH₂, 0,5 mM LaOH₃, Mes (pH 6). Pour toutes les solutions: 450 mOsm ajustés avec du mannitol. (B) Exemples d'enregistrement avec et sans chlorure externe à -85 et -105 mV. (C) Intensité de courant unitaire avec et sans chlorure. La courbe correspond à un enregistrement en configuration cellule entière dans les mêmes conditions (sans MgATP), ajustée de façon empirique. (D) Probabilité d'ouverture en fonction du voltage avec et sans chlorure dans le bain. Les courbes Boltzmann ont respectivement des V_{1/2} de -108 et -66 mV et des z_g de -2,5. (E) Temps moyens (±SE) d'ouverture et de fermeture avec et sans chlorure externe.

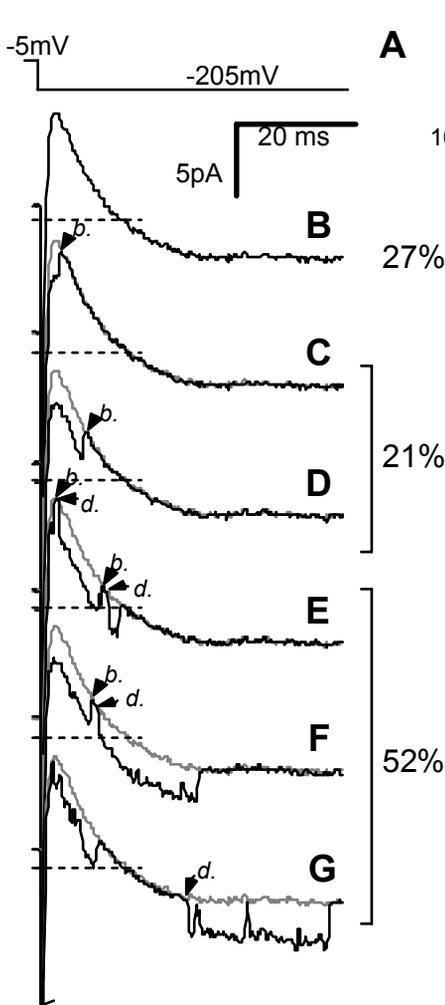


Figure II-3: Analyse en canal unitaire. Comportement du canal rapide lors d'un saut hyperpolarisant de potentiel. (A) Protocole de voltage et conditions ioniques. La membrane, clampée à -5 mV, subit des pulses de voltage de 50 ms à -205 mV. Solution de pipette: 140 mM Cs₂SO₄, 2 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 4,2 mM CaCl₂, 1 mM MgATP, 10 mM Hepes/Tris (pH 7,2). Bain: 50 mM CaCl₂, 0,5 mM LaCl₃, 10 mM Mes/Tris (pH 6). Pour les 2 solutions: 450 mOsm ajustés avec du mannitol. (B à G) Exemples d'enregistrements obtenus. La fermeture peut être extrêmement rapide (B) ou plus lente (C et D). Dans une majorité des cas (n=200), l'enregistrement présente des événements de réouverture (E à G). Dans notre hypothèse, il s'agit de bouchage (b) et de débouchage (d) du pore par les nucléotides.

b- Une étude en canal unitaire confirme plusieurs points de notre hypothèse et apporte de nouveaux éléments

La densité de canaux sur la membrane représente une difficulté majeure à la démonstration de notre hypothèse, car il est impossible d'obtenir en configuration excisée "outside-out" un nombre réduit de canaux. Nous évaluons à une cinquantaine le nombre de canaux présent sur un patch excisé en condition de sulfate interne, qui est la seule condition dans laquelle on peut imaginer une étude de canaux unitaires de façon routinière. La gamme de voltage aisément utilisable est alors limitée aux potentiels les plus négatifs pour lesquels les canaux sont majoritairement fermés et les évènements d'ouverture clairement séparés.

Pourtant, une fois, un morceau de membrane excisée a porté un unique canal sans d'ailleurs que nous en sachions la raison (figure II-2 et II-3). La question se pose bien sûr de la représentativité de ce canal par rapport à la population étudiée habituellement en configuration cellule-entière. Néanmoins, plusieurs caractéristiques telles la conductance ou la probabilité d'ouverture (et la sensibilité aux anions externes) correspondent à ce qui est décrit dans des patches plus classiques. Il m'a été possible d'explorer des gammes de potentiels que je n'avais jamais atteint, et d'apercevoir au niveau canal unitaire un début de rectification (autour de -50 mV). L'évaluation de la probabilité d'ouverture dans les deux conditions de chlorure externe nous a permis d'observer le déplacement du potentiel de demi-activation vers des potentiels moins négatifs que nous avons observés en configuration cellule entière (figure II-2D, cf. article n°2). A des potentiels vraiment peu négatifs, cette probabilité d'ouverture tend vers 1 ce qui était un point discuté depuis longtemps et qui explique de façon claire que l'on ne puisse pas observer d'évènement d'ouverture/fermeture au potentiels positifs: les canaux sont toujours ouverts. De plus, j'ai pu mesurer les temps moyens relatifs d'ouverture et de fermeture en fonction du voltage et des conditions anioniques externes. Et nous avons vérifié ainsi que la concentration en anion externe affectait plutôt les temps de fermeture c'est à dire dans notre modèle la probabilité d'expulsion du nucléotide (figure II-2E).

Enfin une dernière information a été apportée par ce scellement qui est à mon avis une des plus importantes d'un point de vue biophysique du canal, car elle explique probablement l'observation d'une cinétique de désactivation à deux constantes. Lors d'un protocole de pulse hyperpolarisant c'est à dire lorsque l'on saute d'un voltage de -5 mV, pour lequel le canal est ouvert, à un voltage de -205mV, on observe la fermeture au niveau unitaire du canal au bout de quelques millisecondes (figure II-3). Parfois cette fermeture est si rapide qu'elle disparaît dans le courant capacitif (évènement B). Ce qui m'a étonné alors est que dans une majorité des cas (52% des évènements de E à G) j'ai observé des évènements de réouverture du canal avant la fin du pulse à -205mV. Ce qui est difficilement explicable car à ce potentiel et à l'équilibre, la probabilité d'ouverture du canal est nulle. La durée moyenne de ces évènements est *a priori* comparable à celle nécessaire à la fermeture après le saut à -205mV. Il faut donc admettre que le canal "se souvient" du saut de potentiel pendant quelque temps. En configuration cellule-entière, la désactivation à un tel voltage est complexe et ajustable par une double exponentielle dont, à la lumière du comportement d'un canal seul, on peut imaginer que la plus rapide provient de la fermeture réelle des canaux et que la plus lente est due à leur réouverture occasionnelle même à des potentiels très négatifs.

D'un point de vue modèle le canal est dans un état fermé instable (F1), avant de passer dans un état fermé stable (F2):



Il est intuitif de penser qu'une déactivation à deux constantes correspond à un canal à deux états ouverts; dans notre cas cette double constante traduit deux états fermés.

c- La fermeture du canal par le voltage est complexe...

Dans l'hypothèse la plus simple, le canal à cinétiques rapides oscille entre un état ouvert, perméant, et un état "bouché", c'est à dire avec le pore obstrué par une molécule de nucléotide (voir modèle dans l'annexe C).

En fait, le canal présente une fermeture dépendante du voltage plus complexe dont l'obstruction par un nucléotide est un élément majeur, mais qui fait intervenir d'autres éléments de régulation. Nous avons, à la fin de l'article n°2, présenté les résultats expérimentaux correspondant à des biais par rapport à notre hypothèse. Parmi ceux ci, les principaux sont les cinétiques d'activation et de déactivation biexponentielles et la diminution de la charge apparente de la fermeture par le voltage avec la diminution des concentrations en chlorures externes. Certains aspects, comme les cinétiques bi-exponentielles, commencent à être mieux appréhendés mais il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle pour la régulation du canal par le voltage qui intègre et explique tous les résultats expérimentaux.

Enfin, un point important que nous avons peu développé dans l'article n°2, est la possible perméation des nucléotides dans le pore du canal anionique rapide. Nous avons vu qu'ils avaient de l'affinité pour le pore que ce soit de la face interne (article n°2) ou de la face externe (article n°2, figure 9). Néanmoins malgré diverses expériences consistant en particulier à utiliser des nucléotides modifiés, par exemple présentant une petite "tête", nous n'avons pas été capable d'aller plus loin dans cette voie. Si les nucléotides sont capables de passer dans le pore, il s'agit d'événements particulièrement rares.

B- Le canal anionique à cinétiques lentes de la membrane plasmique des cellules épidermiques de l'hypocotyle d'*Arabidopsis thaliana*

En condition de nitrate interne et de chlore externe, après le run-down du canal anionique à cinétiques rapides (voir plus haut), le potentiel de réversion du courant est extrêmement positif, souvent supérieur à 70 mV. Les seules conductances capables d'expliquer de tels potentiels d'inversion sont les activités de canaux calciques et celles de canaux anioniques dont la sélectivité est très en faveur du nitrate. L'article suivant relate la caractérisation du canal nitrate à cinétiques lentes des cellules de l'hypocotyle de l'arabette des dames. Il est extrêmement comparable au canal décrit par l'équipe de Julian Schroeder dans les cellules de garde de *Vicia faba* (Schroeder *et al.*, 1992) puis plus tard dans celles d'*Arabidopsis thaliana* (Pei *et al.*, 1997).

1- Premières caractérisations d'un canal anionique à cinétiques lentes des cellules épidermiques

Article n°3: "Characterization of a nitrate-permeable channel able to mediate sustained anion efflux in hypocotyl cells from Arabidopsis thaliana"

Characterization of a nitrate-permeable channel able to mediate sustained anion efflux in hypocotyl cells from *Arabidopsis thaliana*

Jean-Marie Frachisse*, Jean Colcombet, Jean Guern and H el ene Barbier-Brygoo

Institut des Sciences V eg etales, CNRS, UPR 40, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif sur Yvette Cedex, France

Received 20 September 1999; revised 10 January 2000; accepted 12 January 2000.

*For correspondence (fax +33 1 69 82 37 68; e-mail frachisse@isv.cnrs-gif.fr).

Summary

We have characterized a new anionic current in *Arabidopsis* hypocotyl cells. This current, activated by membrane depolarization, has slow activation and deactivation kinetics in the 10 sec range. It presents many distinct properties from the rapid-type anion current already described on the same membrane. The slow-type channel is highly permeable to nitrate with a $P_{\text{NO}_3^-}/P_{\text{Cl}^-}$ close to 20, but totally impermeable to sulphate. Activation of the channel requires cytosolic ATP and the slow current is partially inhibited by staurosporin, suggesting that channel regulation involves protein phosphorylation. The slow anion channel displays a unique pharmacological profile different from that of the rapid channel: the slow channel is inhibited by DIDS (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid) with an IC_{50} of 26 μM . The slow and rapid anion channels are probably dedicated to specific functions: the first is able to mediate sustained anion efflux, while the second is a good candidate to be involved in fast electrical signalling.

Introduction

Plant anion channels are involved in important cellular functions, including nutrient transport, signal transduction and cell turgor regulation (Barbier-Brygoo *et al.*, 1999; Barbier-Brygoo *et al.*, 2000; Tyerman, 1992; Ward *et al.*, 1995). The physiological role of anion channels has been particularly well studied in stomata where their activation is one of the limiting steps in the loss of guard cell turgor leading to stomatal closure (Ward *et al.*, 1995), and in algal cells where they contribute to membrane excitability through the generation of action potentials (Barbier-Brygoo *et al.*, 2000; Hope and Findlay, 1964; Kourie, 1994). With the exception of these two examples, the detailed characterization of anion channels is still far from complete in differentiated plant cells. In guard cells, at least two different types of anion channels are present at the plasma membrane (Keller *et al.*, 1989; Schroeder and Hagiwara, 1989; Schroeder and Keller, 1992): the slow anion channel (S-type) and the rapid anion channel (R-type). A combination of pharmacological and genetic approaches has provided strong evidence that S-type anion channels catalyse the sustained anion efflux leading to stomatal closure in response to abscisic acid (ABA) (Pei *et al.*, 1997; Schroeder *et al.*, 1993; Schwartz *et al.*, 1995).

Recently, we have characterized a voltage-dependent anion channel (Thomine *et al.*, 1995) at the plasma membrane of the hypocotyl epidermal cells of *Arabidopsis thaliana*. This channel, tightly controlled by the transmembrane voltage, is deactivated at resting membrane potentials and activated by depolarization and shows rapid kinetics in the millisecond range, similar to those of the R-type guard cell anion channel. The voltage regulation of this channel is controlled by cytoplasmic nucleotides and does not require nucleotide hydrolysis (Thomine *et al.*, 1997a). This rapid channel is selective for nitrate and sulphate relative to chloride, and sulphate has been shown to exert a regulatory effect on the channel by preventing the run-down of the anion current (Frachisse *et al.*, 1999).

To explore a possible role of anion channels in the regulation of hypocotyl development, Thomine *et al.* (1997b) tested a variety of anion channel blockers on hypocotyl elongation. Some of the blockers were able to counteract the inhibitory effects of auxins on hypocotyl elongation, providing some evidence for the involvement of anion channels in auxin-regulated elongation processes. The pharmacological profiles of the rapid-type voltage-dependent anion channel from hypocotyl cells

(Thomine *et al.*, 1997a) and of the auxin-regulated hypocotyl elongation do not match, making participation of this channel in this response unlikely (Thomine *et al.*, 1997b). A blue-light-stimulated anion channel has also been described in *Arabidopsis* hypocotyl cells (Cho and Spalding, 1996), but its high sensitivity to the anion channel inhibitor nitrophenyl-propylamino-benzoic-acid (NPPB) together with the fact that NPPB was unable to counteract auxin inhibition of hypocotyl growth argue against its involvement in hypocotyl elongation. Therefore, these data suggest that other types of anion channels are involved in the auxin-regulated hypocotyl elongation, and call for a more extensive description of the diversity of anion channels in hypocotyl cells.

Here we describe a new type of anion channel co-residing with the rapid voltage-dependent anion channel formerly described at the plasma membrane of hypocotyl epidermal cells (Frachisse *et al.*, 1999). In terms of kinetics, this new channel resembles the guard cell slow anion channel. Channel properties such as voltage dependence, selectivity, nucleotide regulation and pharmacology were investigated in order to compare this new channel with the rapid-type channel and to obtain indications as to the possible functions of this slow-type channel in hypocotyl cells.

Results

A channel with slow kinetics co-resides with the rapid anion channel at the plasma membrane of Arabidopsis hypocotyl cells

While we were investigating the ionic selectivity of the fast anion channel in *Arabidopsis* hypocotyl cells (Frachisse *et al.*, 1999), we noticed that a significant anionic current component remained after run-down of the R-type current when nitrate was present in the pipette. To characterize this new anionic current, we performed additional experiments using 50 mM NO_3^- as the cytosolic anion. After entering the whole-cell configuration, we imposed a transmembrane potential consisting of a fast ramp and a combination of two long pulses to monitor both the rapid current and the new current which appeared to follow slow kinetics. The ionic current (Figure 1) across the plasma membrane 10 min after the establishment of the whole-cell configuration is composed of a rapidly activating anion current ('Rapid') with a strong voltage dependence observed during the ramp, followed by a steady outward current during holding at 71 mV, and then a slow deactivating inward current ('Slow') is recorded when stepping the voltage to -189 mV. Super-imposition of the currents recorded successively at 10, 13 and 18 min shows the run-down of the rapid anion current while the slow current remains unchanged (Figure 1).

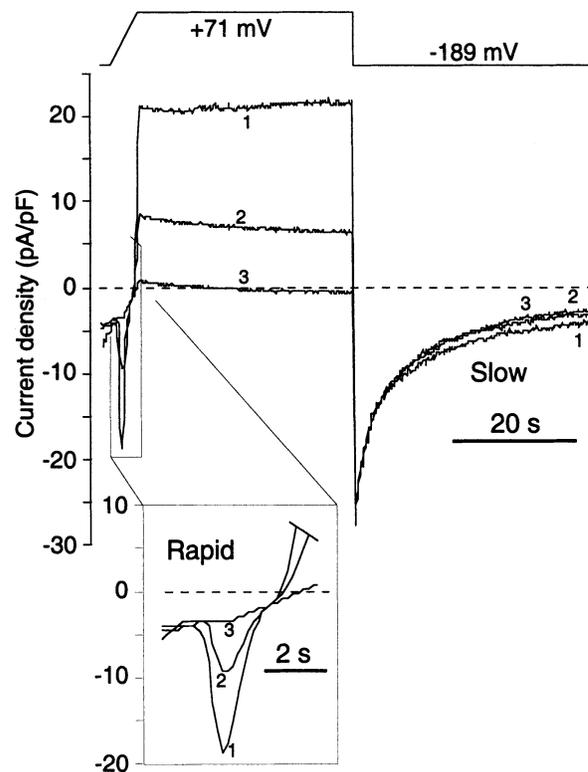


Figure 1. Evolution over time of rapid and slow anion currents of the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* hypocotyl cells, after entering the whole-cell configuration.

A protocol composed of a 5 sec ramp from -189 to 71 mV followed by two step pulses of 36 sec at 71 mV and 40 sec at -189 mV is applied every 90 sec. The ionic current across the plasma membrane 10 min (trace 1) after the establishment of the whole-cell configuration is composed of a rapidly activating anion current ('Rapid') with a strong voltage-dependence observed during the ramp, followed by a stationary outward current during holding at 71 mV, and then a slow deactivating inward current ('Slow') is registered when stepping the voltage to -189 mV. Super-imposition of the currents recorded successively at 10 min (trace 1), 13 min (trace 2) and 18 min (trace 3) shows the run-down of the rapid anion current while the slow current stayed unchanged. The bottom part shows, on an expanded time scale, the rapid current recorded during the ramp. The pipette solution contains 50 mM KNO_3 , 2 mM MgCl_2 , 4.2 mM CaCl_2 , 5 mM EGTA, 5 mM MgATP, 5 mM LiGTP, 10 mM HEPES/Tris pH 7.2, while the bath includes 50 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , 0.5 mM LaCl_3 , 10 mM MES/Tris, pH 5.6.

The voltage-dependent activation of the slow deactivating current was investigated in detail. To exclude any contamination of the slow current by the rapid current, we imposed the pulse protocol shown in Figure 2 after complete run-down of the fast anion current. The membrane potential was held for 20 sec at a potential ranging from -109 to +71 mV and then stepped back for 30 sec at -189 mV. Depolarizing steps (Figure 2a) elicit an inward anion current with higher intensities for negative potentials and nearly zero current observed at +71 mV. The hyperpolarizing step induces a slow deactivating inward anion current, the instantaneous amplitude of which increases with the magnitude of the depolarizing pre-

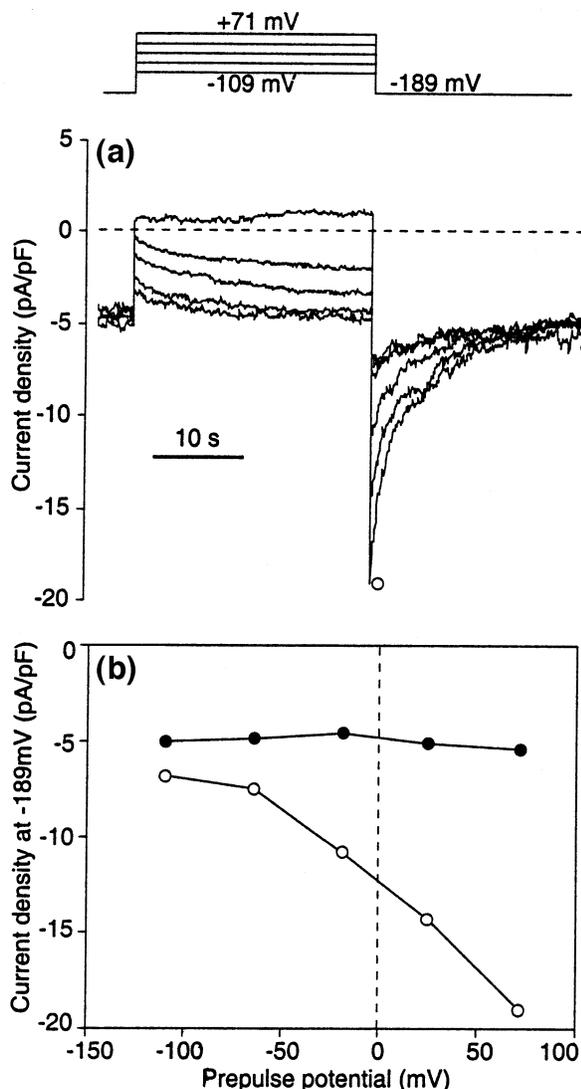


Figure 2. Slow activation of the current in response to depolarizing voltage steps.

The pulse protocol is composed of a 20 sec depolarizing voltage step ranging from -109 to $+71$ mV, followed by a 30 sec hyperpolarization to -189 mV.

(a) Outward currents of increasing intensities are elicited by increasingly depolarized voltage steps. Repolarization of the membrane to -189 mV results in large slow relaxation currents whose instantaneous amplitude increases with the amplitude of the depolarizing pre-pulse.

(b) Plot of the tail current (open circles) and of the current at the end of the -189 mV voltage pulse (closed circles) against the pre-pulse potential. Note that more positive activation pulses result in larger instantaneous negative current, while at the end of relaxation the current amplitude is independent of the voltage pulse. Pipette and bath compositions are the same as in Figure 1.

pulse. The instantaneous amplitude at the beginning of the hyperpolarizing step (tail current amplitude) reflects the activation status of the slow current at the end of the preceding depolarizing step. The plot of tail current amplitudes against the pre-pulse potentials (Figure 2b, open circles) shows the voltage-dependent activation of the slow channel by depolarization. At the end of the

-189 mV voltage pulse (Figure 2b, filled circles), the slow current is completely deactivated.

The activation kinetics of the slow current were investigated by performing the pulse protocol shown in Figure 3. This protocol allowed monitoring of the time dependence of the activation during the depolarizing step by progressively increasing (by increments of 5.6 sec) the duration of this step before stepping back to hyperpolarized potentials. Here again, the amplitude of the tail current magnifies the activation status of the slow current at the end of the preceding depolarizing step. Figure 3 shows, on the same protoplast, the slow deactivating current induced in these conditions for three different membrane potentials. The more depolarized potentials led to a higher activation of the slow channel, illustrated by a higher amplitude of the tail current at $+71$ mV than at -89 mV. The magnitude of the tail current, as a function of the duration of the activation pre-pulse, reflects the time-dependent activation of the slow anion current upon depolarization. This activation kinetics could be fitted by a mono-exponential equation giving time constants for activation (in sec) of 12 ± 1 ($n=3$), 23 ± 11 ($n=4$) and 18 ± 6 ($n=3$) for the activation potentials at $+71$, -9 and -89 mV, respectively. These activation time constants in the 10 sec range are close to those described by Schroeder and Keller (1992) for guard cells of *Vicia faba*.

To study the current-voltage relationship of the slow current, we performed a pulse protocol in which the membrane potential was clamped at $+71$ mV during 36 sec for channel activation and then stepped back to potentials varying from -189 to $+91$ mV by increments of 70 mV. The deactivation kinetics of the slow current at different membrane potentials (Figure 4a) were fitted by a mono-exponential equation, giving (in sec) values of 5.9 ± 1.5 ($n=34$), 7.2 ± 2.1 ($n=33$), 7.3 ± 3.2 ($n=34$) and 5.2 ± 1.3 ($n=4$) for membrane potentials of -189 , -119 , -49 and $+21$ mV, respectively, showing no significant voltage dependence of these time constants. The instantaneous and steady-state currents were plotted as a function of the imposed membrane potential (Figure 4b). The average maximal amplitude of the steady-state slow current was 12.1 ± 1.2 pA/pF ($n=70$).

The slow current is carried by anions

To determine the ion selectivity of the slow current, we studied the current-voltage (I - V) relationship of the steady-state slow current for different nitrate concentrations in the bath, after the complete run-down of the rapid anion channel. In all experiments, the anion loaded into the cytosol of hypocotyl protoplasts was NO_3^- at a concentration of 50 mM. While decreasing the external NO_3^- concentration from 111.5 mM to 12.5 mM and to 2.6 mM while keeping Ca^{2+} and Mg^{2+} constant (Figure 5a), the mean

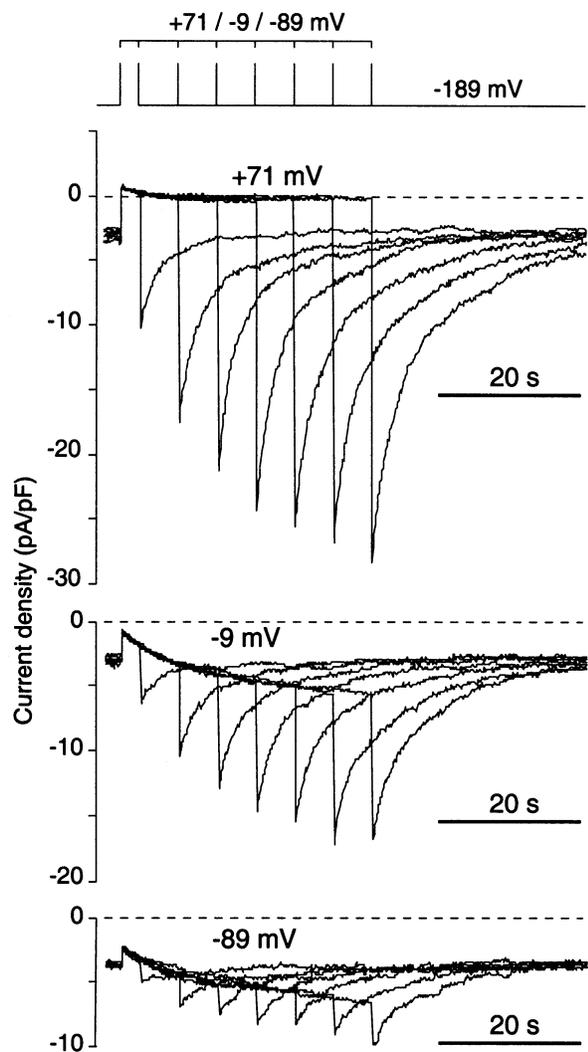


Figure 3. Activation kinetics of the slow current.

The membrane potential is stepped from a holding potential of -189 mV to a depolarized membrane voltage of $+71$ mV for seven progressively increased durations (2.8–36.5 sec); for a second and a third set of measurements the depolarizing voltage is -9 and -89 mV, successively. The instantaneous tail current is dependent on the number of activated slow anion channels, therefore the activation is higher for the highest depolarizing potential and the activation kinetics fit a mono-exponential function. Pipette and bath compositions are the same as in Figure 1.

reversal potential shifted from -14.2 ± 4.6 to 41.0 ± 7.8 and 76.3 ± 18.0 mV, respectively ($n=3$). The measured reversal potential corresponded to the theoretical Nernst potential E_{NO_3} (Figure 5a, inset) indicating that the slow anion current is carried by nitrate. To exclude any contribution of a calcium component to the inward current due to the 50 mM CaCl_2 in the bath, we switched the bath solution from 50 mM Ca^{2+} to 95 mM TEA^+ plus 5 mM La^{3+} , a large-spectrum calcium-channel blocker. Figure 5(b) shows that the I - V steady-state curve obtained in the standard CaCl_2 bath medium does not significantly differ from the I - V curve recorded 5 min after perfusion with the TEACl bath.

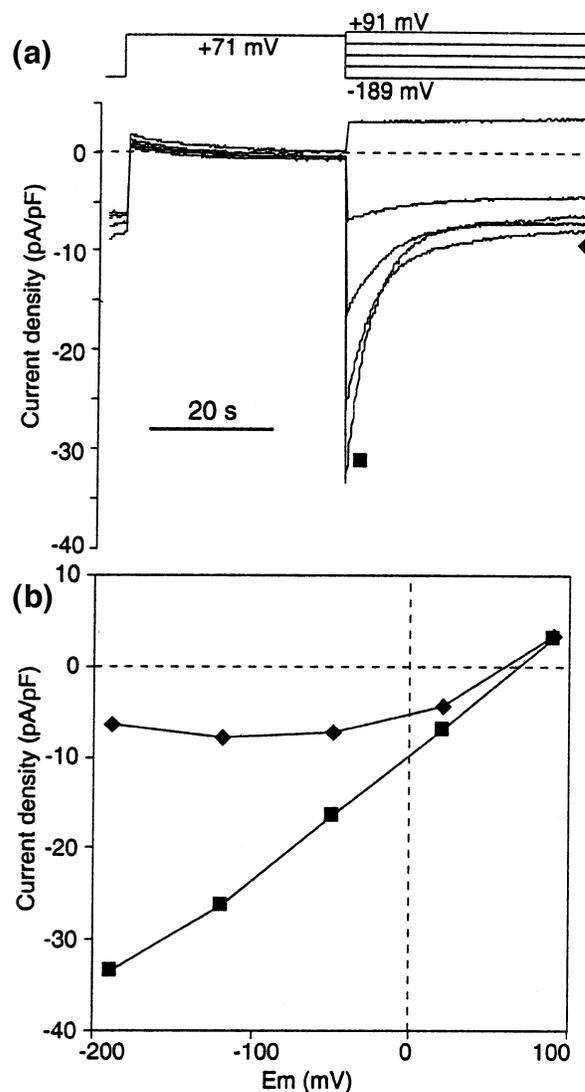


Figure 4. Steady-state and instantaneous current-voltage relationships of the slow channel current.

The membrane potential was polarized from $+71$ mV to potentials ranging from -189 to $+91$ mV. (a) During the holding potential of $+71$ mV the channels activate, and the subsequent polarization step results in large tail currents for the more hyperpolarized potentials followed by a slow relaxation traducing channel deactivation. (b) Current-voltage relationship of the slow channel current. The plot of the current amplitude at the end of the voltage pulse (\blacklozenge) against the transmembrane potential shows the voltage dependence of the slow anion channel in steady-state conditions, while plotting the tail current amplitudes (\blacksquare) against the transmembrane voltage shows the current driven by the electrochemical gradient allowed to flow through the open channel. Pipette and bath compositions are the same as in Figure 1.

Reversal potentials measured on the same protoplasts were 77.8 ± 4.4 ($n=3$) and 83.7 ± 7.6 mV ($n=3$) for the calcium chloride and the TEA chloride baths, respectively. Figure 5(c) shows the shift of the reversal potential from 80.0 ± 6.6 ($n=3$) to -14.9 ± 1.5 mV ($n=3$) when external chloride was replaced by nitrate. The shift of the reversal potential by external NO_3^- and its value close to the

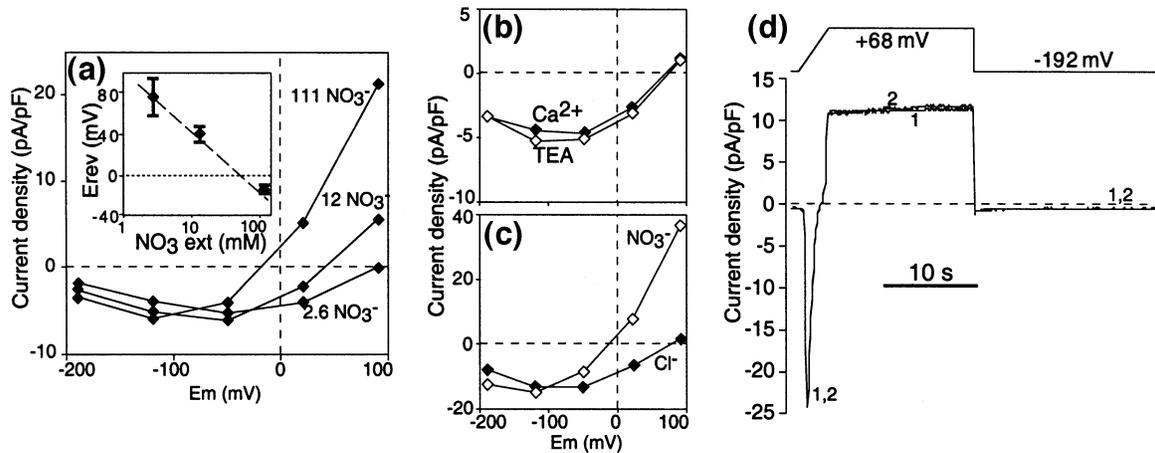


Figure 5. Nitrate and sulphate permeability of the slow anion channel.

(a) Dependence of the slow anion current on the external nitrate concentration. The pipette solution with 50 mM KNO_3 is same as in Figure 1. Bath solutions containing 50 mM Ca^{2+} , 5 mM Mg^{2+} and 111.5 or 12.5 or 2.6 mM NO_3^- and kept at pH 5.6 with MES are applied successively to the same protoplast. The inset shows the mean reversal potential (\pm SE) of the current as a function of external NO_3^- concentration ($n=3$), and the dotted line represents the theoretical Nernst potential $E_{\text{NO}_3^-}$.

(b) Calcium does not permeate through the slow anion channel, as when exchanging the standard bath (\blacklozenge : 50 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2) for a free calcium bath (\blacklozenge : 95 mM TEACl, 5 mM LaCl_3), reversal potential and current amplitude were unchanged. Pipette solution is the same as in Figure 1.

(c) The current-voltage relationship with 50 mM KNO_3 in the cytosol and 50 mM CaCl_2 and 5 mM MgCl_2 in the bath (\blacklozenge) is compared with the current-voltage relationship obtained on the same protoplast after exchanging the bath with 50 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and 5 mM MgCl_2 (\blacklozenge). The shift in reversal potential from 80 ± 7 to -15 ± 2 mV ($n=3$) demonstrates a high nitrate selectivity relative to chloride; the large outward nitrate current obtained with the nitrate bath shows the large nitrate permeability of the channel. Pipette solution is the same as in Figure 1.

(d) Sulphate does not permeate through the slow anion channel. Using a similar voltage protocol as in Figure 1, only the rapid anion current is elicited by the voltage ramp with 25 mM K_2SO_4 instead of 50 mM KNO_3 in the pipette (other ions same composition as Figure 1), while the slow deactivating inward current is not observed when stepping the voltage from +71 to -189 mV. The two current traces super-imposed in the figure were been recorded 32 (trace 1) and 40 min (trace 2) after establishing the whole-cell configuration.

calculated $E_{\text{NO}_3^-}$ of -18 mV, correlate with a high permeability for nitrate. We calculated the relative selectivity of the anion channel from the reversal potential measured with 50 mM NO_3^- in the cytosol and 110 mM Cl^- in the bath using an equation derived from the Goldman-Hodgkin-Katz current equation (see Eqn 1 in Experimental procedures). The permeability ratio obtained, $P_{\text{NO}_3^-}/P_{\text{Cl}^-} = 23.2 \pm 1.3$ ($n=69$), indicates a large selectivity for nitrate relative to chloride. We recently showed that sulphate permeates through the rapid anion channel (Frachisse *et al.*, 1999). To test whether sulphate also permeates through the slow channel, the protoplasts were loaded with 25 mM potassium sulphate. In these conditions, for which rapid anion channel does not undergo run-down (Frachisse *et al.*, 1999), we performed the same ramp-pulse protocol as in Figure 1, designed to monitor both rapid and slow currents. Figure 5(d) shows, 32 and 40 min after establishing the whole-cell configuration, that the ramp elicits a rapid voltage-dependent current, indicating that sulphate permeates the rapid channel, while stepping the membrane potential from 71 to -189 mV does not elicit the slow relaxation typical for the slow current (compare the 10 min trace in Figure 1 with the 32 min trace in Figure 5d). This result indicates that, in contrast to the fast anion channel, the slow anion channel is not permeable to sulphate.

Nucleotide dependence of the slow anion channel

Different modes of regulation of anion channels by nucleotides have been proposed: a putative nucleotide binding site for the rapid-type anion channels of *Arabidopsis* hypocotyl epidermal cells (Thomine *et al.*, 1997a) and *Vicia faba* guard cells (Schulz-Lessdorf *et al.*, 1996), or protein phosphorylation/dephosphorylation for the slow-type channel of *Vicia faba* and *Arabidopsis* guard cells (Pei *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 1995). To gain further insight into the regulation of the slow anion channel from hypocotyl cells, different nucleotides have been loaded in the cytosol. To determine whether nucleotides are required to observe the slow anion current, ATP and GTP were omitted from the pipette solution. In such conditions, the instantaneous and steady-state slow currents are almost completely abolished within 10–20 min after establishing the whole-cell configuration (Figure 6a). This shows that nucleotides are necessary to maintain the slow anion current.

Figure 6(b) shows the whole-cell current density measured either at the tail at -189 mV (dashed bars) or at the steady-state maximum current (filled bars). Instantaneous currents at -189 mV or steady-state maximum currents follow the same dependence with regard to intracellular nucleotides. In the absence of intracellular nucleotides, the slow anion current is abolished. When the non-hydrolysable

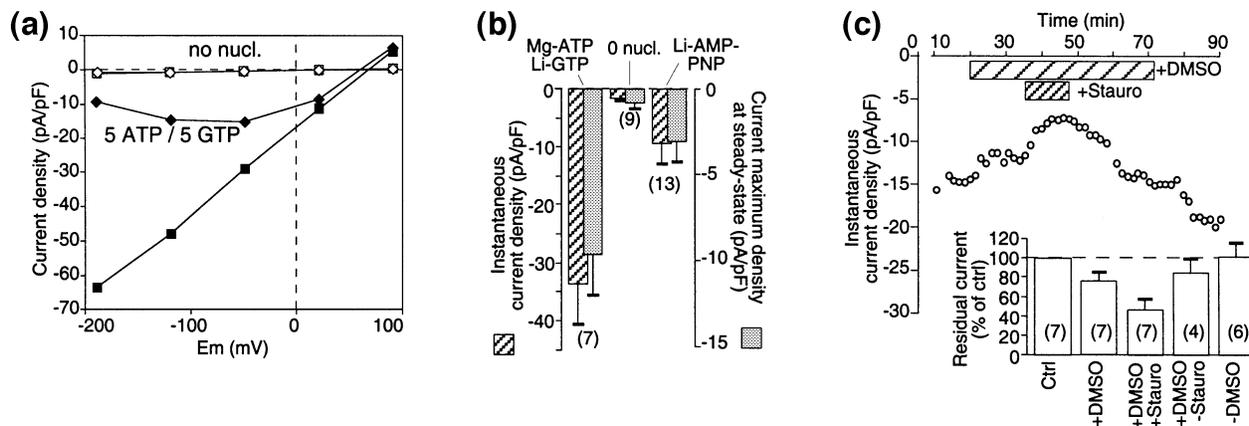


Figure 6. Nucleotide regulation of the slow anion current involves protein phosphorylation.

(a) Current–voltage curves obtained after 20 min of perfusion of the cytosol with standard medium containing 5 mM MgATP + 5 mM LiGTP (closed symbols) or no nucleotide (open symbols) are shown for the instantaneous (squares) and steady-state currents (diamonds).

(b) Mean whole-cell current densities (\pm SE) measured at the beginning of the pulse at -189 mV for the instantaneous current (dashed bar) or at the maximum of the steady-state current (grey bar) as a function of the intracellular nucleotides: (from left to right) 5 mM MgATP + 5 mM LiGTP, 0 mM nucleotide, 5 mM LiAMP-PNP. Numbers in brackets refer to the number of protoplasts.

(c) Effect of the membrane-permeable kinase inhibitor staurosporin on the slow anion current with pipette containing 5 mM MgATP. Time course of the instantaneous slow inward current at -189 mV measured every 90 sec. DMSO 0.5% was perfused in the bath from 20 to 73 min, and the kinase inhibitor staurosporin $10 \mu\text{M}$ was applied in the bath from 35 to 47 min. DMSO and staurosporin induced reversible inhibition of the current. The inset represents the residual instantaneous current (as a percentage of the control) measured at different points of the experiment. Pipette and bath compositions are the same as in Figure 1; numbers in brackets represent the number of protoplasts tested.

5-adenylylimidodiphosphate (AMP-PNP) (5 mM) was loaded in the pipette, a significant fraction of the slow anion current was present. This may be indicative of a complex regulation of this current by nucleotides, involving some mechanisms that require hydrolysis and others that do not.

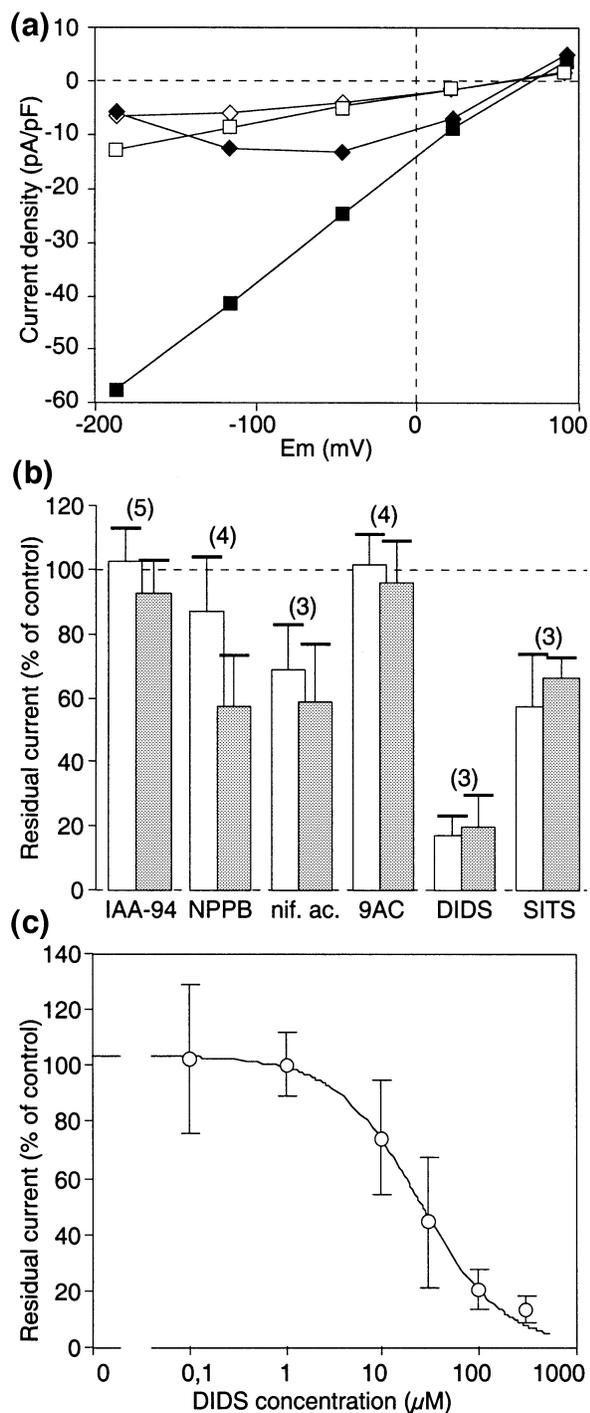
To determine whether the requirement for hydrolysable ATP for activation of the slow anion channel is linked to protein phosphorylation, the effect of the membrane-permeable kinase inhibitor staurosporin on the slow anion current was tested. Hypocotyl protoplasts were perfused with a pipette solution containing 5 mM MgATP. As shown in Figure 6(c), the staurosporin solvent, 0.5% dimethyl sulphoxide (DMSO), itself induces a partial decrease of the current to $76.3 \pm 9.3\%$ ($n=7$) of the control. After getting a steady-state current in the presence of DMSO, $10 \mu\text{M}$ staurosporin added to the bath induces a further decrease of the current to $46.8 \pm 10.8\%$ ($n=7$), corresponding to 39% of inhibition of the DMSO control. Removing staurosporin from the bath restores the current after a 15–30 min lag. The DMSO effect was also reversible since withdrawing this solvent restored the initial current. To confirm this result, the protein kinase inhibitor K252a was also tested at a concentration of $10 \mu\text{M}$. An inhibitory effect similar to that induced by staurosporin was observed (44.6% of inhibition of the DMSO control, $n=4$, data not shown).

Inhibition of the slow anion current by anion channel blockers

To be able to link the function of the slow anion channel identified at the plasma membrane of *Arabidopsis* hypo-

cotyl cells with more integrated physiological responses, we analysed the pharmacological properties of this current. The effects of six anion channel inhibitors – NPPB (nitrophenyl-propylamino-benzoic-acid), 9-AC (anthracene-9-carboxylic acid), DIDS (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid), SITS (4-acetamido-4-isothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid), IAA-94 (indanyl-oxyacetic acid (6,7-dichloro-2-cyclopentyl-2,3-dihydro-2-methyl-1-oxo-1H-indan-5-yl oxy)) and niflumic acid were tested in the whole-cell configuration. After complete run-down of the rapid current, a pulse protocol consisting of 25 sec at $+71$ mV followed by 30 sec at -189 mV was applied each 60 sec. When getting a stable slow deactivating anion current, a pulse protocol similar to that described in Figure 4(a) was applied to record the I – V relationship in control conditions. Then the inhibitor to be tested was added to the perfusion bath at a concentration of $100 \mu\text{M}$ while performing the $+71$ – -189 mV pulse protocol in order to follow the evolution of the current. A second I – V curve was recorded when a stable inhibition of the current was observed after 3–5 min of presence of the inhibitor in the bath solution. Figure 7(a) shows I – V curves for instantaneous and steady-state currents in control conditions and in the presence of DIDS. The extent of inhibition was similar for the tail current and the steady-state maximum current, but varied from one inhibitor to the another (Figure 7b). DIDS was the most potent inhibitor; SITS, niflumic acid and NPPB showed moderate inhibitory effects; and IAA-94 and 9AC were totally inactive. Washing out the different inhibitors resulted in recovery of the slow current, except with DIDS for which the inhibition was irreversible even

after a long washing time of up to 30 min. Figure 7(c) shows the concentration-dependent inhibition of the slow channel by DIDS. From this curve, a DIDS concentration for half inhibition (IC_{50}) of $26 \mu\text{M}$ was deduced.



Discussion

Characteristics of the slow anion channel current of hypocotyl cells

In addition to the previously identified rapid voltage-dependent anion channel at the hypocotyl epidermal cells (Frachisse *et al.*, 1999; Thomine *et al.*, 1995; Thomine *et al.*, 1997a), we have characterized in the present work a second type of channel with slow activation and deactivation kinetics and time constants in the 10 sec range. This channel is activated by voltages positive to -100 mV and deactivated at more negative potentials, and it displays little or no inactivation. In terms of activation-deactivation kinetics and voltage-dependence, the slow anion channel of hypocotyl cells is very close to the S-type anion conductance from *Vicia faba* guard cells (Schroeder and Keller, 1992) and shows similarities with the Gs anion conductance described by Dieudonné *et al.* (1997) in *Coffea arabica* protoplasts. The hypocotyl slow anion channel also resembles the slow anion channel in *Arabidopsis* guard cells (Pei *et al.*, 1997), although the absence of detailed analysis of kinetic parameters for this channel does not allow a close comparison.

We found a high selectivity of the channel for nitrate relative to chloride ($P_{\text{NO}_3^-}/P_{\text{Cl}^-} = 23.2$). High-intensity outward anion current was recorded when external chloride was substituted by nitrate, indicating a good permeation of this anion through the channel. In terms of nitrate selectivity, the hypocotyl slow channel is very similar to the S-type channel of *Vicia faba* guard cells which shows a $P_{\text{NO}_3^-}/P_{\text{Cl}^-}$ of 20.9 (Schmidt and Schroeder, 1994). Unlike nitrate, sulphate does not permeate through the hypocotyl slow channel since no slow deactivating current can be observed when the cytosol is loaded with sulphate. In a recent study (Frachisse *et al.*, 1999), we have shown by capillary ion electrophoresis analysis that aerial parts of *Arabidopsis* plantlets, in our culture conditions, exhibit a high endogenous level of nitrate of about 70 mM and contain 20 mM sulphate. Taking into account the negative

Figure 7. Inhibition of whole-cell slow anion currents by anion channel blockers.

(a) Current-voltage curves before (closed symbols) and after (open symbols) addition of the most potent inhibitor DIDS ($100 \mu\text{M}$) in the bath. $I-V$ curves for instantaneous (squares) and steady-state (diamonds) currents are derived from the same pulse protocol as for Figure 4.

(b) Mean percentage (\pm SE) of residual current measured at the steady-state maximum current (grey bar) and at the tail (instantaneous current at -189 mV , white bar) after inhibition by $100 \mu\text{M}$ of IAA-94, NPPB, niflumic acid, 9-AC, DIDS and SITS. Numbers in brackets refer to the number of protoplasts tested.

(c) Concentration-dependent inhibition of the slow anion current by DIDS. Steady-state; each point results from 3–5 independent measurements. Pipette and bath compositions are the same as in Figure 1.

membrane potential of hypocotyl cells of -150 mV (A. Kurkdjian, personal communication), the channel permeability and endogenous anion concentrations, the opening of the slow channel should lead to a sustained nitrate efflux.

The activity of the slow anion channel is nucleotide-dependent since removing ATP and GTP from the cytosol completely abolished the anion current, while the non-hydrolysable ATP analogue AMP-PNP maintains only a small proportion of the current. Staurosporin, a membrane-permeable non-specific protein kinase inhibitor which is known to block protein phosphorylation efficiently (Ruegg and Burgess, 1989) was able to inhibit about 40% of the slow current. These results indicate that ATP acts at least partly through phosphorylation processes. Hence, the nucleotide regulation shares similarities with S-type anion channel of *Vicia faba* guard cells: phosphorylation activates the current. However, the nucleotide regulation also involves mechanisms that do not require nucleotide hydrolysis. These additional regulatory elements could be ATP allosteric interactions as reported for the CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) Cl^- channels (Foskett, 1998; Hwang *et al.*, 1994), in agreement with the fact that ATP binding cassette modulators affect a guard cell slow anion channel (Leonhardt *et al.*, 1999). Further investigations will be necessary in order to obtain a detailed description of the regulation pathways involving nucleotides and controlling the activity of the hypocotyl slow anion channel.

It is of interest that in *Arabidopsis* hypocotyl cells the slow anion channel is regulated in a different manner than its homologue in guard cells. The presence of intracellular MgATP which activates the channel of hypocotyl cells does not produce slow anion channel current in guard cells (Pei *et al.*, 1997), as channel activation requires addition of the stress hormone ABA. This difference in nucleotide sensitivity probably indicates a differential regulation of related channels between two different organs of the same *Arabidopsis* plant. This idea is reinforced by the observation that in our patch-clamp conditions on hypocotyl cells, i.e. in the presence of intracellular nucleotides, we did not find any effect of ABA on the slow channel activity. In particular, unlike *Vicia faba* guard cells (Schwartz and Schroeder, 1998), ABA treatments did not maintain the activity of the slow channel in ATP-depleted *Arabidopsis* hypocotyl cells (Colcombet *et al.*, unpublished results).

The pharmacological profile of the *Arabidopsis* hypocotyl slow channel differs from that of the S-type channel of broad bean guard cells. In *Vicia faba*, strong inhibition by NPPB, niflumic acid and IAA-94 ($\text{IC}_{50} = 5\text{--}10\ \mu\text{M}$), moderate inhibition by 9-AC ($\text{IC}_{50} = 55\ \mu\text{M}$), and almost no inhibition by DIDS were observed (Schroeder *et al.*, 1993; Schwartz *et al.*, 1995), while in *Arabidopsis* hypocotyl cells the most

efficient blocker is DIDS (80% inhibition at $100\ \mu\text{M}$), with SITS, niflumic acid and NPPB being less active (60% inhibition for $100\ \mu\text{M}$), and 9-AC totally inefficient. This shows that two channels with similar kinetics, voltage-dependence and selectivity can have very different blocker sensitivities, probably reflecting differences in the structure/affinities of the blocker binding sites within the channel pore. Among the blockers tested, stilbene derivatives seem to be the more efficient on the hypocotyl channel. The irreversibility of the inhibitory effect of DIDS is not surprising, since this type of molecule has been synthesized to covalently bind animal Cl^- channel proteins. Indeed, the irreversibility of the inhibition by DIDS has already been described on the chloride channel of torpedo (White and Miller, 1979), further identified as CLC-0 . It is noteworthy that $100\ \mu\text{M}$ DIDS or even a higher concentration ($300\ \mu\text{M}$, not shown) blocks the whole voltage-dependent component of the slow current without shifting the reversal potential, revealing a novel voltage-independent, DIDS-insensitive anion current. A recent study of slow anion currents in intact guard cells of different species (Forestier *et al.*, 1998) has shown that in *Arabidopsis* only 9-AC is able to block the channel. Such a result illustrates that the pharmacological properties of anion channels are both species- and organ-dependent.

Two types of anion channels are active simultaneously in hypocotyl cells

In most studies, one channel-type is associated with one experimental condition. S-type or R-type anion channels have been observed independently but the occurrence of both types in the same cell has been shown only in *Vicia faba* guard cells (Schroeder and Keller, 1992). The present work demonstrates that both slow and rapid anion channels can be recorded under the same ionic conditions in the same cell, and function at the same time as revealed by the ramp-pulse protocol. The question of whether slow and rapid channels in a given cell type represent two functioning modes of the same molecular entity or two different channels has been raised by different authors (Dietrich and Hedrich, 1994; Pei *et al.*, 1997) but is still unanswered. Comparison of the kinetics, nucleotide-dependence and pharmacological properties of the hypocotyl slow and fast anion currents described in this paper supports the hypothesis that they are actually carried by two separate channels.

As already mentioned above, the activation time constant of the slow current is in the 10 sec range while the rapid one is in the millisecond range (Thomine *et al.*, 1995). Activation time constant measurements both for the slow and the rapid anion current give, respectively, $18 \pm 6\ \text{sec}$ ($n=3$) and $4.4 \pm 0.6\ \text{msec}$ ($n=5$) at $-89\ \text{mV}$, showing a difference of three orders of magnitude between the two.

The same holds true for the deactivation constants, with values of 5.9 ± 1.5 sec ($n=34$) and 1.9 ± 0.6 msec ($n=2$) at -189 mV for the slow and rapid channels, respectively. An important point to consider is that the slow mode of the rapid anion current described in the absence of ATP (Thomine *et al.*, 1995) represents a particular functioning mode of this channel and should not be confused with the slow anion current described here. The rapid anion channel in its slow mode is observed in the absence of intracellular nucleotides while in this same situation the slow current is not activated. Nucleotide regulation is a second element which strongly discriminates slow and rapid anion channels. The slow channel is inactive in the absence of nucleotide but is activated by intracellular ATP. In contrast, we have shown earlier that the effect of nucleotides on the rapid channel was to shift the voltage gate towards depolarized potentials which leads to a reduction of the current (Thomine *et al.*, 1997a). Slow and rapid anion channel currents also display marked differences in their selectivity. The selectivity for nitrate relative to chloride is close to 20 for the slow channel. In contrast, it was previously shown to be only 2.6 for the rapid channel (Frachisse *et al.*, 1999). Furthermore, sulphate does not permeate the slow anion channel but is a good substrate for the rapid channel. Another feature to be mentioned is the distinct pharmacological profiles of the two channels: DIDS is the best inhibitor of the slow channel whereas it is inactive on the rapid anion channel (Thomine *et al.*, 1997a). Slow-type and rapid-type guard cell anion channels of *Vicia faba* also show a marked difference in their pharmacological signatures (Marten *et al.*, 1992; Marten *et al.*, 1993; Schroeder *et al.*, 1993; Schroeder, 1995; Schwartz *et al.*, 1995). All these biophysical and pharmacological differences between the slow-type and rapid-type anion currents from the hypocotyl cells suggests strongly that they are carried by distinct channels. However, the only way to answer this question unambiguously will be through cloning of the genes encoding the channel proteins.

Possible physiological functions of the slow anion channel in hypocotyl cells

The role of plant plasma membrane anion channels in a well-defined physiological function has been clearly illustrated only in few cases. The best documented example concerns the requirement of a slow anion channel for the osmo-regulation of stomatal guard cells. Assorted pharmacological evidence obtained in *Vicia faba* either with anion channel blockers (Schroeder *et al.*, 1993; Schwartz *et al.*, 1995) or with kinase and phosphatase inhibitors (Schmidt *et al.*, 1995) shows a good correlation between the ability of these agents to reduce the anion current and to counteract the stomatal closure induced by ABA.

Genetic evidence has also been provided in *Arabidopsis thaliana* by the study of mutants affected in both stomatal responses to ABA and regulation of the slow anion channel (Pei *et al.*, 1997; Pei *et al.*, 1998). The similarity between the slow anion current described in guard cells and the current that we have characterized in this work suggests that they may be involved in similar functions. Thus, the slow anion current could be involved in long-term anion efflux which, when it is associated with potassium efflux, can regulate the osmotic pressure of hypocotyl cells. Its activation by phosphorylation, probably in response to a signal, would then lead to a decrease in osmotic pressure, while maintaining a high osmotic pressure is thought to be a prerequisite for cell expansion. Slow anion channels might thus be involved in the down-regulation of hypocotyl cell elongation.

On the basis of their regulation properties and/or their pharmacology, anion channels have been proposed to participate in the control of cell expansion by light in *Arabidopsis* hypocotyls (Cho and Spalding, 1996) or pea leaves (Elzenga and Van Volkenburgh, 1997), and by auxin in oat coleptiles (Keller and Van Volkenburgh, 1996). To investigate a possible role of anion channels in the regulation of hypocotyl cell elongation in *Arabidopsis thaliana*, Thomine *et al.* (1997b) also used a pharmacological approach. A variety of anion channel blockers were studied for their effect on hypocotyl elongation and its regulation by auxin. Several anion channel blockers such as DIDS, 9-AC and SITS were able to counteract the inhibition of elongation induced by auxin, whereas IAA-94 showed a moderate efficiency, and NPPB and niflumic acid only inhibited hypocotyl elongation (Thomine *et al.*, 1997b). Furthermore, a small stimulating effect on the hypocotyl elongation was observed for 9-AC, DIDS and SITS when applied alone. This pharmacological signature described at the whole-plant level is distinct from the profiles of sensitivity to blockers of the rapid-type anion channel (insensitive to DIDS, Thomine *et al.*, 1997a) and of the blue-light-stimulated anion channel (highly sensitive to NPPB (Cho and Spalding, 1996) formerly described at the plasma membrane of hypocotyl cells. While stilbene derivatives DIDS and SITS are both active on the newly identified slow anion channel and on the hypocotyl elongation, 9-AC is only able to counteract auxin inhibition of hypocotyl elongation but not to block the slow channel. Two interpretations may account for this result: (i) the slow channel is not involved in the hypocotyl developmental response, or (ii) the slow anion channel is involved in the control by auxin of hypocotyl elongation and the discrepancy between the effect of 9-AC at the plant level and at the channel level might reflect an action of this molecule on another target, such as an anion transporter, other channel types or other anion channels located on the vacuolar membrane. In favour of this hypothesis, several

examples of non-specific inhibition of plant ion channels by molecules developed to block animal ion channels have already been described. Garrill *et al.* (1996) have shown that anion channel blockers interact with K⁺-outward rectifiers, and Greger (1990) has emphasized that some Cl⁻ channel inhibitors are also able to interact with anion transporters. This illustrates the difficulty of linking the transport activity of a channel protein monitored in patch-clamp experiments to an integrated phenomenon such as cell elongation. In addition to its specific pharmacology, a remarkable feature of the slow anion channel is its specificity for NO₃⁻ over other anions, which may provide another clue to its physiological function. Under our culture conditions, NO₃⁻ is the major anion stored by the plantlets (Frachisse *et al.*, 1999). This suggests that, besides a general role in osmotic regulation, this channel could play a specific role in maintaining the homeostasis of the cytosolic nitrate concentration.

In conclusion, we have identified for the first time on the hypocotyl plasma membrane a slow anion channel sharing similar kinetic properties with the slow guard cell anion channel. This channel, which is highly permeant for nitrate, co-resides with the rapid anion channel formerly characterized. By mediating sustained anion efflux due to its slow deactivation kinetics, the slow anion channel is proposed to be involved in cell volume regulation. By contrast, with its fast kinetics of activation and deactivation, the rapid channel co-residing on the same cell would be presumed to participate in fast electrical signalling. Characterization of the *in vivo* biological functions of the slow and rapid anion channels in *Arabidopsis* hypocotyls, as well as identification of the genes encoding channel proteins, represent the major directions for further investigations.

Experimental procedures

Plant material and protoplast isolation

Seedlings (*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia) were grown on a medium containing 5 mM KNO₃, 2.5 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 6, 2 mM MgSO₄, 1 mM Ca(NO₃)₂, 1 mM MES, 50 μM Fe-EDTA, Murashige and Skoog micro-elements (Murashige and Skoog, 1962), 10 g l⁻¹ sucrose and 7 g l⁻¹ agar. Culture conditions were 21°C, with a 16 h day length at lighting levels of 120 μE m⁻² sec⁻¹ with neon tubes (a combination of Mazdafluor Blanc Industrie and Mazdafluor Prestiflux). Seedlings aged 7–8 days were used for electrophysiological investigations. Hypocotyls were excised from 30–40 seedlings and protoplasts were isolated according to Elzenga (1991) as described in Thomine *et al.* (1995).

Electrophysiological investigations

Patch-clamp experiments in the whole-cell configuration were performed as described by Hamill *et al.* (1981) using an EPC7 patch-clamp amplifier (List Electronic, Darmstadt, Germany) with a low-pass filter (eight-pole Bessel filter) or an Axon 200A

amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). During measurements, freshly isolated epidermal protoplasts from *Arabidopsis* hypocotyls were maintained in a bathing medium containing 50 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM LaCl₃, 10 mM MES-Tris, pH 5.6. The pipettes were filled with 50 mM CsNO₃, 2 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 4.2 mM CaCl₂, 10 mM Tris/HEPES, pH 7.2, supplemented with 5 mM MgATP and 5 mM Li GTP, or other nucleotides as indicated in the figure legends. The osmolalities of bath and pipette solutions were adjusted to 450 mOsmol with mannitol using a Wescor 5500 vapour pressure osmometer (Wescor, Logan, UT, USA). Giga-ohm resistance seals between pipettes (pipette resistance 1–5 MΩ) coated with Sylgard (General Electric, New York, USA) pulled from Kimax-51 capillaries (Kimble Glass Inc., Owens, IL, USA) and protoplast membranes were obtained, with gentle suction leading to whole-cell configuration. The liquid junction potential was measured according to Neher (1992) and all potentials given have been corrected for the junction potential. Unless otherwise indicated, the figures show values for one representative protoplast, and statistics are given as mean ± SE (*n* indicates the number of protoplasts tested).

Permeability ratios for nitrate relative to chloride were calculated from reversal potential measurements using Eqn 1, derived from the Goldman–Hodgkin–Katz equation (see Hille, 1992).

$$P_{\text{NO}_3}/P_{\text{Cl}} = (\text{Cl}_o e^{(E/FRT)} - \text{Cl}_i)/(\text{NO}_{3i}) \quad (1)$$

where *E* is the reversal potential, *R* is the gas constant, *T* is the absolute temperature and *F* is the Faraday's constant, have their usual meanings and Cl_o, Cl_i and NO_{3i} represent the extracellular and intracellular activities of chloride and the intracellular activity of nitrate, respectively. Activity coefficients were estimated according to Dean (1985).

Acknowledgements

The authors thank Dr Sebastien Thomine for helpful discussion and critical reading of the manuscript. This work was supported by the CNRS grant to UPR 0040.

References

- Barbier-Brygoo, H., Frachisse, J.M., Colcombet, J. and Thomine, S. (1999) Anion channels and hormone signalling in plant cells. *Plant Physiol. Biochem.* **37**, 381–392.
- Barbier-Brygoo, H., Vinauger, M., Colcombet, J., Ephritikhine, G., Frachisse, J.M. and Maurel, C. (2000) Anion channels in higher plants: functional characterisation, molecular structure and physiological role. *Biochim. Biophys. Acta*, **1463**, in press.
- Cho, M.H. and Spalding, E.P. (1996) An anion channel in *Arabidopsis* hypocotyls activated by blue light. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 8134–8138.
- Dean, J.A. (1985) *Lange's Handbook of Chemistry*, 3rd Edn. New York: McGraw-Hill.
- Dietrich, P. and Hedrich, R. (1994) Interconversion of fast and slow gating modes of GCAC1, a guard cell anion channel. *Planta*, **195**, 301–304.
- Dieudonné, S., Forero, M.E. and Llano, I. (1997) Two different conductances contribute to the anionic currents recorded in *Coffea arabica* protoplasts. *J. Membr. Biol.* **159**, 83–94.
- Elzenga, J.T.M. (1991) Patch clamping protoplasts from vascular plants. *Plant Physiol.* **97**, 1573–1575.
- Elzenga, J.T.M. and Van Volkenburgh, E. (1997) Characterization of a light-controlled anion channel in the plasma membrane of mesophyll cells of pea. *Plant Physiol.* **113**, 1419–1426.

- Forestier, C., Bouteau, F., Leonhardt, N. and Vavasseur, A. (1998) Pharmacological properties of slow anion currents in intact guard cells of *Arabidopsis*. Application of the discontinuous single-electrode voltage-clamp to different species. *Pflügers Arch.* **436**, 920–927.
- Foskett, J.K. (1998) CLC and CFTR chloride channel gating. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 689–717.
- Frachisse, J.M., Thomine, S., Colcombet, J., Guern, J. and Barbier-Brygoo, H. (1999) Sulfate is both a substrate and an activator of the voltage-dependent anion channel of *Arabidopsis* hypocotyl cells. *Plant Physiol.* **121**, 253–262.
- Garrill, A., Tyerman, S.D., Findlay, G.P. and Ryan, P.R. (1996) Effects of NPPB and niflumic acid on outward K⁺ and Cl⁻ currents across the plasma membrane of wheat root protoplasts. *Aust. J. Plant Physiol.* **23**, 527–534.
- Greger, R. (1990) Chloride channel blockers. *Methods Enzymol.* **191**, 793–809.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* **391**, 85–100.
- Hille, B. (1992) *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2nd edn. Sunderland, MA: Sinauer Associated.
- Hope, A.B. and Findlay, G.P. (1964) The action potential in *Chara*. *Plant Cell Physiol.* **5**, 377–379.
- Hwang, T.C., Nagel, G., Nairn, A.C. and Gadsby, D.C. (1994) Regulation of the gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl channels by phosphorylation and ATP hydrolysis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 4698–4702.
- Keller, B.U., Hedrich, R. and Raschke, K. (1989) Voltage-dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *Nature*, **341**, 450–453.
- Keller, C.P. and Van Volkenburgh, E. (1996) The electrical response of *Avena* coleoptile cortex to auxins. Evidence in vivo for activation of a Cl⁻ conductance. *Planta*, **198**, 404–412.
- Kourie, J.I. (1994) Transient Cl⁻ and K⁺ currents during action potentials in *Chara inflata*. *Plant Physiol.* **106**, 651–660.
- Leonhardt, N., Vavasseur, A. and Forestier, C. (1999) ATP binding cassette modulators control abscisic acid regulated slow anion channels in guard cells. *Plant Cell*, **11**, 1141–1151.
- Marten, I., Zeilinger, C., Redhead, C., Landry, D.W., Al-Awqati, Q. and Hedrich, R. (1992) Identification of a voltage-dependent anion channel in the plasma membrane of guard cells by high-affinity ligands. *EMBO J.* **11**, 3569–3575.
- Marten, I., Busch, H., Raschke, K. and Hedrich, R. (1993) Modulation and block of the plasma membrane anion channel of guard cells by stilbene derivatives. *Eur. Biophys. J.* **21**, 403–408.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473–497.
- Neher, E. (1992) Correction for liquid junction potentials in patch-clamp experiments. *Meth Enzymol.* **207**, 123–131.
- Pei, Z.M., Kuchitsu, K., Ward, J.M., Schwarz, M. and Schroeder, J.I. (1997) Differential abscisic acid regulation of guard cell anion channels in *Arabidopsis* wild-type and *abi1* and *abi2* mutants. *Plant Cell*, **9**, 409–423.
- Pei, Z.M., Ghassemian, M., Kwak, C.M., McCourt, P. and Schroeder, J.I. (1998) Role of farnesyltransferase in ABA regulation of guard cell anion channels and plant water loss. *Science*, **282**, 287–290.
- Ruegg, U.T. and Burgess, G.M. (1989) Staurosporin, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol. Sci.* **10**, 218–220.
- Schmidt, C. and Schroeder, J.I. (1994) Anion selectivity of slow anion channels in the plasma membrane of guard cells. *Plant Physiol.* **106**, 383–391.
- Schmidt, C., Schelle, I., Liao, Y.J. and Schroeder, J.I. (1995) Strong regulation of slow anion channels and abscisic acid signaling in guard cells by phosphorylation and dephosphorylation events. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 9535–9539.
- Schroeder, J. (1995) Anion channels as central mechanisms for signal transduction in guard cells and putative functions in roots for plant–soil interactions. *Plant Mol. Biol.* **28**, 353–361.
- Schroeder, J.I. and Hagiwara, S. (1989) Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature*, **338**, 427–430.
- Schroeder, J.I. and Keller, B.U. (1992) Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **87**, 5025–5029.
- Schroeder, J.I., Schmidt, C. and Scheaffer, J. (1993) Identification of high-affinity slow anion channel blockers and evidence for stomatal regulation by slow anion channels in guard cells. *Plant Cell*, **5**, 1831–1841.
- Schulz-Lessdorf, B., Lohse, G. and Hedrich, R. (1996) GCAC1 recognizes the pH gradient across the plasma membrane: a pH-sensitive and ATP-dependent anion channel links guard cell membrane potential to acid and energy metabolism. *Plant J.* **10**, 993–1004.
- Schwartz, A., Ilan, N., Schwartz, M., Scheaffer, J., Assmann, S.M. and Schroeder, J.I. (1995) Anion-channel blockers inhibit S-type anion channels and abscisic acid responses in guard cells. *Plant Physiol.* **109**, 651–658.
- Schwartz, M. and Schroeder, J.I. (1998) Abscisic acid maintains S-type anion channel activity in ATP-depleted *Vicia faba* guard cells. *FEBS Lett.* **428**, 177–182.
- Thomine, S., Zimmermann, S., Guern, J. and Barbier-Brygoo, H. (1995) ATP-dependent regulation of an anion channel at the plasma membrane of protoplasts from epidermal cells of *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Cell*, **7**, 2091–2100.
- Thomine, S., Guern, J. and Barbier-Brygoo, H. (1997a) Voltage-dependent anion channel of *Arabidopsis* hypocotyls: nucleotide regulation and pharmacological properties. *J. Membr. Biol.* **159**, 71–82.
- Thomine, S., Lelièvre, F., Boufflet, M., Guern, J. and Barbier-Brygoo, H. (1997b) Anion-channel blockers interfere with auxin responses in dark-grown hypocotyls. *Plant Physiol.* **115**, 533–542.
- Tyerman, S.D. (1992) Anion channels in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 351–373.
- Ward, J.M., Pei, Z.-M. and Schroeder, J.I. (1995) Roles of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants. *Plant Cell*, **7**, 833–844.
- White, M.M. and Miller, C. (1979) A voltage-gated anion channel from the electric organ of *Torpedo californica*. *J. Biol. Chem.* **254**, 10161–10166.

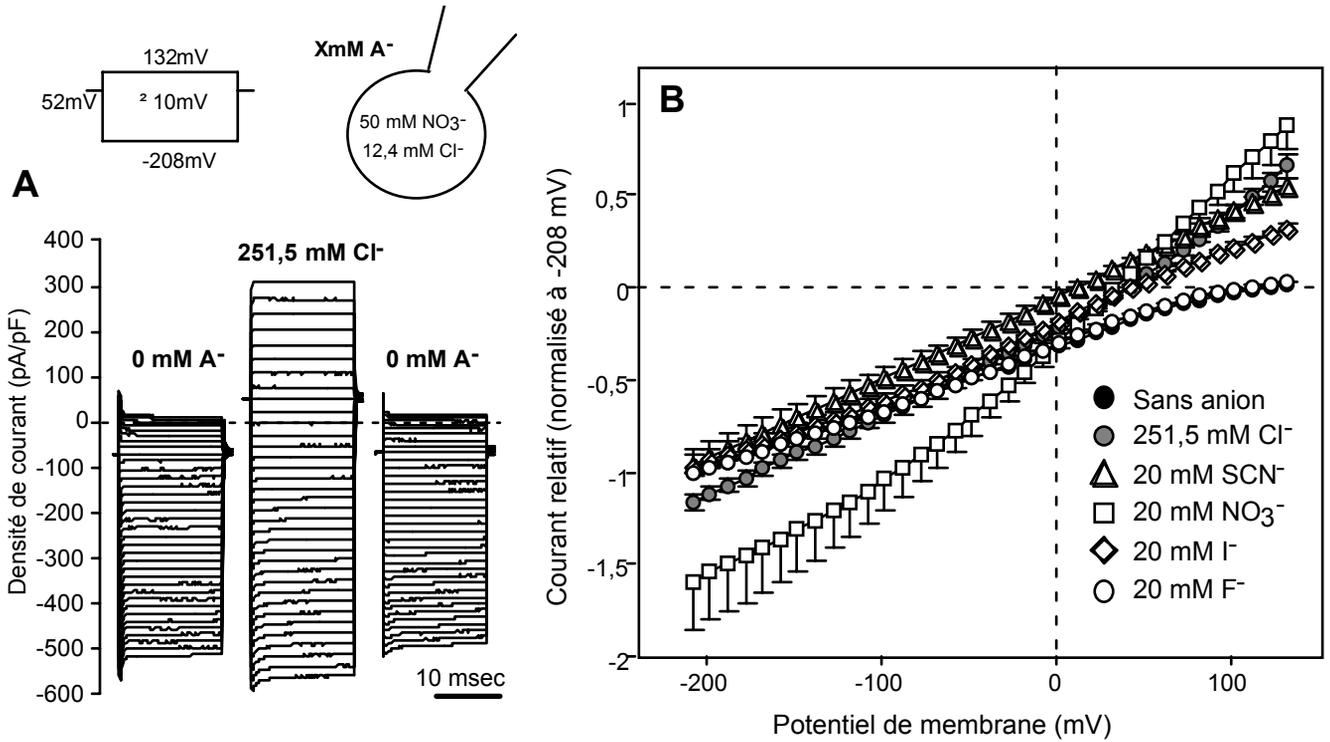


Figure II-4: Evaluation de la sélectivité du canal lent. (A) Conditions et protocole électriques. Solution de pipette: 50 mM CsNO₃, 2 mM MgCl₂, 4,2 mM CaCl₂, 5 mM EGTA, 5 mM MgATP, 5 mM LiGTP, 10 mM Hepes/Tris (pH 7,2). Le scellement est réalisé dans un bain standard (50 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM LaCl₃, 10 mM Mes/Tris (pH)). Bain sans anion: 50 mM CaOH₂, 0,5 mM LaOH₃, Mes (pH 6). Bain fort chlorure: 125 mM CaCl₂, 0,5 mM LaCl₃, 10 mM Mes/Tris (pH 6). Protocole de voltage: série de pulses de 15 ms toutes les 1 seconde balayant les voltages de -208 mV à 132 mV par pas de 10 mV; potentiel de repos: 52 mV (B) Moyenne des courbes IV obtenues avec différents bains. Normalisation par rapport au courant obtenu à -208 mV avant perfusion d'un bain avec anions (moyenne ± SE, n de 2 à 4).

Tableau II-2: Quantification des potentiels de réversion et signification en terme de rapport de perméabilité. nd: non déterminé.

Anion	Concentration	V _{rev} (mV)	n	pA ⁻ /pNO ₃ ⁻	pA ⁻ /pCl ⁻
Cl ⁻	251,2 mM	40,6±0,7	4	0,04 ⁽¹⁾	nd
SCN ⁻	20 mM	10,3±5,3	4	1,68 ⁽²⁾	41,7 ⁽³⁾
NO ₂ ⁻	20 mM	50,8±3,1	4	0,34 ⁽²⁾	8,4 ⁽³⁾
Chlorate ⁻	20 mM	42,8±1,3	4	0,46 ⁽²⁾	11,5 ⁽³⁾
NO ₃ ⁻	20 mM	34,1±1,4	4	0,65 ⁽²⁾	16,3 ⁽³⁾
I ⁻	20 mM	19,8±2,5	3	1,15 ⁽²⁾	28,6 ⁽³⁾
F ⁻	20 mM	107,2±0,8	2	0,04 ⁽²⁾	0,90 ⁽³⁾

$$(1) \quad pCl^- / pNO_3^- = ([Cl^-]_e \cdot \exp(F \cdot V_{rev} / RT) - [Cl^-]_i) / [NO_3^-]_i$$

$$(2) \quad pA^- / pNO_3^- = ([NO_3^-]_i + (pCl^- / pNO_3^- \cdot [Cl^-]_i)) / ([A^-]_e \cdot \exp(F \cdot V_{rev} / RT))$$

$$(3) \quad pA^- / pCl^- = (pA^- / pNO_3^-) \cdot (pNO_3^- / pCl^-)$$

2- Complément sur la sélectivité

Afin de comprendre le rôle du canal anionique lent mais aussi pour mettre au point des cribles de sélection de gènes codant pour ce canal (voir partie suivante), la sélectivité du canal anionique lent a été plus approfondie. Dans l'article n°3, nous avons montré une sélectivité très nette en faveur du nitrate par rapport à l'ion chlorure ($P_{NO_3}/P_{Cl}=23,2$) en accord avec la sélectivité du canal lent des cellules de garde de *Vicia faba* ($P_{NO_3}/P_{Cl}=20,9$, (Schmidt *et al.*, 1994)). Par contre, et ce en opposition au canal de type R, le canal lent n'est absolument pas perméable au sulfate.

Après l'établissement de la configuration cellule-entière et la disparition totale du courant rapide suite au run-down, je me suis placé dans des conditions de voltage très positif (+52 mV) pour lesquelles l'ouverture du canal lent est très forte. Un bain sans anions (voir composition dans la légende de la figure II-4) est perfusé et seuls les scellements donnant des courants dont le potentiel de réversion, dans ces conditions, est au delà de +100 mV c'est à dire très en faveur d'une conductance nitrate lente, sont conservés. Le protocole de la figure II-4A consistant en une série de pulses extrêmement rapides permet d'avoir une idée de la perméation à travers le canal, car il ne permet pas à la population de canaux de se refermer ou de s'ouvrir en réponse au potentiel imposé. Le courant à chaque voltage est donc proportionnel à la fonction de perméation (figure II-4A).

Pour quantifier la sélectivité vis à vis de l'ion chlorure et en raison des premiers résultats qui montrent une faible perméabilité de celui-ci (article n°3), j'ai changé le bain par un bain contenant 251,5 mM Cl^- ce qui correspond à des conditions bi-ioniques extrêmement dissymétriques, idéales pour calculer le rapport de perméabilité. Dans le cas des anions inorganiques testés $-ClO_3^-$, NO_2^- , NO_3^- , I^- , F^- et SCN^- , je me suis contenté d'ajouter 20 mM de sel de potassium dans le bain sans anions (figure II-4B). Les anions organiques testés ont nécessité l'élaboration de solutions de bain particulières et l'ajout de 20 mM équivalent anion -malate, fumarate, citrate-, qui sont les anions observés lors du dosage global par électrophorèse capillaire (article n°1, figure 2). Le rapport de perméation est difficilement calculable en raison du pH du bain, proche des pKa des anions organiques. Néanmoins en présence de ces anions organiques, les courants sortant observés sont de très faibles amplitudes et les potentiels d'inversion très positifs indiquent leur faible perméation dans le pore du canal lent (résultat non montré).

Le tableau II-2 résume les conditions de l'expérience et les potentiels de réversion obtenus dans chacune des conditions ainsi que les rapports de perméabilité calculés. La séquence de perméabilité complétée à partir de celle proposée dans l'article n°3, caractéristique du canal anionique à cinétiques lentes, est donc la suivante:



La perméabilité au nitrate calculé ici est proche de celle avancée dans l'article n°3 ($P_{NO_3}/P_{Cl}=23,2$), validant ainsi ce type d'expérience pour l'étude de la perméabilité. Le thiocyanate s'est révélé être l'anion le plus perméant, ce qui est aussi le cas du canal lent des cellules de garde de *Vicia faba* (Schmidt *et al.*, 1994). Le

chlorate et le nitrite sont eux aussi perméant, quoique moins que le nitrate, ce qui justifie leur utilisation dans des cribles d'expression tels que ceux que j'ai essayé de mettre au point en système hétérologue (voir section suivante). De manière étonnante, le courant aux potentiels très négatifs est affecté lorsque l'on modifie le statut des anions dans le bain. Par exemple la perfusion de 20 mM NO_3^- augmente le courant à -215 mV de $59,4 \pm 26,7\%$ (n=4). Ceci suggère que la perméation dans le canal anionique ne peut pas se "modéliser" avec une loi simple du type Goldman-Hodgking-Katz (Hille, 1992) qui sous entend l'indépendance des flux mais par un système plus compliqué dans lequel les anions internes et externes sont en compétition dans le pore du canal.

C- La régulation par le pH est une nouvelle caractéristique divergente entre canaux de type rapide et de type lent

Article n°4: en préparation

Opposite pH regulation of slow and rapid anion channels at the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* hypocotyl cells

Jean Colcombet, Jean-Marie Frachisse, Françoise Lelièvre, Sébastien Thomine et Hélène Barbier-Brygoo

ABSTRACT

Alkalinization/acidification are known to be important processes in plant cells and are involved in lots of physiological responses. Cytosolic pH regulates many cell activities while apoplastic pH fluctuations are involved in cell development and responses to pathogen infection. In this study using the patch-clamp technique, we have investigated the pH regulation of two anion channel activities at the plasma membrane. Rapid-type and slow-type anion channels are regulated by pH but in an apparent opposite manner and via distinct mechanisms. The fast anion channel regulation involves two protonation sites, one on each side of the channel protein, which regulate the voltage-dependent gating at hyperpolarized potentials. Based on steady state and kinetic data, we propose that pH regulations interfere, at the inner side with the nucleotide block of the channel pore described previously, and at the outer side with the extracellular anion influx with consequences on the repulsive effect on the nucleotide block. Conversely, the slow anion channel is activated by alkalinization in a voltage-independent manner. These opposite pH regulations represent additional diverging characteristics between rapid-type and slow-type hypocotyl anion channels.

INTRODUCTION

Patch-clamp studies have revealed that anion channels are present in plant cells from various organs [1] such as hypocotyl, root or leaves, where they play specific physiological roles. The best documented example so far is the stomatal guard cell where two anion channels from the plasma membrane have been extensively characterized. One of them, called GCAC1, shows fast activation and deactivation kinetics in the 10 ms range was also termed R-type (for rapid-type) channel [2,3]. The second shows slow kinetics in the 10 s range and was termed S-type (for slow-type) channel [4,5].

At the plasma membrane of *Arabidopsis* hypocotyl epidermal cells, R-type and S-type anion channels have been shown to coexist [6]. These two channels show distinct regulation characteristics: a high nitrate-permeation with slow activation and deactivation kinetics for the S-type channel [6], and rapid kinetics, strong voltage-dependence associated with sulfate and nitrate permeation for the R-type [7-9]. Both channels are highly regulated, mostly by distinct mechanisms. For example, the slow anion channel of hypocotyl cells is modulated by phosphorylation [6] while the rapid anion channel is regulated by intracellular nucleotides with an original mechanism [8]: a nucleotide molecule is recruited from the cytosol side and is able to block the channel pore in a voltage-dependent manner [10]. This block is counteracted by extracellular permeant anions at physiological concentrations. Another regulation of the rapid anion channel involves cytosolic anions: sulfate, an unusual permeant anion, is able to maintain maximal activity of the fast anion channel during hours [9], whereas a rapid run-down is observed with other permeant anions, such as chloride and nitrate. Anion channels, including those described on the plasma-membrane of epidermal cells of *Arabidopsis thaliana* hypocotyl, thus appear as multi-regulated transport systems, as predicted by the particular status of anions in plant cells.

In response to various stimuli such as elicitors of defence reaction or osmotic stresses, intracellular pH (pHi) decrease together with extracellular pH (pHe) increase, accompanied by anion effluxes, are often observed [11-13]. In stomata it has been shown that abscisic acid-induced guard cell closure involves anion channel activation [14] together with apoplastic pH variations [15]. In this study, we have investigated the regulation by pH of the rapid and slow anion channels from *Arabidopsis* hypocotyls. Both channels are regulated by pH in an opposite manner and represent good candidates to play a role in pH-dependent signalling pathways in hypocotyl cells.

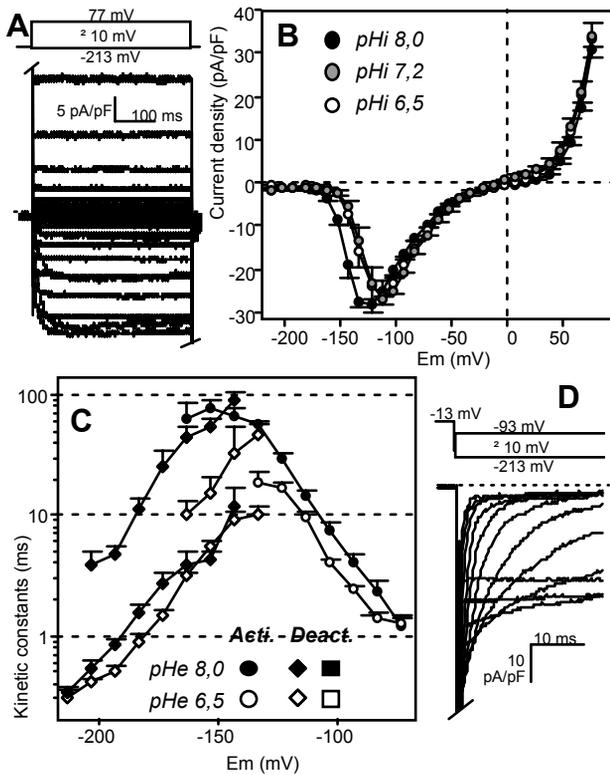


Figure 1: Effects of intracellular pH on the rapid anion channel activity. (A) Typical whole-cell currents recorded from plasma membrane with an activating pulse protocol. From a holding potential of -213 mV, 794 ms pulses were applied from -213 to 77 mV with a 10 mV increment every 3 s. The pipette contained 25 mM Cs $_2$ SO $_4$, 2 mM MgCl $_2$, 4.2 mM CaCl $_2$, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES, 5 mM MgATP, 5 mM LiGTP, pH 6.5 adjusted with Tris, osmolarity adjusted with manitol to 450 mOsm. The bath contained 50 mM CaCl $_2$, 5 mM MgCl $_2$, 0.5 mM LaCl $_3$, 10 mM MES, pH 5.6 adjusted with Tris, osmolarity adjusted with manitol to 450 mOsm. (B) I-V plots of the steady-state current obtained from the protocol shown in A for protoplasts loaded with pipette solutions at pH 6.5 ($n=5$), pH 7.2 ($n=4$) and pH 8.0 ($n=6$). Except for pH, pipette and bath solutions were the same as in A. Each point is mean \pm SE. (C) Activation (circles), fast deactivation (squares) and slow deactivation (diamonds) at pH 6.5 (white) and pH 8.0 (black). Activating constants are obtained from mono-exponential fit from protocol described in A. Deactivating constants are obtained from bi-exponential fit from protocol described in D. Same conditions as in A and B. (D) Typical whole-cell currents recorded from plasma membrane with a deactivating pulse protocol. From a holding potential of -13 mV, 488 ms pulses were applied from -213 to -93 mV with a 10 mV increment every 3 sec. Same condition as in A.

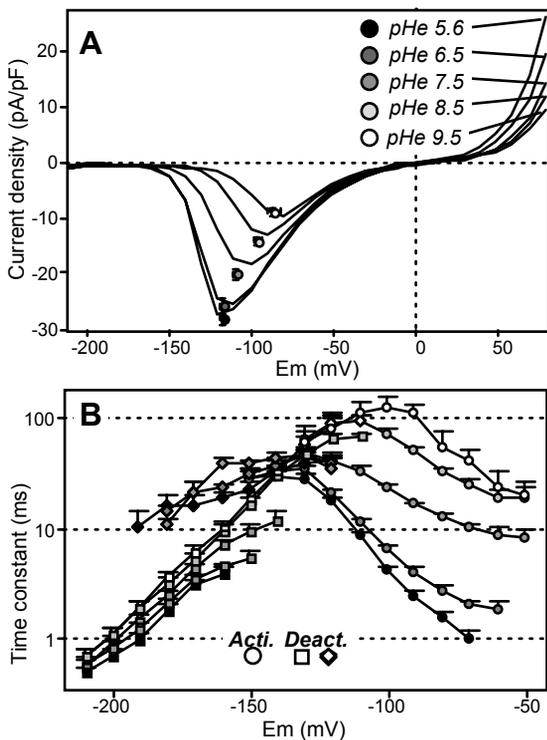


Figure 2: Effects of extracellular pH on the rapid anion channel activity. (A) pH $_e$ dependence of the steady state channel activity. Example of steady state I-V curves obtained from the voltage protocol described in figure 1A at indicated pH $_e$. Same pipette solution as in figure 1A but with 50 mM HEPES. Circles are mean \pm SE of the peak current point ($n=5$ to 6). (B) pH $_e$ dependence of activation (circles) and deactivation (diamonds and squares) kinetics, with the same color code as in A. Activating constants are obtained from mono-exponential fit from the protocol described in figure 1A. Deactivating constants are obtained from bi-exponential fit from the protocol described in figure 1D. Bath and pipette solutions are the same as in figure 1A. Points are mean \pm SE ($n=5$ to 6).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plant material and protoplast isolation

Arabidopsis thaliana (ecotype Columbia) 6 to 8 day old plantlets were grown, after 7 days stratification, on a medium containing 5 mM KNO₃, 2.5 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 6.0, 2 mM MgSO₄, 1 mM Ca(NO₃)₂, 1 mM MES, 50 μM Fe-EDTA, Murashige and Skoog micro-elements [16]10g.l⁻¹ sucrose and 7g.l⁻¹ agar. Culture conditions were 21°C and 16-h day length at lighting levels of 120 μE.m⁻².s⁻¹. Hypocotyls were excised from 30 to 40 seedlings, and protoplasts from epidermal cells (diameter in the range of 25 to 75 μm and membrane capacitance in the range of 20 to 50 pF) were prepared as described previously [7,17].

Electrophysiological investigations

Patch-clamp experiments were performed as described by Hamill et al. [18] using an Axon 200A amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA) for whole-cell recordings, piloted by a PC (Dell Computer) with the Clampex software (pClamp 6.0.2, Axon Instruments).

During measurements, freshly isolated protoplasts were maintained in a reference bath medium containing 50 mM CaCl₂, 0.5 mM LaCl₃, 10 mM MES and pH adjusted to 5.6 with Tris. Acid loads were done by adding 3 mM Propionate/Na (pH 5.6) in the bath. Other bath pHs were obtained with addition of NaOH in a reference bath containing 50 mM CaCl₂, 0.5 mM LaCl₃, 10 mM MES, 10 mM Hepes and pH adjusted to 5.6 with Tris (pHe). The bath osmolarities were adjusted to 450 mOsmol with mannitol using a Wescor 5500 vapor pressure osmometer (Wescor, Logan, Utah). The patch pipettes were filled with 25 mM Cs₂SO₄ or 50 mM CsNO₃ for the rapid- and the slow-type channels respectively, and with 2 mM MgCl₂, 10 mM or 50 mM Hepes, 5 mM EGTA, 4.2 mM CaCl₂ (free [Ca²⁺] = 1 μM), 5 mM MgATP, 5 mM LiGTP. Pipette solutions were adjusted to indicated pH with Tris (pHi). The pipette osmolarities were adjusted 450 mOsmol with mannitol.

RESULTS

The activity of the rapid anion channel is poorly affected by intracellular pH

The effects of pH on the activity of the rapid-type anion channel have been investigated using the patch-clamp technique in the whole-cell configuration. Sulfate-based pipette solution allows to record rapid channel current with a high stability during hours [9]. To investigate the effects of intracellular pH (pHi), protoplasts were loaded with pipette solutions at pHi 6.5, 7.2 and 8.0, and after the stabilization of channel activity, depolarizing voltage pulses (figure 1A) were performed to build the steady state current-voltage curves (figure 1B). At hyperpolarized potentials, the voltage pulses did not activate any current indicating that voltage-dependent sulfate-permeable channels are closed. Depolarization of the membrane activated an inward current corresponding to a sulfate efflux. At positive voltage, an outward current corresponds to a chloride influx. At pHi of 6.5 and 7.2, the steady state activity of the rapid anion channel is poorly affected, with peak potentials of -102.0±2.7 mV (n=6) and -100.2±2.2 mV (n=4), respectively. At pH 8.0, a weak but significant shift of the peak potential toward more negative potential (-114.1±2.2, n=5) was observed. To evaluate the pH dependence of channel kinetics, activation pulses were fitted from the protocol described in figure 1A with a mono-exponential function and the time constants were plotted against the voltage (figure 1C, circles). A hyperpolarizing pulse protocol (figure 1D) was used for the evaluation of the deactivation constants which were fitted by a bi-exponential function (figure 1C). Both activation and deactivation are slightly but significantly slowed down by intracellular alkalinization.

The rapid channel gating is affected by extracellular pH

The modulation of rapid anion channel activity by extracellular pH (pHe) has been investigated with a highly buffered pipette solution at pH 7.2 (50 mM Hepes/Tris). Voltage pulse protocols were performed in the reference bath (pHe 5.6) and after addition of NaOH, corresponding to pHe of 6.5, 7.5 and 8.5. We have checked, in a first step, that sodium ions (at maximum concentration of 18 mM in pH 8.5 bath) did not affect the rapid channel by perfusing reference bath with 20 mM NaCl (data not shown). With the alkalinization of the bath, the current-voltage relationship (figure 2A) showed a shift of the peak current corresponding to a shift of the voltage-dependent gating toward less negative potential. This effect is accompanied by a decrease of the outward current corresponding to a chloride influx. Activating and deactivating protocols described in figures 1A and D were used to investigate the pHe dependence of channel kinetics. Figure 2B shows that pHe poorly affected the deactivating kinetic but significantly

Figure 3: *pHi* dependence of the slow anion channel activity.

(A) Voltage protocol and typical currents recorded with (left) and without (right) perfusion of 3 mM NaPropionate in the bath. After a 5 sec ramp from the holding potential of -189 mV, the membrane potential is clamped at +71 mV during 36 sec, a protocol which activates slow channels. The 40 sec subsequent polarization step, from -189 mV to +91 mV with a 60 mV increment, results, for the more hyperpolarized potentials, in large tail currents (instantaneous current, diamonds) followed by a slow relaxation toward a steady-state current (relaxed current, circles). The pipette contained 50 mM CsNO₃, 2 mM MgCl₂, 4.2 mM CaCl₂, 5 mM EGTA, 10 mM Hepes, 5 mM MgATP, 5 mM LiGTP, pH 7.2 adjusted with Tris, osmolarity adjusted with manitol to 450 mOsm. The bath contained 50 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM LaCl₃, 10 mM Mes, pH 5.6 adjusted with Tris, osmolarity adjusted with manitol to 450 mOsm. (B) Current-voltage curves obtained from A with (black) and without (white) 3 mM NaPropionate. Diamonds correspond to "instantaneous current" (linst.) and circles to "relaxed currents" (Irel.). (C) Relative effect and reversibility of acid load on linst. (white) and Irel. (grey) at -189 mV extracted from the protocol described in A. linst. and Irel. before perfusion of 3mM NaPropionate are -29.9±11.6 and -16.1±8.2 pA/pF, respectively. Number of repetitions are indicated.

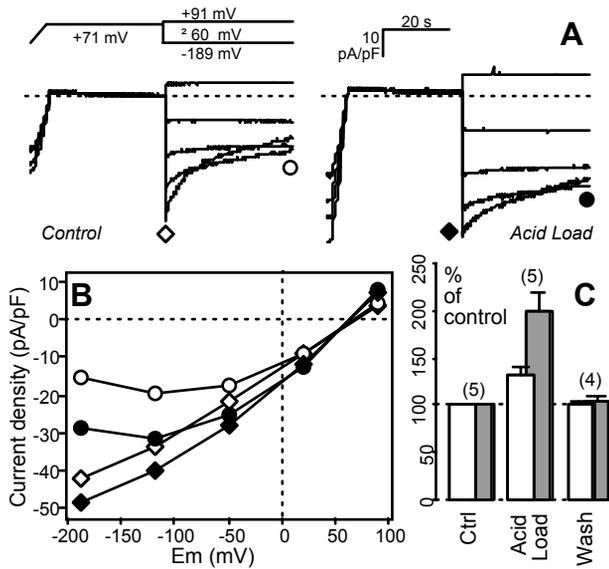
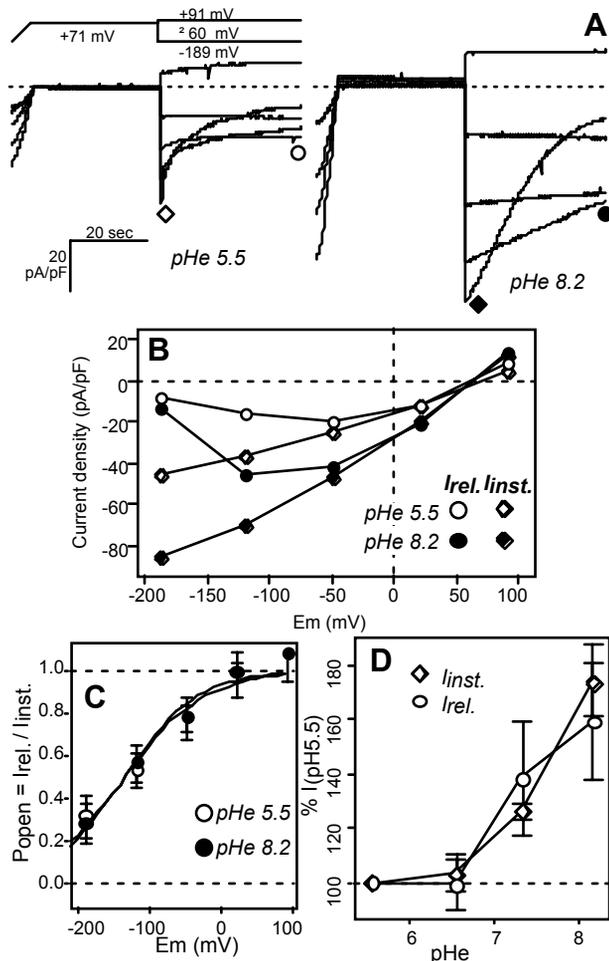


Figure 4: Effects of extracellular pH on the slow anion channel activity.

(A) Typical current recorded before (right) and after (left) perfusion bath at pH 8.2. Voltage protocol is described in figure 3A. The pipette contained 50 mM CsNO₃, 2 mM MgCl₂, 4.2 mM CaCl₂, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES, 5 mM MgATP, 5 mM LiGTP, pH 7.2 adjusted with Tris, osmolarity adjusted with manitol to 450 mOsm. The bath contained 50 mM CaCl₂, 0.5 mM LaCl₃, 10 mM Mes, 10 mM Hepes, pH 5.6 adjusted with Tris, osmolarity adjusted with manitol to 450 mOsm. pH 8.2 is adjusted with addition of NaOH in this bath. (B) Current-voltage curves obtained from A at pH 5.6 (white) and pH 8.2 (black). Diamonds correspond to "instantaneous current" (linst.) and circles to "relaxed currents" (Irel.). (C) Mean open probabilities against voltages at pH 5.5 and 8.2. Open probabilities are assimilated to the ratio Irel. divided by linst. Boltzman fit values are given in the text. Same conditions as in A. Each point is mean±SE (n=5). (D) Dose-reponse curve of the slow channel activity to extracellular pH. Diamonds correspond to linst. and circles to Irel.. The values are normalized with respect to the amplitudes obtained with the reference bath described in A. The different pHe values are obtained by perfusion of NaOH in the bath. Each point is mean±SE (n=5).



slowed down the activation one. For example, at -81 mV, the activation constant increases from 1.51 ± 0.19 ms at pH 5.6 to 54.20 ± 22.00 ms at pH 9.5 (n=5).

Is pHi able to modulate slow-channel activity?

To study the activity of the slow anion channel, protoplasts were loaded with a nitrate-base pipette solution, and the slow channel activity was recorded after the run-down of the rapid channel, using protocols described in figure 3A. Because of the high variability in the slow anion channel activity from one protoplast to another one, it is difficult to test effects of the intracellular pH directly by loading protoplasts with different pHi solutions. For this reason, we have chosen, after getting a stable activity of the slow channel, to acidify the intracellular compartment by performing an acid load. For this purpose the protoplast is perfused during the patch-clamp experiment using a 10 mM Hepes/Tris (pH 7.2) pipette solution and then 3 mM sodium propionate (pH 5.6) is added to the bath (figure 3A). The effect of such an acid load upon cytosolic pH cannot be precisely quantified, but referring to previous work from Mathieu et al. (1996) on tobacco cells, an estimation of the acidification can be given. For 3 mM of propionate in the bath solution, a concentration of 0.47 mM of the protonated form of the weak acid at bath pH of 5.6 is calculated with the Henderson-Hasselbalch equation. In this condition, a rise of 0.4 to 0.6 pH unit is expected. Current-voltage plots show an increase of the activity upon propionate addition (figure 3B and C) and a reversibility of this effect (figure 3C). To distinguish between acid load and sodium effects, the absence of effect when perfusing 50 mM NaCl in the bath has been checked (data not shown).

The slow anion channel activity is activated by extracellular alkalization

To investigate the extracellular pH dependence of the slow anion channel activity, experiments of bath alkalization were done on protoplasts loaded with a nitrate-based pipette solution containing 10 mM Hepes/Tris (pHi 7.2). Increasing the external pH medium (from 5.6 to 8.0) was achieved by adding NaOH to the bath perfusing solution. Figure 4A and 4B illustrate that changing pHe from 5.6 to 8.0 increased the slow anion channel activity at negative voltages. To better characterize the pH regulation of the slow channel gating, the open probability, expressed as the ratio ($I_{rel}/I_{inst.}$), was plotted against membrane potentials (figure 4C). The Boltzman fit of the mean open probabilities gave $V_{1/2}$ of -132.5 and -133.5 mV and z_g of -0.46 and -0.50, for pHe 5.6 and pHe 8.0, respectively (n=5). Thus, the voltage-dependent gating was not affected by alkalization of the bath solution. To get an idea on the pHe range of the slow anion channel modulation we have perfused increasing concentrations of NaOH corresponding to increased pHe values in the bath. Figure 4D, which shows normalized instantaneous and relaxed currents as a function of pHe, indicates that the increase of channel activity occurs at pHe higher than 6.5 (n=5).

DISCUSSION

Mechanisms underlying the pH sensitivity of the R-type anion channel

This study provides new elements of regulation for the rapid anion channel at the plasma membrane of epidermal cells of *Arabidopsis* hypocotyls. We have recently shown [10] that the rapid anion channel is gated by intracellular nucleotides able to block the channel pore in a voltage-dependent manner, this block being counteracted by extracellular permeant anions. Intracellular alkalization up to pH 8 has a dual effect, as it shifts the activation potential toward negative potentials and it slows down activation and deactivation kinetics. This indicates that pHi likely interferes with the nucleotide blocking process of the R-type channel pore. Since the observed gating shift occurs for pH far from the ATP pKa (pKa=6,63 [19]) and in an opposite way from what should be expected from nucleotide deprotonation [10], we exclude a direct pH effect via the nucleotide, favouring the hypothesis of a direct deprotonation occurring at the channel protein level. Considering the gating model recently presented [10], the increase of both activation and deactivation constants is in favour of a decrease in the efficiency of nucleotide penetration into the channel pore (k_{on}) and of expulsion out of the pore (k_{off}), caused by a protein deprotonation interacting with nucleotide within the channel pore.

Extracellular alkalization affects the fast anion channel activity in an opposite way of the intracellular alkalization. Indeed, lowering extracellular pH induced a shift of the voltage-dependent gating toward less negative voltages with a decrease of the activation kinetics, without modifying the deactivation kinetics. We have previously described a similar effect caused by extracellular decrease of chloride concentration. Our hypothesis [10] was that extracellular anions reduce the nucleotide effect by a repulsive mechanism. These results indicate that the channel protein deprotonation could act by decreasing the apparent extracellular chloride concentration "fielded" in the vicinity of the channel protein.

Table 1: Divergent characteristics between both channel activities at the plasma membrane of *Arabidopsis* epidermal cells.

	R Type activity	S type activity
Voltage-dependence	High (z _g almost -4)	Low (z _g < -1)
Kinetics	Range of milliseconds	Range of ten seconds
Selectivities	NO ₃ = SO₄ > Cl	NO ₃ >> Cl >> SO₄
Nucleotide regulations	Binding site / pore obstruction	Phosphorylation processes
Blocker effects	High: Nif Intermediate: NPPB Without effect: DIDS, 9AC	High: DIDS Intermediate: NPPB, Nif Without effect: 9AC
pHe alkalization	Inhibited	Activated
pHi acidification	Inhibited/weak effect	Activated
Activity variations during seal	Run-down with Cl and NO ₃ based pipettes Sustained activity with SO ₄ based pipette	Sustained activity with NO ₃ based pipette

This is in agreement with the decrease of chloride-dependent outward current observed at positive voltages with the bath alkalization. However, the extracellular pH might act by a distinct process leading to a stabilization of the channel in the nucleotide-blocked complex.

The rapid anion channel of *Arabidopsis* hypocotyl cells shows pH regulation characteristics distinct from those of its *Vicia faba* counterpart GCAC1. While the cytosolic acidification from 7.8 to 5.6 did not affect GCAC1 activation and deactivation kinetics [20], the single-channel activity was increased. For GCAC1, a pHe decrease affects mainly the time constant of slow inactivation while for the *Arabidopsis* rapid channel we show here that extracellular alkalization increases the activation time constant. This pH sensitivity represents an additional element besides nucleotide regulation [8,10,20] and pharmacological [8,21,22], showing that two anion channels close in terms of voltage dependency may present pronounced differences in terms of regulation.

pH sensitivity of the S-type anion channel

The slow-type anion channel of *Vicia faba* has been shown to be controlled by various cellular parameters such as calcium [23], abscisic acid [24], ATP binding cassette modulators [25] and protein phosphorylation [24,26]. As well the activity of the *Arabidopsis* slow channel is regulated by phosphorylation processes [6]. We show in this study for the first time that intra- and extra-cellular pHs modulate the slow anion channel activity in *Arabidopsis* hypocotyls. A cytosolic acidification by about 0.5 pH unit obtained by acid load [13] induces an activation of the slow anion channel leading to a doubling of the steady-state current measured at -189 mV, whereas an extracellular pH higher than 6.5 is required to activate this channel. Similarity voltage-dependent open probabilities were obtained at pH 5.5 and 8.0, indicating that neither the activation potential, nor the voltage-dependent gating are affected by external pH. Such a pHe-dependent behaviour might be explained either by a pH-dependent, voltage-independent increase of the open probability, or by a recruitment of silent channels or an increase of single channel conductance at alkaline pHe.

Physiological relevance of the pH regulation

We have previously shown that rapid-type and slow-type hypocotyl anion channels coreside at the plasma membrane of hypocotyl cells [6], but exhibit divergent properties in terms of voltage-dependence, activation and deactivation kinetics, selectivity, nucleotide regulation and pharmacological sensitivity [6-9]. These characteristics and regulation mode of the two channels are summarised in table 1. The distinct pH modulation of rapid and slow channels described in this study provides a new argument in favour of the existence of two different channels, as opposed to an interconversion from a rapid mode to a slow mode for a same channel as proposed by Dietrich *et al.* [27] for guard cells.

In plant cells, according to the plant species and the technique of measurement used, cytosolic pH values in resting conditions are within 6.8 to 7.9 [28]. Under certain conditions of stress, for instance upon hormone or elicitor treatments, the internal pH can increase by up to one pH unit [28,29] while a concomitant alkalization up to 1.5 units of the extracellular space can be observed [30]. In the other hand, authors working on the acid growth theory have provided arguments in favour of the activation of the proton pump by auxin correlated with a cytoplasmic acidification [31]. Considering external and internal pH variations occurring in the auxin response, the modulation of the slow channel by internal pH seem to be the most physiologically relevant process. Hence the role of this channel could be to limit the anion efflux keeping a high internal osmolarity which will drive water influx necessary for cell elongation. Such a role would fit with the inhibitory effect of auxin on the *Arabidopsis* hypocotyl cell elongation [32]. Apoplastic pH variations are less documented than those of vacuolar and cytosolic compartments. In the root cortex of *Zea mays*, Felle [33] reported an apoplastic pH between 5.1 and 5.6, subjected to variations from 4.8 to 6.2 depending on the plant treatment. Then, considering the domain of pHe sensitivity of both channels (above 6.5) the modulation by external pH should occur only in extreme condition. Nevertheless, it should be mentioned that the very small apoplastic volume is in favour of large variations of pH and of solute concentration [34], and modulation of anion channels for strong extracellular pH response should not be excluded. The internal pH effect on the R-type channel is more discrete but still occurs in a physiological pH range. This channel has been proposed to play a role in cell excitability and in long distance electrical signalling [1,7,10]. In this context, an intracellular alkalization might increase cell excitability by lowering the threshold activation potential.

In conclusion, pH represents a new element of regulation of S-type and R-type *Arabidopsis* anion channels. This regulation via the pH can putatively occur in several signalling networks including anions flux and pH variations such as those observed in response to pathogen or hormone. As a next step we believe that the pharmacology combined with a refined description of these channels should lead to the discovery of their functions.

References

- [1] Barbier-Brygoo, H., Vinauger, M., Colcombet, J., Ephritikhine, G., Frachisse, J.-M. and Maurel, C. (2000) *Biochim Biophys Acta* 1465, 199-218.
- [2] Keller, B.U., Hedrich, R. and Raschke, K. (1989) *Nature* 341, 450-453.
- [3] Dietrich, P. and Hedrich, R. (1998) *Plant J* 15, 479-487.
- [4] Schroeder, J.I. and Keller, B.U. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 87.
- [5] Schmidt, C. and Schroeder, J.I. (1994) *Plant Physiol* 106, 383-391.
- [6] Frachisse, J.M., Colcombet, J., Guern, J. and Barbier-Brygoo, H. (2000) *Plant J* 21, 361-371.
- [7] Thomine, S., Zimmermann, S., Guern, J. and Barbier-Brygoo, H. (1995) *Plant Cell* 7, 2091-2100.
- [8] Thomine, S., Guern, J. and Barbier-Brygoo, H. (1997) *J Membr Biol* 159, 71-82.
- [9] Frachisse, J.M., Thomine, S., Colcombet, J., Guern, J. and Barbier-Brygoo, H. (1999) *Plant Physiol* 121, 253-261.
- [10] Colcombet, J., Thomine, S., Guern, J., Frachisse, J.-M. and Barbier-Brygoo, H. (2001) *J Biol Chem* 276, 36139-36145.
- [11] Cazalé, A.-C., Rouet-Mayer, M.-A., Barbier-Brygoo, H., Mathieu, Y. and Laurière, C. (1998) *Plant Physiol* 116, 659-669.
- [12] Pugin, A., Frachisse, J.-M., Tavernier, E., Bligny, R., Gout, E., Douce, R. and Guern, J. (1997) *Plant Cell* 9, 2077-2091.
- [13] Mathieu, Y., Sanchez, F.J., Droillard, M.-J., Lapous, D., Laurière, C. and Guern, J. (1996) *Plant Physiol Biochem* 34, 399-408.
- [14] Ward, J.M., Pei, Z.-M. and Schroeder, J.I. (1995) *Plant Cell* 7, 833-844.
- [15] Felle, H.H., Hanstein, S., Steinmeyer, R. and Hedrich, R. (2000) *Plant J* 24, 297-304.
- [16] Murashige, T. and Skoog, F. (1962) *Physiol Plant* 15, 473-497.
- [17] Elzenga, J.T.M. (1991) *Plant Physiol* 97, 1573-1575.
- [18] Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F.J. (1981) *Pflügers Arch* 391, 85-100.
- [19] Pecoraro, V.L., Hermes, J.D. and Cleland, W.W. (1984) *Biochimistry* 23, 5262-5271.
- [20] Schulz-Lessdorf, B., Lohse, G. and Hedrich, R. (1996) *Plant J* 10, 993-1004.
- [21] Marten, I., Zeilinger, C., Redhead, C., Landry, D.W., Al-Awqati, Q. and Hedrich, R. (1992) *EMBO J* 11, 3569-3575.
- [22] Marten, I., Busch, H., Raschke, K. and Hedrich, R. (1993) *Eur Biophys J* 21, 403-408.
- [23] Schroeder, J.I. and Hagiwara, S. (1989) *Nature* 338, 427-430.
- [24] Pei, Z.-M., Kuchitsu, K., Ward, J.M., Schwarz, M. and Schroeder, J.I. (1997) *Plant Cell* 9, 409-423.
- [25] Leonhardt, N., Vavasseur, V. and Forestier, C. (1999) *Plant Cell* 11, 1141-1152.
- [26] Schmidt, C., Schelle, I., Liao, Y.J. and Schroeder, J.I. (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 9535-9539.
- [27] Dietrich, P. and Hedrich, R. (1994) *Planta* 195, 301-304.
- [28] Guern, J. (1991) *Int Rev Cyt* 127, 111-173.
- [29] Tretyn, A., Wagner, G. and Felle, H. (1991) *J Plant Physiol* 139, 187-193.
- [30] Nühse, T.S., Peck, S.C., Hirt, H. and Boller, T. (2000) *J Biol Chem* 275, 7521-7526.
- [31] Brummer, B., Bertl, A., Potrykus, I., Felle, H. and Parish, R.W. (1985) *FEBS Lett* 189, 109-114.
- [32] Thomine, S., Lelièvre, F., Boufflet, M., Guern, J. and Barbier-Brygoo, H. (1997) *Plant Physiol* 115, 533-542.
- [33] Felle, H.H. (1998) *J Exp Bot* 49, 987-995.
- [34] Grignon, C. and Sentenac, H. (1991) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42, 103-128.

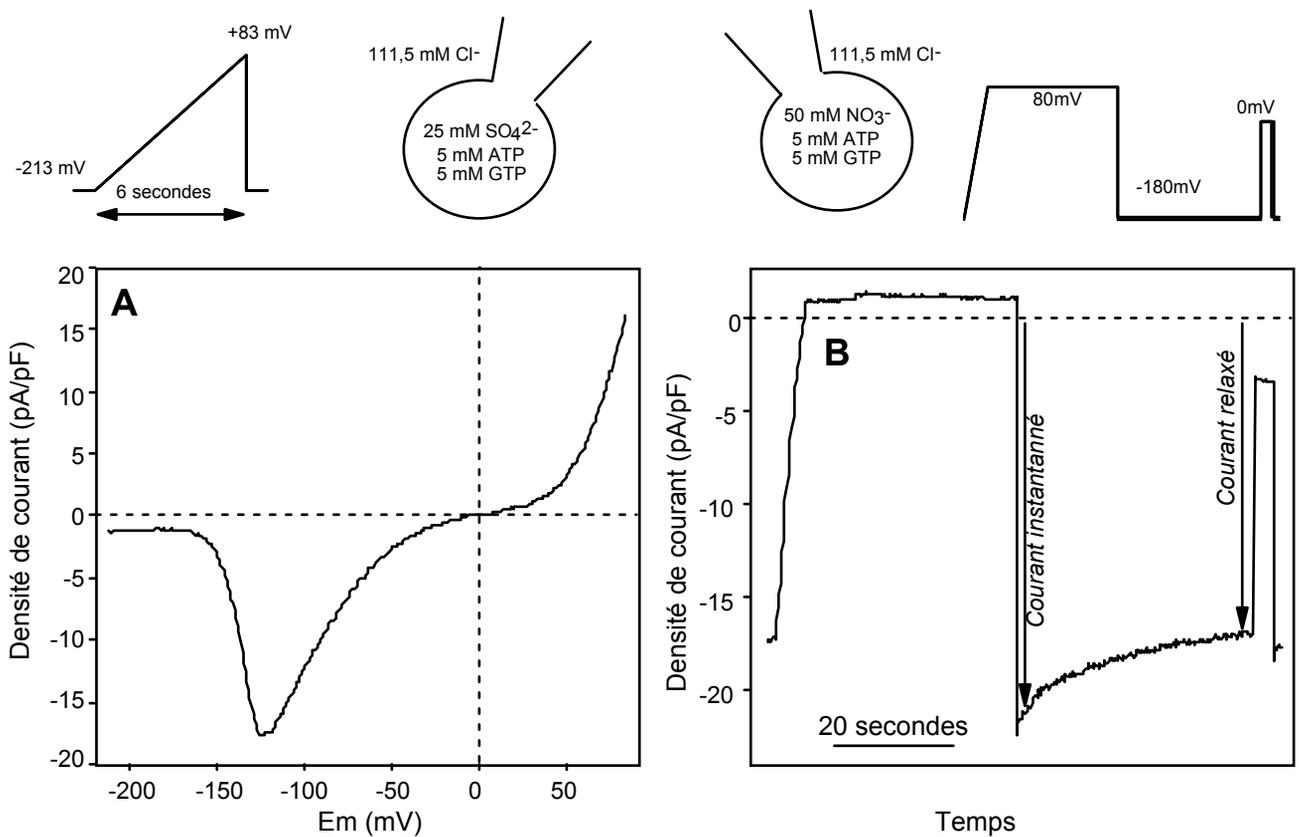


Figure II-5: Canaux anioniques rapide et lent de la membrane plasmique des cellules en suspension d'Arabidopsis thaliana. (A) Courbe IV du canal rapide obtenue grâce à une rampe de voltage. Pipette: 25 mM Cs₂SO₄, 2 mM MgCl₂, 4,2 mM CaCl₂, 5 mM EGTA, 5 mM MgATP, 5 mM LiGTP 10 mM Hepes/Tris (pH 7,2), 450 mOsm. Bain: 50 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM LaCl₃, 10 mM Mes/Tris (pH 5,6) (B) Courant du canal de type lent en réponse à un pulse de voltage. Pipette: 50 mM CsNO₃, 2 mM MgCl₂, 4,2 mM CaCl₂, 5 mM EGTA, 5 mM MgATP, 5 mM LiGTP 10 mM Hepes/Tris (pH 7,2), 450 mOsm. Même bain que A.

Tableau II-3: Comparaison des 2 canaux de la membrane plasmique des cellules en suspension et des cellules épidermiques de l'hypocotyle d'Arabidopsis. Solution de pipette pour le canal lent: 50 mM CsNO₃, 2 mM MgCl₂, 4,2 mM CaCl₂, 5 mM EGTA, 5 mM MgATP, 5 mM LiGTP, 10 mM Hepes/Tris (pH 7,2), Mannitol jusqu'à 450 mOsm. Solution de pipette pour le canal rapide: 25 mM Cs₂SO₄, 2 mM MgCl₂, 4,2 mM CaCl₂, 5 mM EGTA, soit 10 mM MgATP (cinétiques) soit 5 mM MgATP+5 mM LiGTP (densité de courant et inhibition par l'acide niflumique), 10 mM Hepes/Tris (pH 7,2), Mannitol jusqu'à 450 mOsm. Bain: 50 mM CaCl₂, (+ou- 5 mM MgCl₂), 10 mM Mes/Tris (pH 5,6) Mannitol jusqu'à 450 mOsm. (1) pour signification voir figure II-5B. (2) Frachisse *et al.*, 2000. (3) Thomine *et al.*, 1997a.

	Canal anionique lent				Canal anionique rapide			
	Densité de courant instantané ⁽¹⁾ (pA/pF)	Densité de courant relaxé ⁽¹⁾ (pA/pF)	Déactivation (-189 mV) (s)	Inhibition par 100 µM DIDS (%)	Densité de courant au pic (pA/pF)	Acti- vation (-96 mV) (ms)	Déacti- vation (-203 mV) (ms)	Inhibition par 100 µM Nif (%)
Cellules épidermiques de l'hypocotyle	-25,9±4,1 (n=43)	-9,5±3,0 (n=43)	9,7±0,7 (n=20)	82,4±8,4 ⁽²⁾	-35,7±4,6 (n=7)	1,77±0,23 (n=7)	0,66±0,13 (n=4)	55 ⁽³⁾
Cellules en culture	-24,2±4,6 (n=8)	-15,0±2,7 (n=8)	10,2±1,2 (n=8)	48,8±12,8 (n=4)	-15,5±2,3 (n=18)	6,2±2,2 (n=3)	11,4±0,6 (n=4)	30,1±6,4 (n=4)

D- Des canaux anioniques aux caractéristiques très similaires peuvent être observés en patch-clamp sur les cellules en culture d'*Arabidopsis thaliana*

Les cellules en culture d'*Arabidopsis thaliana* (columbia) présentent une série d'avantages et d'inconvénients que nous avons déjà mentionnés (voir objectif de la thèse). Dans l'hypothèse de la mise au point d'approches biochimiques et physiologiques intégrées (voir chapitre suivant), nous avons exploré grâce à la technique du patch-clamp, la membrane plasmique de protoplastes issus de ces cellules selon un protocole comparable à celui utilisé pour les cellules de l'hypocotyle (voir matériel et méthodes). Les deux canaux anioniques dont nous venons de parler, y sont présents et peuvent être observés dans les conditions définies précédemment. La figure II-5 présente des acquisitions caractéristiques du canal rapide et du canal lent des cellules en suspension. Le tableau II-3 présente la comparaison des activités de la membrane plasmique des cellules épidermiques et des cellules en suspension. Malgré de fortes homologues, nous avons constatés de petites différences avec les activités observées sur la membrane plasmique des cellules de l'hypocotyle, et concernant en particulier le canal anionique du type rapide. Une première divergence est la densité moyenne de courant rapide sur la membrane plasmique des cellules en suspension: elle est nettement inférieure à celle des cellules de l'hypocotyle, ce qui traduit peut-être un densité inférieure de molécules canal. De même les cinétiques, activation ou désactivation, du canal rapide semblent dans des conditions similaires des cellules en suspension.

Enfin, un dernier point assez étonnant est une sensibilité aux inhibiteurs inférieure pour les deux canaux des cellules en suspension. On peut l'expliquer par des conditions d'étude divergentes pour les deux types de cellule. Par exemple, les profils pharmacologiques du canal rapide ont été réalisés avec du chlorure comme anion perméant dans le cas des cellules de l'hypocotyle (Thomine *et al.*, 1997a), et du sulfate dans le cas des cellules en suspension. Ces divergences pourraient traduire des phénomènes de compétition entre inhibiteurs de canaux anioniques et certains paramètres de l'environnement. Cela pose bien sur des problèmes quand on essaye de relier les profils pharmacologiques des activités canal caractérisées en patch-clamp avec ceux de réponses intégrées plus complexes. Nous ne pouvons pour ces dernières que faire des hypothèses quant à l'environnement local des canaux de la membrane plasmique.

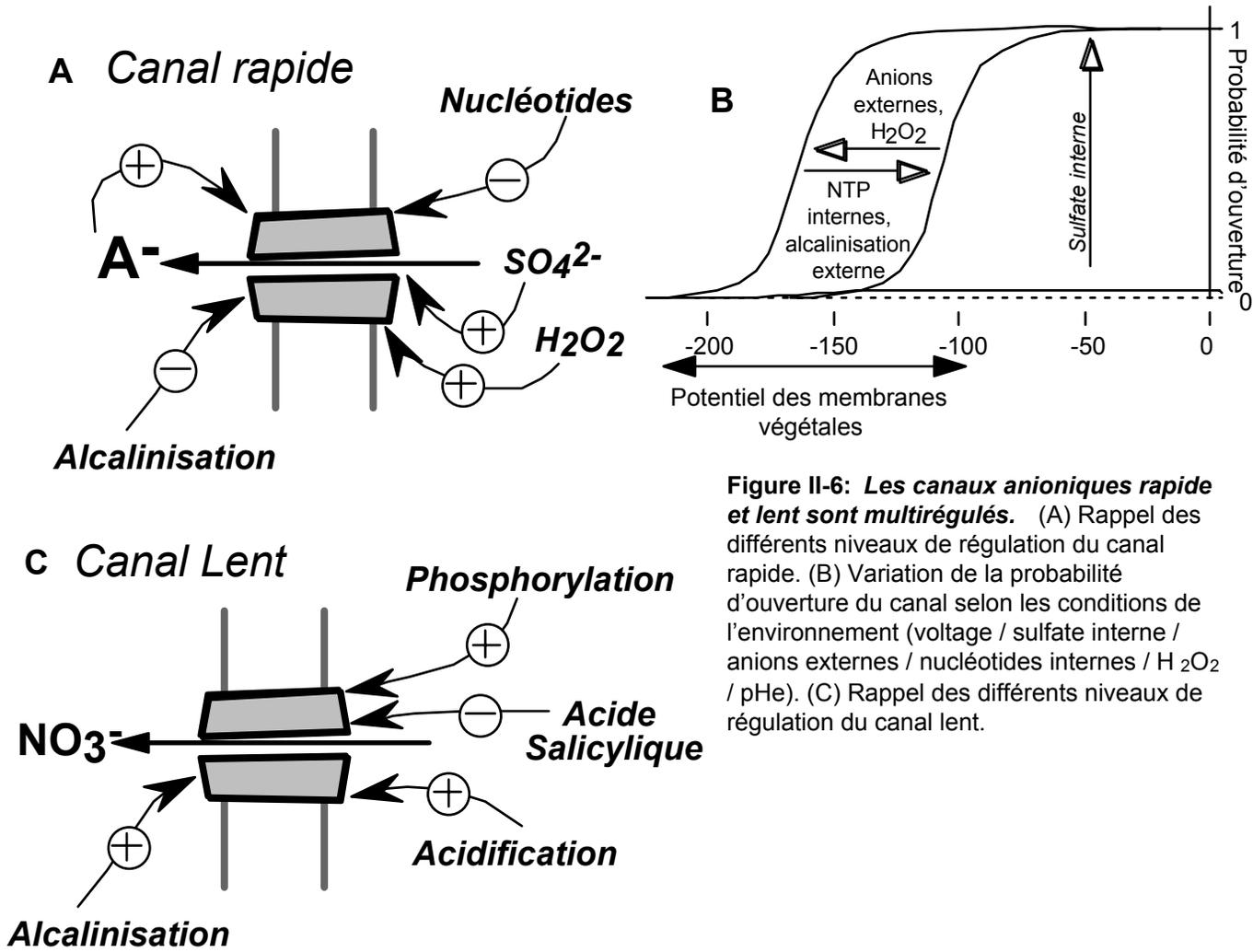


Figure II-6: Les canaux anioniques rapide et lent sont multirégulés. (A) Rappel des différents niveaux de régulation du canal rapide. (B) Variation de la probabilité d'ouverture du canal selon les conditions de l'environnement (voltage / sulfate interne / anions externes / nucléotides internes / H_2O_2 / pHe). (C) Rappel des différents niveaux de régulation du canal lent.

E- Conclusion

1- Les canaux anioniques de la membrane plasmiques d'Arabidopsis thaliana sont régulés de façon multiple et divergente

a- Multirégulation

Le figure II-6 récapitule les niveaux de régulations principaux caractérisés au cours de ce travail de thèse et de celui de Sébastien Thomine (Thomine, 1997) pour le canal rapide et le canal lent. Nous avons choisi jusqu'ici d'évoquer les caractéristiques les mieux comprises pour ces deux canaux et nous avons omis certains points potentiellement intéressants mais encore mal caractérisés. Il nous faut les mentionner maintenant. Par exemple, nous avons vu grâce à la technique du patch-clamp que l'acide salicylique inhibait le canal lent à des concentrations physiologiques (EC_{50} 280 μ M). Ce mécanisme semble proche du canal car il est rapide et passe par la face cytosolique (Jean-Marie Frachisse, communication personnelle). La fonction d'une telle régulation n'est pas encore bien comprise. De même le canal rapide est activé transitoirement par l'eau oxygénée à des concentrations de 1 mM (Sébastien Thomine, communication personnelle). Cette activation est due au déplacement de la fermeture par le voltage vers des potentiels plus négatifs, ce qui indique une interaction entre cet élément de régulation et l'obstruction du pore par les nucléotides.

Pour résumer, le canal anionique rapide est activé par le sulfate cytosolique de façon non dépendante du voltage. Un second niveau de régulation a lieu à travers la modulation de la dépendance au voltage du canal, d'une part par les anions externes, d'autre part par les nucléotides. L'eau oxygénée pourrait agir en affectant un de ces deux derniers paramètres. L'alcalinisation du bain réduit l'effet des anions externes sur l'obstruction du pore.

Le canal anionique lent est activé par phosphorylation de façon non dépendante du potentiel de membrane. Il est de plus recruté par l'acidification interne et l'alcalinisation externe. L'acide salicylique semble capable de réduire son activité par un mécanisme encore peu compris.

Comme cela a été montré dans le cas des canaux anioniques des cellules de garde, les canaux anioniques de la membrane plasmique des cellules de l'hypocotyle sont multi-régulés. C'était une conséquence déductible de notre hypothèse selon laquelle les canaux anioniques de la membrane plasmique ne peuvent être que faiblement actifs ou fortement actifs mais de façon transitoire.

b- Des caractéristiques souvent divergentes militent en faveur de deux canaux anioniques moléculairement distincts

Le tableau final du projet d'article n°4 retrace les différences entre les deux canaux dont la liste ne cesse de croître. La question de savoir s'il s'agit de deux canaux bien distincts ou d'un canal unique avec deux modes de fonctionnement différents n'est certes pas tranchée et ne le sera définitivement que lorsque les gènes auront été clonés. Néanmoins, nous pensons, basé sur cette longue liste de

caractéristiques divergentes, en particulier d'ordre biophysique, que ces deux canaux sont moléculairement différents.

2- Une base moléculaire pour les deux canaux anioniques de la membrane plasmique?

La base moléculaire des deux canaux n'est actuellement pas connue et nous ne pouvons nous livrer qu'à des suppositions basées sur des éléments de régulation caractérisés en patch-clamp.

Dans le cas du canal anionique rapide, la forme de la courbe IV ressemble assez à celle obtenue lors d'expression en système hétérologue de CLC1 (Foskett, 1998). De plus les anions perméants externes exercent une régulation sur le canal assez identique c'est à dire en modulant la fermeture par le potentiel de membrane (Pusch *et al.*, 1995). Toutefois, les mécanismes moléculaires avancés pour les deux canaux divergent: l'ouverture de CLC1 correspond à une modification conformationnelle induite par l'anion perméant alors que nous expliquons celle du canal rapide par un phénomène répulsif sur un nucléotide obstruant le pore. Ce dernier argument peut aussi être en faveur d'une protéine de type canal CFTR qui semble être activé, quoique de façon non dépendante du voltage, par les anions externes (Wu *et al.*, 2001). Par contre, le CFTR est régulé par phosphorylation (Anderson *et al.*, 1991a) ce qui ne semble pas être le cas du canal rapide. Enfin les sulfonylurées, des modulateurs des protéines de type ABC, n'affectent que faiblement le canal anionique rapide.

Dans le cas du canal lent, caractérisé par une cinétique lente et une faible activation par dépolarisation, il n'y a pas à ma connaissance de canaux de ce genre décrits dans la littérature. Certaines protéines, comme le CLCK1 et le $I_{Cl_{in}}$, sont sensibles au DIDS, le meilleur inhibiteur du canal lent mais la comparaison s'arrête souvent là. Une modulation par les sulfonylurées a été décrite pour le canal lent des cellules de garde de *Vicia faba* (Leonhardt *et al.*, 1999) et nous l'avons retrouvé dans notre système (résultat non montré). Ceci milite en faveur d'un canal ou d'une régulation du canal passant par une protéine ABC.

En conclusion, nous n'avons aucune idée de la nature moléculaire des activités canal anionique que nous caractérisons sur la membrane plasmique. De telles extrapolations sont difficiles à faire parce que les canaux anioniques ont des caractéristiques très divergentes et ce, même au sein d'une même famille. Par exemple, certains CLC peuvent être activés par dépolarisation (CLC-1) ou par hyperpolarisation (CLC0 et CLC-2), avec des cinétiques très variables. Leurs séquences de perméabilités sont aussi très variables ainsi que leur localisation et leurs fonctions. On conçoit très bien que la modification de quelques acides aminés cruciaux puissent affecter leur comportement électrique ou leur régulation rendant donc vain tous les paris faits entre séquences animales et à plus forte raison entre animales et végétales.

3- Malgré ces nombreux niveaux de régulation, les rôles des deux canaux sont hypothétiques

a- Le canal rapide: métabolisme ou signalisation électrique?

Chez *Arabidopsis thaliana*, différentes études ont mis en évidence le canal rapide dans d'autres types cellulaires que celui de sa description première: son activité a été observée dans les cellules du cortex de l'hypocotyle (Jean Marie Frachisse, communication personnelle) et, plus récemment, dans les cellules de garde des stomates (Pei *et al.*, 2000). Kiegle et ses collègues l'ont observé dans plusieurs types cellulaires des racines (Kiegle *et al.*, 2000). Enfin, des expériences préliminaires ont permis sa caractérisation dans les cellules en culture d'*Arabidopsis*. Il est donc probable que le canal rapide soit constitutivement présent dans de nombreux, si ce n'est dans tous les types cellulaires de la plantule. Une investigation en patch-clamp en condition de sulfate interne utilisant des plantules dont les lignées cellulaires sont bien identifiables permettrait de confirmer cette hypothèse. De telles plantes, exprimant la GFP dans certain types cellulaires, sont d'ailleurs disponibles (Maathuis *et al.*, 1998). Les localisations variées et assez systématiques du canal rapide semblent donc indiquer que celui-ci a une fonction de base à l'échelle cellulaire.

Dans l'article n°1, nous avons proposé l'hypothèse selon laquelle le canal rapide interviendrait dans la régulation de l'assimilation du sulfate: parce que cette assimilation est très "gourmande" en énergie, une façon de la réduire lors de carence énergétique est de faire ressortir le sulfate, substrat de la réaction. La conversion de l'ATP vers des formes portant moins de phosphate (ADP et AMP) provoque un déplacement de la régulation par le voltage vers des potentiels plus négatifs, c'est à dire une ouverture des canaux au potentiel de repos de la membrane, et à un efflux d'anion dont le sulfate. Par exemple, 6 heures d'anoxie provoquent la réduction de 2 tiers des stocks de nucléotides adénylés dans les racines de jeunes laitues ainsi qu'une réduction de 75 % de l'ATP (Kato-Noguchi, 2000). A ce jour, aucun efflux d'anions en réponse à l'anoxie n'a été rapporté dans la littérature.

L'apoplasme est un compartiment à la fois de volume réduit et très hétérogène, en particulier à cause de la paroi pectocellulosique et des charges fixes qu'elle porte. L'ouverture d'un canal anionique sur la membrane plasmique doit pouvoir faire varier considérablement les concentrations apoplasmiques. Il existe peu de données quant à ces variations. En utilisant des microélectrodes spécifiques insérées dans l'espace sous stomatique, l'effet de l'ABA sur la concentration de chlore a été suivi et passe de façon transitoire de l'ordre d'1 mM à 8 mM (Felle *et al.*, 2000). La régulation de la fermeture dépendante du voltage du canal rapide par ces concentrations en font un bon senseur de ce paramètre. Ainsi, l'augmentation du chlore externe (par exemple suite à l'ouverture d'un canal anionique), doit activer le canal rapide en déplaçant son potentiel d'activation vers le potentiel de membrane. Nous pouvons donc imaginer que le canal rapide intervient dans des phénomènes auto-entretenus d'efflux d'anions, et en ce plaçant localement dans le contexte de la paroi, imaginer qu'il intervient dans des dépolarisations propagées: l'ouverture du canal à un endroit cause l'augmentation des anions dans la paroi qui peuvent de proche en proche activer les canaux voisins en déplaçant leur potentiel d'activation.

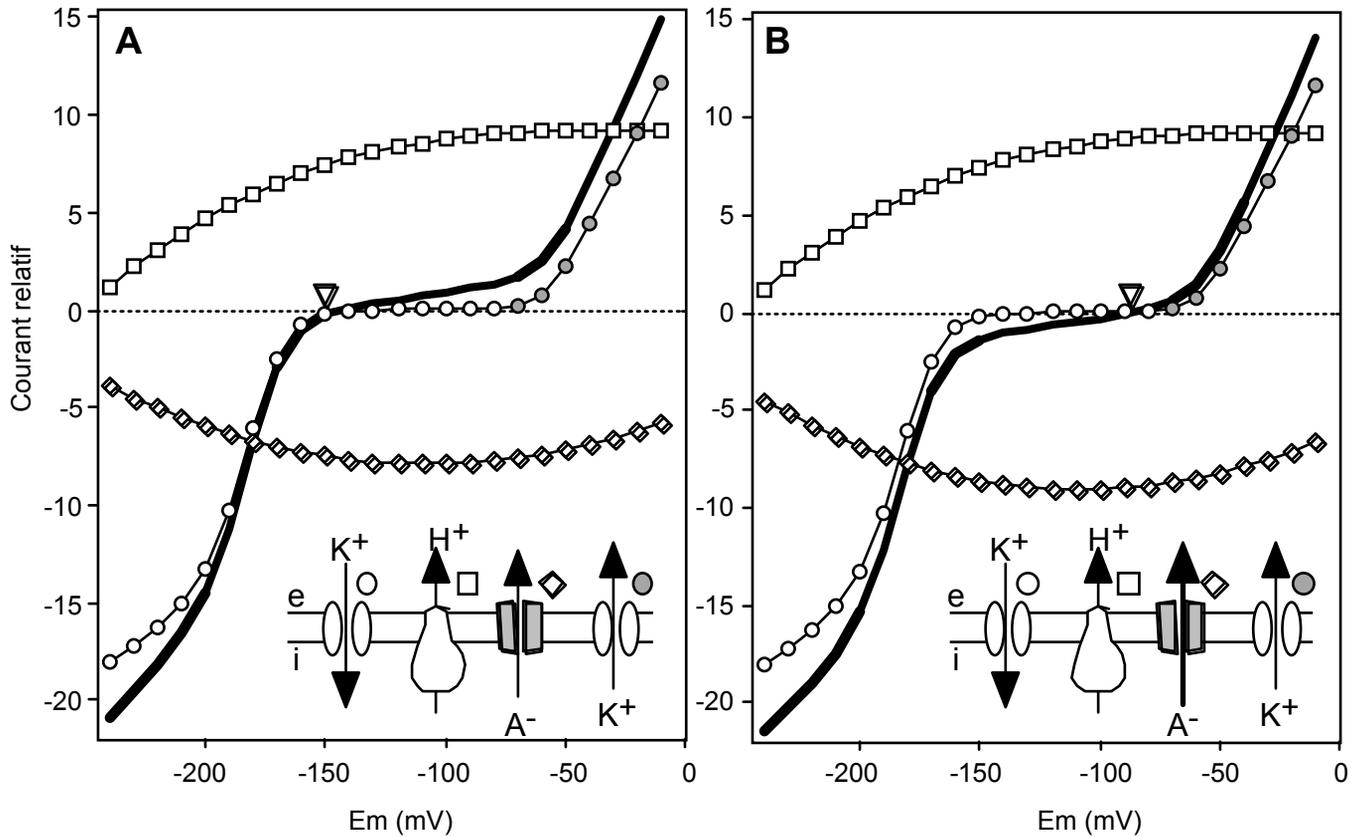


Figure II-7: Modélisation de la courbe IV de la membrane plasmique d'une cellule végétale. Ronds blancs: canal potassique entrant. Ronds gris: canal potassique sortant. Carrés: pompe ATPase. Triangles: canal anionique lent. Courbe épaisse: courant total ($I_{\text{Total}} = I_{\text{Pompe}} + I_{\text{Kentrant}} + I_{\text{Ksortant}} + I_{\text{Canal-lent}}$). Le triangle montre le potentiel de réversion. Les formules des courbes utilisées ne sont pas détaillées. Entre (A) et (B), la conductance anionique lente est accrue de 15 %. Notez le déplacement du potentiel de réversion.

Formules:

$$I_{\text{pompe}} = 598,49.E_m^3 - 6,10731.E_m^2 - 2,92445.E_m + 9.1218$$

$$I_{\text{anion}} = a.(224,49.E_m^2 + 48,114.E_m - 5.3054) \quad \text{avec } a=1 \text{ (A) ou } a=1,15 \text{ (B)}$$

$$I_{\text{potassium}} = \text{ajustement} \times \frac{1}{1 + \exp(zg.F.(E_m - V_{1/2}) / RT)} \times \frac{0,15 - 0,01.\exp(-E_m.F / RT)}{1 - \exp(-E_m.F / RT)}$$

avec pour K⁺ sortant: ajustement=10⁻³ V_{1/2}=-0,05 Volts et zg=-3
 et pour K⁺ entrant: ajustement=2.10⁻² V_{1/2}=-0,18 Volts et zg=3

La théorie voudrait que des canaux impliqués dans des phénomènes de signalisation électrique à des points clefs, surtout s'ils sont impliqués dans des réponses au stress, soient peu sélectifs. En effet, la plante qui accumule diversement les anions en fonction de leur disponibilité et de son état physiologique doit pouvoir "activer" ces voix de signalisation indépendamment des stocks internes. Les canaux anioniques impliqués dans la signalisation ont intuitivement peu de sélectivité. C'est le cas du canal rapide qui "laisse" passer trois types d'anions abondant dans la cellule: le sulfate, le nitrate et les chlorures.

b- Le canal lent: un rôle dans l'osmorégulation cellulaire et dans la compensation du courant de pompe?

Le canal lent des cellules épidermiques d'*Arabidopsis thaliana* est comparable à celui des cellules de garde de cette même plante et des stomates de *Vicia faba* (tableau I-1). Dans le système stomate, les canaux de type lent sont clairement impliqués dans l'osmorégulation en réponse à l'ABA. Ont-ils une fonction similaire dans les cellules de l'hypocotyle? Dans la mesure où le facteur limitant de l'élongation cellulaire est la résistance de paroi et non pas les modifications de la turgescence (comme c'est le cas pour les cellules de garde), le canal anionique à cinétiques lentes a des chances d'être plutôt impliqué dans les voies de signalisation conduisant à la régulation du volume que dans le moteur de la régulation du volume cellulaire lui-même. De plus, la régulation par l'ABA du canal lent des cellules de garde n'a pas été retrouvée sur les cellules épidermiques de l'hypocotyle (résultat non montré). Cela signifie qu'il n'a pas la même fonction dans tous les types cellulaires. Il s'agit là d'un exemple de canal comme point de convergence de voies de signalisation différentes.

Une autre idée quand à la fonction du canal lent est qu'il puisse travailler en "tandem" avec la pompe à proton (Jean Guern, communication personnelle). Cette hypothèse a été récemment étayée dans le cas des cellules de garde (Roelfsema *et al.*, 2001). Il semble que la courbe courant voltage d'une cellule végétale soit dominée par deux conductances potassiques. La première est entrante et est responsable d'un fort courant à des potentiels inférieurs à -160 mV (figure II-7, cercles blanc). La seconde est sortante et est activée à des potentiels supérieurs à -50 mV (figure II-7, cercles gris). Entre ces deux potentiels d'activation le courant de la membrane est faible ce qui signifie que la somme des courants est presque nulle mais aussi que une modification faible de l'activité d'une conductance électrogène dans cette zone aura un fort impact sur le potentiel de la membrane. Parmi ces conductances, on trouve entre autre l'ATPase pompe à protons (figure II-7, carré) et les canaux anioniques que nous avons décrits dans ce chapitre. Parmi ceux ci intéressons nous au canal lent (figure II-7, losange). Les paramètres choisis sont tels que dans cette gamme de potentiel les deux conductances s'annulent. Toutefois, si l'une d'entre elle subit une faible variation le potentiel de membrane peut changer de façon importante. Par exemple, entre les figures II-7A et II-7B, où respectivement les potentiels de réversion sont de -150 et -90 mV, seule la conductance anionique lente a été augmentée de 15 %. Les intensités des courants de protons et d'anions sont peu affectées mais la conséquence de ces faibles changements est importante sur d'autres paramètres comme le potentiel de membrane: l'étude de signaux n'affectant que peu les conductances de membrane trouve sa justification. Par contre, il est difficilement imaginable que cette état puisse se

maintenir tel quel sans que la cellule se "vide" de ses anions. Il est toutefois probable que d'une part les systèmes de cotransports H^+/A^- contrebalancent ces deux conductances et d'autre part que ce mode de fonctionnement puisse correspondre à un état physiologique particulier de la cellule, c'est à dire occasionnel.

Cette proposition d'un rôle du canal lent dans la compensation des charges transportées par la pompe ATPase à protons peut constituer un mode de régulation du potentiel transmembranaire et/ou du pH extracellulaire. Cette hypothèse sera à l'avenir à confronter aux données expérimentales.

Chapitre III

**LES EFFLUX D'ANIONS: ETUDE DES
ACTIVITES DES CANAUX ANIONIQUES DES CELLULES
D'*ARABIDOPSIS THALIANA*
A TRAVERS UNE MESURE PLUS GLOBALE**

Chapitre III:
LES EFFLUX D'ANIONS: ETUDE DES
ACTIVITES DES CANAUX ANIONIQUES DES
CELLULES D'ARABIDOPSIS THALIANA
A TRAVERS UNE MESURE PLUS GLOBALE

A- Nécessité de développer des approches complémentaires à la technique du patch-clamp pour comprendre la fonction des canaux anioniques de la membrane plasmique

Notre but final est de connaître la fonction des canaux à l'échelle de la cellule ou de la plante. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la technique du patch-clamp a permis la caractérisation de deux canaux sur la membrane plasmique des cellules de l'hypocotyle et des cellules en suspension. Mais, malgré une connaissance de plus en plus complète de leurs activités et une liste de régulations ne cessant de croître (article n°4, tableau 1), il nous est actuellement difficile de leur attribuer une fonction intégrée. Le patch-clamp, quand il a pour ambition de répondre à cette question, n'est donc pas suffisant et doit s'accompagner d'approches complémentaires à un niveau cellulaire ou à l'échelle de la plante. Cette partie concerne donc la mise au point de nouvelles approches visant à impliquer les activités des canaux anioniques que nous avons décrits dans des phénomènes physiologiques plus complexes.

1- Un exemple de va-et-vient entre patch-clamp et développement de plantules. Limites d'une telle approche

Au laboratoire dans un premier temps a été développée une approche sur plantules visant à impliquer des canaux anioniques dans des phénomènes de développement sur la base de leur profil pharmacologique (Thomine *et al.*, 1997b). Ces résultats sont décrits dans l'introduction et ont permis de mettre en évidence l'existence d'une activité sensible à certains inhibiteurs de canaux anioniques, tels le DIDS et l'A9C dans la signalisation auxinique conduisant à l'inhibition de l'élongation de l'hypocotyle à l'obscurité. La question est ensuite de savoir quelle est la cible des inhibiteurs dans la signalisation de l'auxine. Est ce réellement un canal anionique? Si oui, lequel? Il est difficile de répondre à ces deux questions. Le DIDS est extrêmement spécifique du canal lent par rapport au canal rapide mais on sait qu'il interagit aussi avec des cibles distinctes des canaux anioniques, tel le canal SV (pour *Slow Vacuolor*) (Hedrich *et al.*, 1988). L'A9C est globalement inefficace sur les deux canaux. Le canal lent semble donc être un relativement bon candidat, d'autant plus qu'il est impliqué dans des phénomènes de régulation du volume dans les cellules de garde. Néanmoins

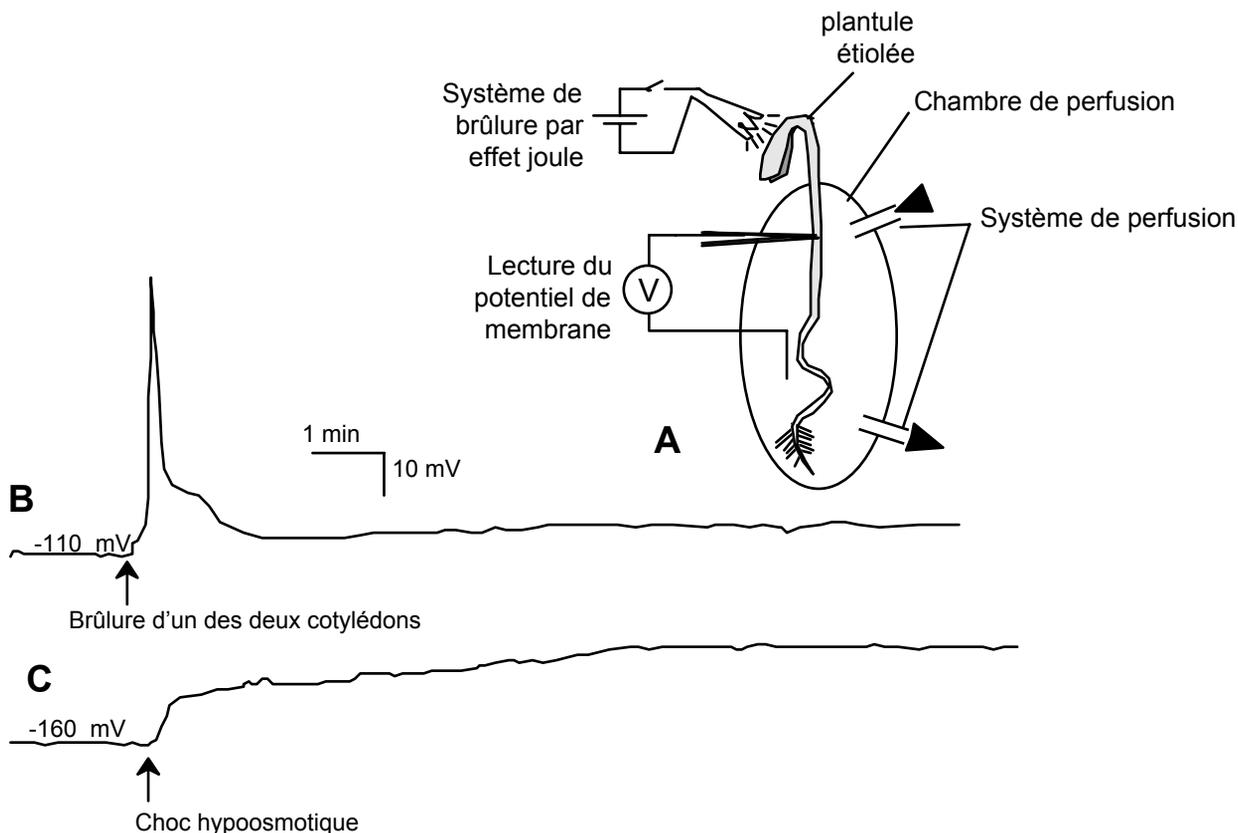


Figure III-1: Exemples de dépolarisation induite par une brûlure d'un des cotylédons et par un choc hypoosmotique. (A) Condition de l'expérience et circuit électrique. Solution de bain: 1 mM CaCl_2 , 1 mM KCl, 5 mM Mes/Tris (pH 6). (B) La brûlure d'un des deux cotylédons provoque, après un court temps de latence, une brusque dépolarisation de la membrane puis sa repolarisation plus ou moins totale. (C) Un choc hypoosmotique cause une dépolarisation de moyenne amplitude qui se maintient au cours du temps. Pour cela les plantules sont équilibrées dans le milieu standard dont l'osmolarité est ajustée à 200 mOsm avec du mannitol. Le choc hypo-osmotique est réalisé lors de la perfusion du bain standard.

Tableau III-1: Effets des différents signaux testés sur le potentiel de membrane des cellules de l'hypocotyle de plantules étiolées. Milieu sans anion: glutamine 4 mM - MgAcétate 2 mM - KH_2PO_4 + K_2HPO_4 2,5 mM - KOH 2,5 mM - Mes 1 mM - CaOH 1 mM - FeEDTA 50 mM - saccharose 10 g/L - malate (pH 6,1). Dans les autres cas le milieu de culture est de l'ABIS (composition figure A-6).

	Signaux	Effet	Eléments de caractérisation
Réponse propagée	Brûlure d'un des deux cotylédons	Dépolarisation rapide et réversible (de type Potentiel d'action)	Plantules carencées ou non en anions répondent de façon identique
Réponse non propagée	Choc hypoosmotique	Dépolarisation soutenue (réversible par un rinçage)	Pas de conclusion possible de l'utilisation du DIDS
	Vanadate	Dépolarisation soutenue (réversible par un rinçage)	Pas de conclusion possible de l'utilisation du DIDS

on ne peut exclure la participation d'autres canaux, par exemple sur le tonoplaste, ou même de protéine n'ayant aucun rapport avec des canaux.

En conclusion, cette série d'expériences a donné des pistes quant à l'implication potentielle de canaux anioniques dans la transduction du signal auxine et le développement de l'hypocotyle d'*Arabidopsis thaliana*. Mais les activités canal anionique étudiées en patch-clamp et le système plantule sont très éloignés, autant en terme de temps de réponse, de l'ordre de la minute dans le premier cas et de la semaine dans le second, que dans l'espace, une activité canal contre une réponse développementale complexe à l'échelle d'un organe pluri-tissulaire.

2- Des réponses à court terme à l'échelle de la cellule ou du tissu

Suite à ces premiers résultats, il est apparu important de mettre en place des approches à l'échelle cellulaire nous permettant de suivre des activités "proches" des canaux anioniques. La conséquence d'une activité de canaux anioniques sur la membrane plasmique peut être "lue" de plusieurs façons. Tout d'abord, une sortie de charges négatives provoque une dépolarisation de la membrane plasmique. La corrélation entre activation de canaux anioniques et dépolarisation a pu être faite dans plusieurs cas, comme lors de la réponse à la lumière bleue des cellules de l'hypocotyle (Cho *et al.*, 1996; Spalding *et al.*, 1992b), de la dépolarisation induite par l'auxine (Keller *et al.*, 1996) ou du potentiel d'action chez *Chara* (Kourie, 1994). Une autre possibilité consiste à mesurer la décompartmentation des anions, c'est à dire leur efflux. Cela a été possible par exemple dans le cas de réponses à la cryptogéine (Pugin *et al.*, 1997), à l'aluminium (Ma, 2000) ou au choc osmotique (Cazalé *et al.*, 1998). Il est possible aussi de mesurer des paramètres moins directs comme des modifications de volume cellulaire causées par une sortie de sel (Wang *et al.*, 1997) et tenter d'établir une corrélation avec les canaux anioniques.

Le suivi des potentiels de membrane sur les cellules de l'hypocotyle étioilé d'*Arabidopsis thaliana* empalées avec de fines électrodes (figure III-1A) a été réalisé au laboratoire par Armen Kurkdjian. Peu de signaux se sont révélés capables d'induire des dépolarisations (tableau III-1). Parmi les signaux efficaces, on trouve le vanadate, connu pour inhiber la pompe ATPase à protons ainsi que le choc hypoosmotique (figure III-1C). Un troisième signal testé est l'effet de la brûlure d'un cotylédon (figure III-1B). Les canaux anioniques de la membrane plasmique sont de bons candidats pour intervenir dans les dépolarisations, provoquées par un choc hypoosmotique ainsi que la phase de dépolarisation de la variation transitoire de potentiel induite par la brûlure d'un des deux cotylédons. L'utilisation des inhibiteurs de canaux anioniques tels le DIDS et l'acide niflumique n'a pas été très informatif car ils ont eux-mêmes tendance à dépolariser la membrane (alors qu'ils aurait dû l'hyperpolariser en inhibant une conductance anionique dépolarisante). En ce qui concerne la dépolarisation induite par une brûlure d'un des cotylédons, une collaboration est en cours avec Jean-Louis Julien (Clermont-Ferrand II) visant en particulier à caractériser la variation de potentiel propagée chez des plantes dont le contenu en anions est modifié par des conditions de cultures de carence en anions.

Une autre approche prometteuse consiste à mesurer des efflux à partir de cellules ou de tissus. En raison du potentiel de membrane des cellules végétales très éloigné du

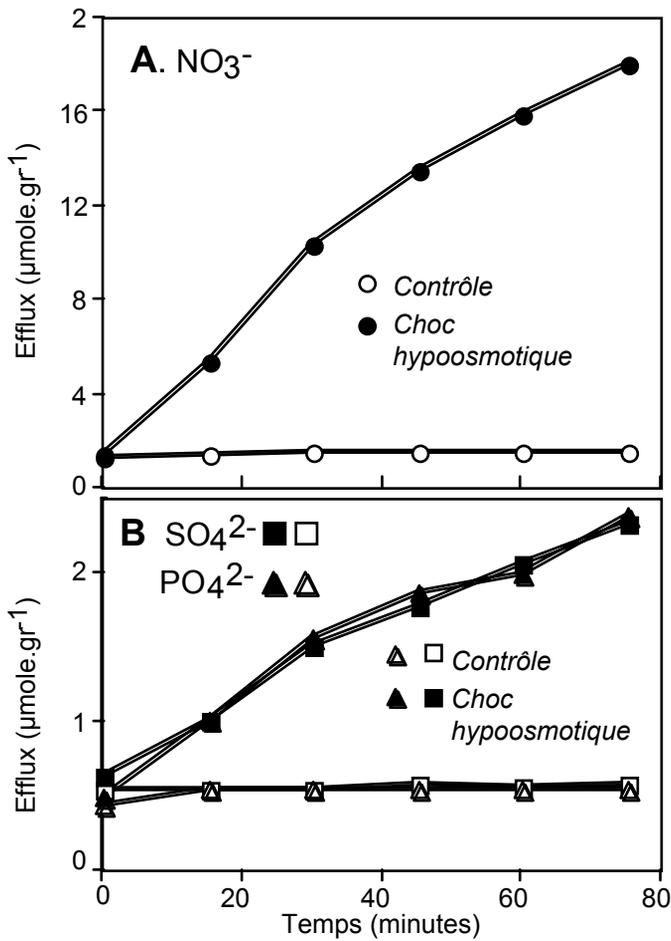


Figure III-2: Un choc hypoosmotique provoque des efflux d'anions. Les parties aériennes de plantules ayant passé 24 heures dans du milieu ABIS sans saccharose mais avec du mannitol de manière à obtenir une osmolarité de 200 mOsm, sont transférées soit dans un milieu d'efflux hypoosmotique à 30 mOsm (points noirs) soit dans un milieu isoosmotique (points blancs). Les ions présents dans les échantillons de milieu prélevés au cours du temps sont dosés par la technique d'électrophorèse capillaire. Les concentrations sont pondérées par le poids de matière fraîche des échantillons, et corrigées des volumes prélevés précédemment. (A) le nitrate, anion majoritaire dans les plantules, efflue fortement en réponse à un choc hypoosmotique. (B) D'autres anions quantitativement minoritaires dans les plantules effluent de la même façon: le sulfate (carrés) et le phosphate (triangles).

Tableau III-2: Résumé des différents signaux testés sur les efflux à partir des parties aériennes de jeunes plantules d' Arabidopsis thaliana. '-' pas d'effet. nd: non déterminé

Signaux	Effet	Elements de caractérisation
Choc hypoosmotique	Efflux de NO ₃ , SO ₄ et PO ₄	100 μM DIDS ou Nif sans effet
AIA 10 μM	-	n.d.
ABA 50 μM	-	n.d.
BR 2μM	-	n.d.
Choc hypoosmotique + AIA 10 μM	↑ Efflux de NO ₃ , SO ₄ et PO ₄ Pas de modulation dépendente des hormones ↓	n.d.
Choc hypoosmotique + ABA 50 μM		n.d.
Choc hypoosmotique + BR 2μM		n.d.

B- Premières expériences: efflux d'anions à partir des parties aériennes de plantules d'*Arabidopsis thaliana*

Le modèle que nous privilégions au laboratoire est l'hypocotyle d'*Arabidopsis thaliana* en relation avec le développement de la plantule. Pour tenter de faire le lien avec les canaux anioniques décrits par la technique du patch-clamp, l'idéal aurait été de mesurer des efflux à partir d'hypocotyles de plantules. Cette approche étant impossible pour des raisons de quantité de matériel, nous nous sommes intéressés aux parties aériennes de jeunes plantules et nous avons mis au point des mesures d'efflux (voir annexe B).

Aucun efflux n'est observé lorsque les plantules sont maintenues en condition témoins (figure III-2). Un signal assez efficace pour déclencher des efflux d'anions s'est révélé être le choc hypoosmotique à condition qu'il soit assez fort ($\Delta = 150$ mOsm). Plusieurs anions effluent (figure III-2) et les concentrations de nitrate, sulfate et phosphate dosées dans le milieu correspondent à une diminution au bout de 45 minutes respectivement de 12,9, 5,1 et 10,5 % des stocks intracellulaires (ce stocks étant respectivement de $104,5 \pm 2,0$ mM, $35,1 \pm 1,3$ mM et $17,7 \pm 10,8$ mM, $n=4$). Les inhibiteurs de canaux anioniques des cellules épidermiques comme le DIDS et l'acide niflumique ($100 \mu\text{M}$) se sont révélés inefficaces aux concentrations habituelles pour inhiber les efflux d'anions en réponse à ce choc osmotique.

Nous avons également testé l'effet de plusieurs hormones connues soit comme affectant le développement de l'hypocotyle, c'est-à-dire l'élongation cellulaire (AIA, BR), soit comme régulant des activités canal anionique (AIA, ABA) (tableau III-2). Dans notre système ces hormones n'ont pas été capables de déclencher des efflux d'anions significatifs. Nous avons ensuite combiné l'effet d'un choc hypoosmotique avec une pré-incubation hormonale. L'idée était de voir si ce traitement permettrait de "recruter" plus de canaux anioniques en réponse à un choc hypoosmotique. Cela ne semble pas être le cas.

Les parties aériennes de plantules sont un système permettant de caractériser des efflux en réponse au choc hypoosmotique. Il existe une cohérence entre ces intensités d'efflux et les courants mesurés en patch-clamp sur nos deux canaux (calculs non détaillés). Néanmoins la sélectivité de ces efflux est peu cohérente avec la perméabilité des deux canaux que nous avons caractérisés en utilisant la technique du patch-clamp. En particulier le phosphate efflue bien en réponse à un choc hypoosmotique mais est un anion imperméant dans nos deux canaux. En bref, nos deux canaux ne semblent pas être fortement impliqués dans ce phénomène d'efflux. Ceci est cohérent avec l'absence d'effet des inhibiteurs efficaces sur les activités caractérisées en patch-clamp et milite en faveur du recrutement d'un autre type de canal par le choc osmotique avec une perméabilité non négligeable pour le sulfate et le phosphate. Nous n'avons pas observé jusqu'à présent une telle activité sur la membrane plasmique des cellules épidermiques de l'hypocotyle en utilisant la technique du patch-clamp. Les bons candidats pourraient être les canaux activés par la tension de membrane: des conductances anioniques présentant cette caractéristique ont été décrites sur la membrane plasmique de protoplaste de cellules de garde de *Vicia faba* (Cosgrove *et al.*, 1991) et de cellules en culture de tabac (Falke *et al.*, 1988). A ce jour

potentiel d'équilibre thermodynamique des anions, l'ouverture d'un canal anionique provoque théoriquement un fort efflux facilement mesurable par un simple dosage dans le milieu externe. C'est ce qui est relaté dans la suite de ce chapitre.

3- Quels sont les outils à notre disposition provenant des observations de patch-clamp?

Le patch-clamp nous a permis de bien caractériser deux conductances anioniques qui divergent en de nombreux points de régulations. Chacun de ces points peut-être utilisé lors de la caractérisation des efflux déclenchés dans le même système.

Les inhibiteurs de canaux anioniques permettent de faire une comparaison entre les spectres de sensibilité du canal et ceux des réponses physiologiques intégrées étudiées. Il est nécessaire d'interpréter les résultats avec précaution, car ces molécules apparaissent souvent peu spécifiques des canaux anioniques et pourraient affecter, par exemple, des voies de signalisation en amont des dits canaux. Néanmoins, un inhibiteur très efficace sur un canal devrait être capable d'inhiber l'efflux d'anions causé par ce canal. En conclusion, les efflux d'anions provoqués par un signal actif doivent être sensibles à un large panel d'inhibiteurs ayant dans certain cas des effets attendus au niveau du canal, dans d'autres des effets peu spécifiques.

La sélectivité des canaux anioniques est aussi une caractéristique très discriminante. Nous avons vu qu'il existe des anions physiologiques ne passant que dans un type de canal: c'est le cas par exemple du sulfate dans le canal rapide. D'autre part, il existe des anions relativement imperméants, comme les anions organiques. La technique d'électrophorèse capillaire nous permet de suivre un grand nombre d'anions capables d'effluer en réponse à un signal donné et devrait nous donner des indications quand aux canaux impliqués dans l'efflux à travers leur perméabilité.

D'autres caractéristiques décrites en patch-clamp peuvent aussi être utilisées pour faire un va-et-vient entre les activités décrites et les réponses d'efflux. C'est le cas, par exemple, de la sensibilité au pH externe -qui est opposée dans le cas des deux canaux anioniques des cellules épidermiques (article n°4)- ou de la régulation de la fermeture du canal à cinétiques rapides en réponse au voltage par la concentration en chlorure externe dans le milieu.

nous n'avons pas recherché systématiquement de telles activités sur les cellules épidermiques.

Tableau III-3: Effets des signaux testés sur les cellules en culture sur les efflux de nitrate. '0' pas d'effet, '+' à '+++' de faible à fort efflux. (1) Xylanase de *Trichoderma viride* (Nühse *et al.*, 2000) (2) Hexa-N-acetylchitohexaose (Nühse *et al.*, 2000).

	Signaux	Efflux de Nitrate
	Contrôle	0
Eliciteurs de réactions de défense	Pectolyase 10 µg/mL	+++
	XT ⁽¹⁾ 10 µg/mL	0
	HNA ⁽²⁾ 0,5 µM	0
	Flagelline 22 50 nM	+++
	Oligogalacturonide 20 µg/mL	0
	Cryptogéine 50 nM	0
	Hydrolysats de chitine 20 µg/mL	+
Sels	NH ₄ Cl 10 mM	0
	K ₂ SO ₄ 10 mM	0
	NaCl 10 mM	0
	Acide malique 25 mM	0
	AlCl ₃ 0,1 mM	+
	KGlutamate 1 mM	0
	Vanadate 2 mM	0
Hormones	AIA 10 µM	0
	Glucose	0
	ABA 10 µM	0
	BR 2 µM	0
	Acide gibberellique 3 10 µM	0
	Etephon (producteur d'éthylène) 10 µM	0
Autres	H ₂ O ₂ 10 µM	0
	Choc froid (4 °C)	0
	Choc hypoosmotique (² 150 mOsm)	++

C- Utilisation des cellules en culture pour rechercher des signaux activant les canaux anioniques de la membrane plasmique

Les cellules en culture sont apparues comme une alternative aux parties aériennes de jeunes plantules. L'un de leurs principaux avantages est qu'il s'agit d'un système beaucoup plus homogène que les parties aériennes qui sont encore constituées de plusieurs tissus et donc probablement de plusieurs populations de cellules équipées différemment en canaux ioniques. Elles ont de plus l'avantage d'être techniquement très facilement utilisables pour une expérience d'efflux: il suffit pour cela de mettre à équilibrer une culture de 3 ou 4 jours pendant quelques heures sur un milieu minimum puis de répartir des cultures en autant de piluliers que de condition à tester.

Le système cellules en suspension est donc pratique lors de la recherche de signaux capable de déclencher des efflux.

1- Recherche d'effecteurs capables d'induire des efflux de nitrate

Nous nous sommes intéressés à plusieurs types de signaux potentiellement capables de déclencher des efflux:

- des sels, certains sont générateurs de stress ($AlCl_3$, $NaCl$). L'aluminium est de plus un activateur de canaux anioniques (Ryan *et al.*, 1995). Le sulfate étant un activateur du canal anionique à cinétiques rapides (article n°1), nous avons voulu voir s'il était capable d'induire des efflux de nitrate. L'ammonium est une forme d'azote plus réduite que le nitrate. On peut imaginer qu'il est préférentiellement prélevé dans le milieu et que dans certain cas, le nitrate, moins précieux pour la cellule, est relargué dans le milieu. Enfin, l'anion chlorure de ces différents sels a un effet décalant sur le potentiel d'activation de certains canaux, en particulier les canaux de type rapide (article n°2 et Dietrich *et al.* 1998), on peut donc espérer qu'il provoque des efflux d'anions, comme cela a déjà été observé dans le cas des cellules en culture de tabac (Frachisse, communication personnelle)

- des éliciteurs, ayant été décrits comme nous l'avons vu dans l'introduction, pour provoquer des efflux d'anions.

- des hormones parmi lesquelles certaines sont connues comme interagissant avec des canaux anioniques (auxine et acide abscissique) et d'autres intervenant dans la régulation du volume cellulaire.

- des stress auxquels sont couramment soumises les cellules végétales, comme des chocs thermiques ou des chocs osmotiques.

Le tableau III-3 résume les résultats obtenus sur les efflux de nitrate dosés par la technique colorimétrique de la nitrate réductase. En bref, peu de signaux sélectionnés ont été capables de déclencher la réponse qui nous intéresse. C'est le cas de la pectolyase, de la flagelline 22 et de l'hydrolysate de chitine (figure III-3A, B et C). Comme dans le cas des efflux obtenus sur les parties aériennes, un choc hypoosmotique est efficace sur les cellules en culture (figure III-3D).

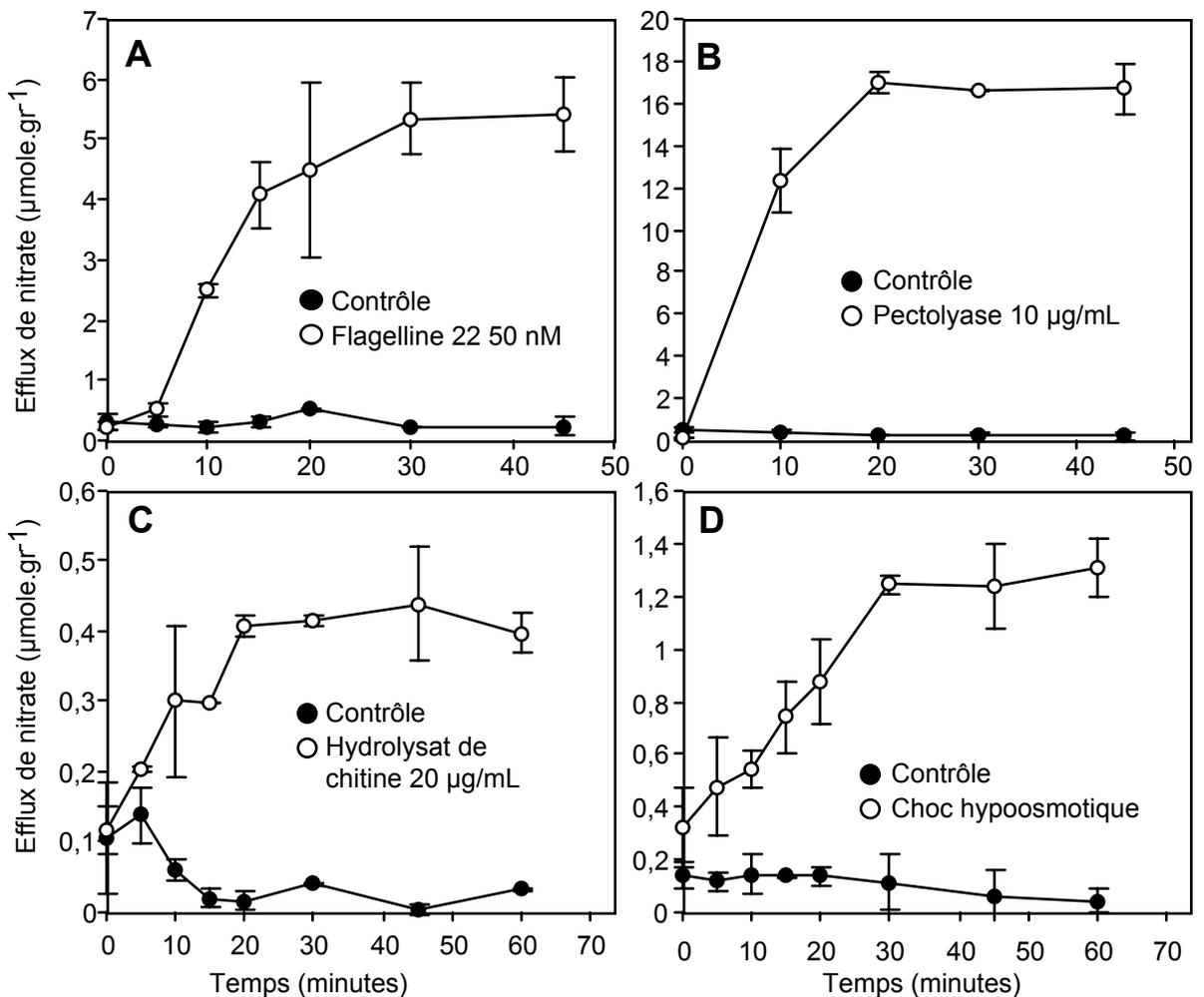


Figure III-3: Exemples d'efflux de nitrate déclenchés à partir des cellules en suspension par la flagelline 22 (A), la pectolyase (B), l'hydrolysat de chitine (C) et un choc hypoosmotique (D). Le choc hypoosmotique est réalisé en équilibrant les cellules dans un milieu de forte osmolarité (0,5 mM CaCl₂, 1 mM Mes, 200 mOsm ajusté avec du mannitol) pendant 3 heures et déclenché en retournant dans le milieu d'efflux (osmolarité de l'ordre de 50 mOsm). Remarquez la grande différence dans l'intensité des efflux selon les signaux.

L'aluminium semble lui aussi capable d'induire un efflux de nitrate mais de façon peu reproductible (résultat non montré). Cette effet, s'il est confirmé, est intéressant dans la mesure où il a été jusqu'à présent décrit principalement chez les monocotylédones.

2- Les deux canaux anioniques caractérisés en patch-clamp sont-ils impliqués dans les efflux à partir des cellules en culture?

La question que nous nous posons, est de savoir si l'un des canaux que nous avons caractérisés par la technique du patch-clamp est responsable de certains efflux obtenus à partir du même système cellulaire. Pour tenter d'y répondre, dans un premier temps, nous nous sommes attachés à trouver des points communs entre efflux et canaux de la membrane plasmique. On peut pour cela utiliser plusieurs éléments de caractérisation, tout d'abord la pharmacologie des canaux, relativement bien connue à ce jour. De plus nous avons mis en évidence des caractéristiques de sélectivité et de régulation tout à fait divergentes entre les canaux anioniques lent et rapide (article n°4 table 1).

Nous nous sommes intéressés à quatre des signaux capables d'induire des efflux significatifs de nitrate à partir des cellules en suspension: la flagelline 22, la pectolyase, la chitine et le choc hypoosmotique (figure III-3).

La flagelline 22 (fl22) est un peptide provenant d'une zone conservée de la protéine flagelline de *Pseudomonas syringae* (Felix *et al.*, 1999), qui intervient, comme son nom l'indique, dans la formation des flagelles. Dans les cellules en culture de tomate (Felix *et al.*, 1999) et chez certains écotypes d'*Arabidopsis thaliana* (Gomez-Gomez *et al.*, 1999), elle induit à très faible concentration (de l'ordre de 1 nM) des réactions de défenses telles qu'un burst oxydatif, une alcalinisation du milieu probablement due à l'inhibition de la pompe ATPase à protons ainsi que l'expression de protéines PR (*Pathogenesis Related*). Le récepteur de la flagelline 22 a été cloné chez *Arabidopsis thaliana* par une approche de génétique classique (Gomez-Gomez *et al.*, 2000): il s'agit d'une protéine LRR (pour *Leucine-Rich Repeat*) fixant avec une forte affinité le peptide Fl22 (Meindl *et al.*, 2000), et présentant, en plus du domaine LRR, un domaine transmembranaire et un domaine kinase cytosolique activant la cascade de signalisation (Gomez-Gomez *et al.*, 2001). Les auteurs de ces études travaillent actuellement sur la cascade de signalisation de la flagellin22 et ont montré l'implication de la MAP Kinase AtMAPK6 (Nühse *et al.*, 2000).

La chitine est un polymère (β 1-4) de N-acetylglucosamine que l'on trouve dans l'exosquelette des arthropodes et dans la paroi de certains champignons. Lors d'une attaque par des pathogènes, des chitinases de la plante la dégradent (Collinge *et al.*, 1993) et le produit de cette dégradation a un rôle éliciteur (Boller, 1987). Nous avons utilisé le produit de la dégradation acide de la chitine de crabe aimablement fournie par Jürg Felix.

La pectolyase est une enzyme du champignon *Aspergillus japonicus* capable d'éliciter des réponses de défense (Rouet-Mayer *et al.*, 1997) par une voie de phosphorylation (Mathieu *et al.*, 1996) dépendante du calcium et d'induire des efflux de chlorure (Zimmermann *et al.*, 1998a).

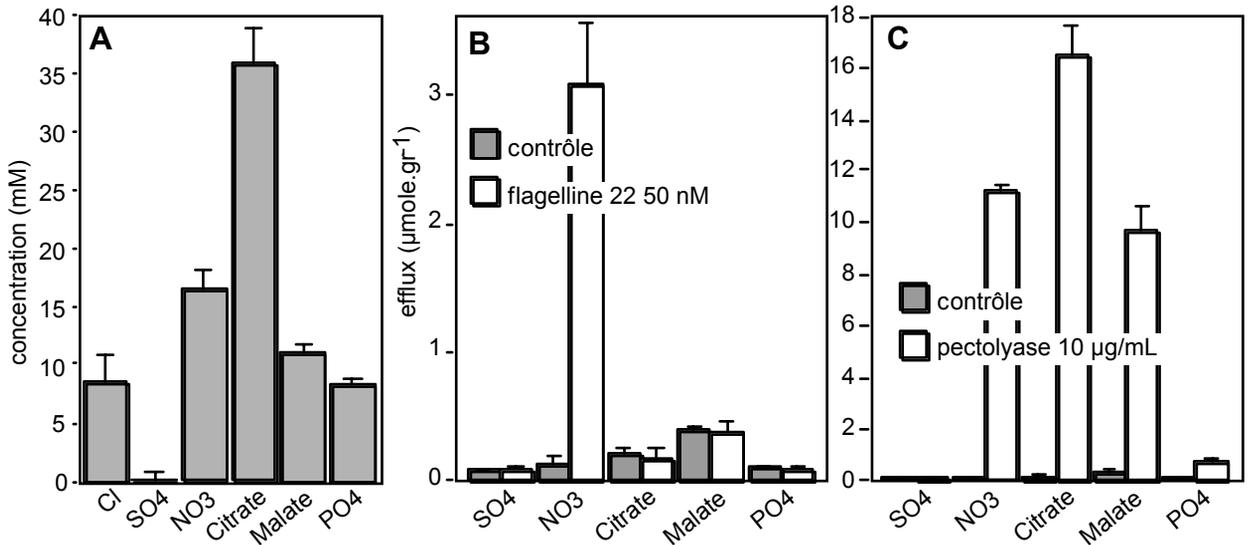


Figure III-4: Contenu en anions des cellules en suspension (A) et sélectivité des efflux déclenchés par la flagelline 22 (B) et la pectolyase (C). (A) Dosage du contenu anionique. Les cellules ensemencées à 30 % ont poussé pendant 3 ou 4 jours dans du milieu JPL (voir composition en annexe). L'extraction des anions se fait par une série de 5 congélations-décongélations, puis une dilution et une filtration. Le dosage est obtenu grâce à l'électrophorèse capillaire. (B & C) Dosage par la technique d'électrophorèse microcapillaire des anions présents dans le milieu d'efflux au bout de 60 minutes d'efflux en réponse à 50 nM flagelline 22 (B) et 10 μg/mL pectolyase (C).

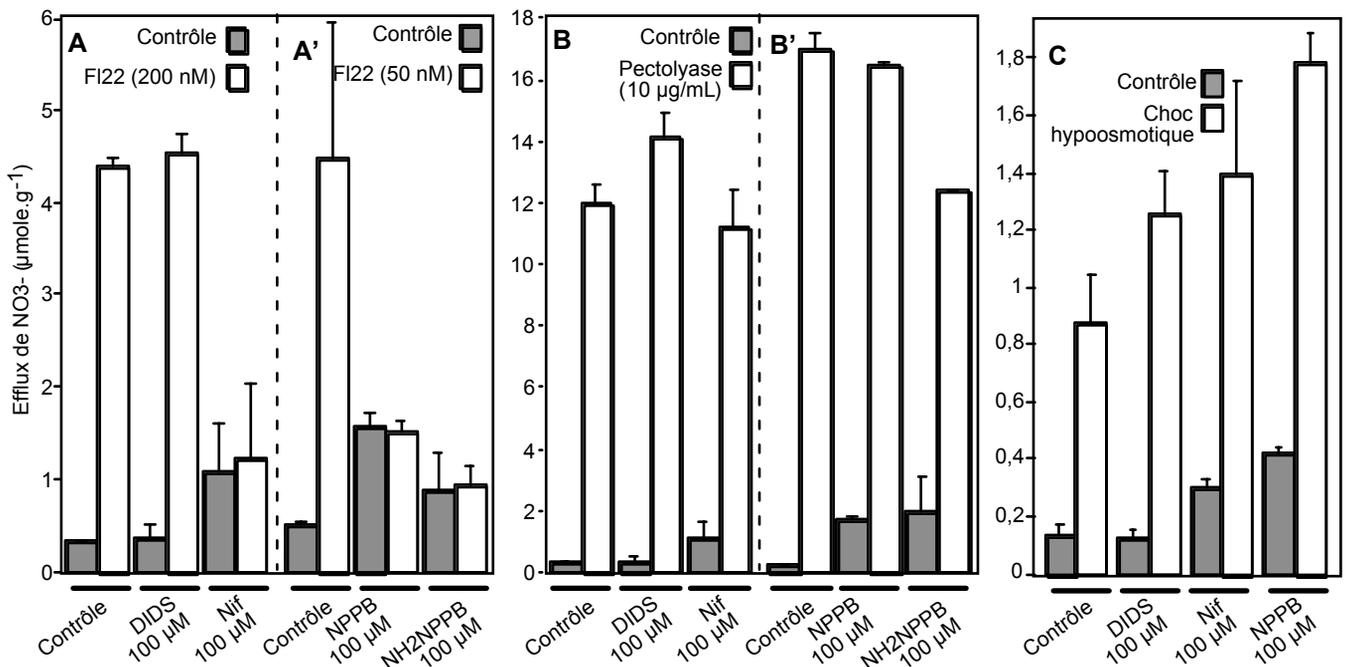


Figure III-5: Effet des inhibiteurs sur l'efflux de nitrate déclenché par la flagelline 22, la pectolyase et un choc hypoosmotique. (A) Effet du DIDS et de l'acide niflumique (Nif) sur l'efflux provoqué par 200 nM de flagelline 22 (FI22). Une expérience significative parmi 3. (A') Effet du NPPB et du NH₂-NPPB sur l'efflux déclenché par 50 nM de flagelline 22. (B) Effet du DIDS et de l'acide niflumique (nif) sur l'efflux provoqué par 10 μg/mL de pectolyase. (B') Effet du NPPB et du NH₂-NPPB sur l'efflux provoqué par 10 μg/mL de pectolyase. (C) Effet du DIDS, de l'acide niflumique et du NPPB sur les efflux déclenchés par un choc osmotique. Dans tous les cas, l'inhibiteur est ajouté 10 minutes avant le signal et l'efflux présenté est obtenu après 20 (A, A', B & C) ou 23 minutes (B'). Le dosage est effectué par la technique colorimétrique et la valeur obtenue est rapportée au poids frais.

La figure III-3 montre les efflux de nitrate obtenus avec ces quatre signaux. Il divergent significativement dans leurs intensités et dans leurs cinétiques. Par exemple, la pectolyase provoque un efflux de l'ordre de 70 % du stock cellulaire de nitrate alors que la chitine, moins de 5 %. Le choc hypoosmotique semble avoir un effet très rapide sur la sortie du nitrate (résultat non montré), on observe un délai de quelques minutes avec la flagelline 22. Celui-ci s'explique par l'existence d'une voie de signalisation plus longue conduisant à l'ouverture des canaux.

a- Sélectivité des efflux: une limite des cellules en suspension

Un point de caractérisation très informatif est l'évaluation de la sélectivité des efflux. Techniquement cela consiste à mesurer les anions effluant en réponse aux signaux. Le diagramme de la figure III-4A présente les concentrations internes moyennes dosées lors de plusieurs expériences par la technique de l'électrophorèse capillaire. Par comparaison à ce que l'on observait dans les plantules d'*Arabidopsis* (article n°1, figure 2), on remarque d'une part une forte accumulation d'anions organiques (malate et citrate) alors que les anions inorganiques sont moins accumulés, et d'autre part le très faible niveau de sulfate ($0,42 \pm 0,47$ mM, n=6).

Les figures III-4B et C donnent une idée des anions effluant en réponse à la pectolyase et la flagelline 22. Avec le premier, tous les anions effluent en grande proportion. La flagelline 22 induit des efflux modérés de nitrate uniquement. La sélectivité des deux canaux mis en jeu est donc très différente. Dans le cas du sulfate, anion très discriminant (article n°1), l'absence d'efflux n'est pas informatif car ces cellules en suspension ne l'accumulent pas (figure III-4A).

b- Effet des inhibiteurs de canaux anioniques

Les inhibiteurs de canaux anioniques devraient nous permettre d'aller plus loin dans la caractérisation des canaux anioniques mis en jeu lors des efflux déclenchés. Nous avons testé selon les cas plusieurs inhibiteurs à la concentration de 100 μ M nous permettant une discrimination entre les deux canaux anioniques décrits par la technique du patch-clamp. Les efflux induit par la chitine étant très faible, il n'a pas été possible d'évaluer l'effet des différentes molécules.

La figure III-5 montre l'effet de certains inhibiteurs sur l'efflux de nitrate déclenché par la flagelline 22 (A), la pectolyase (B) et le choc hypoosmotique (C). Les deux derniers ne sont pas modulés par les inhibiteurs que nous avons testés. Par contre, les efflux déclenchés par la flagelline 22 peuvent être spécifiquement réduits par l'acide niflumique le NPPB et le NH₂-NPPB à des concentrations de 100 μ M. Par contre le DIDS n'a aucun effet.

c- Régulation des efflux par le pH et les anions externes

Nous avons vu (article n°4) que le pH externe modulait de façon différente les deux canaux anioniques: le canal rapide est inhibé par une alcalinisation alors que le canal de type lent est activé. De plus, les anions externes modulent le canal à cinétiques rapides mais n'affecte pas celui à cinétiques lentes. Dans l'idée d'accumuler des corrélations positives entre efflux et activités de canaux en patch-clamp, nous

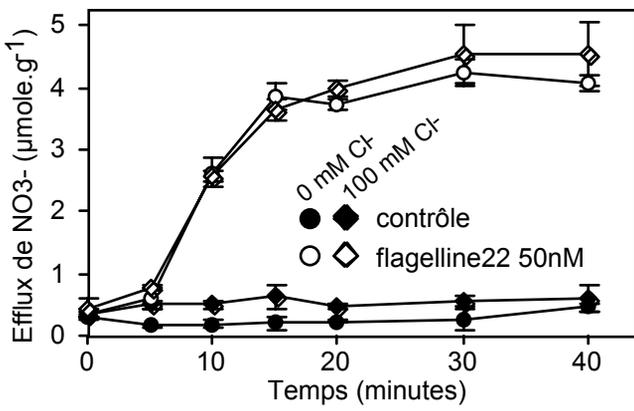


Figure III-6: Effet du chlorure externe sur l'efflux de nitrate déclenché par la flagelline 22. L'anion chlorure est ajouté sous forme de ClCholine en prétraitement 10 minutes avant le déclenchement de l'efflux par la flagelline (50 nM). Le dosage est effectué par colorimétrie.

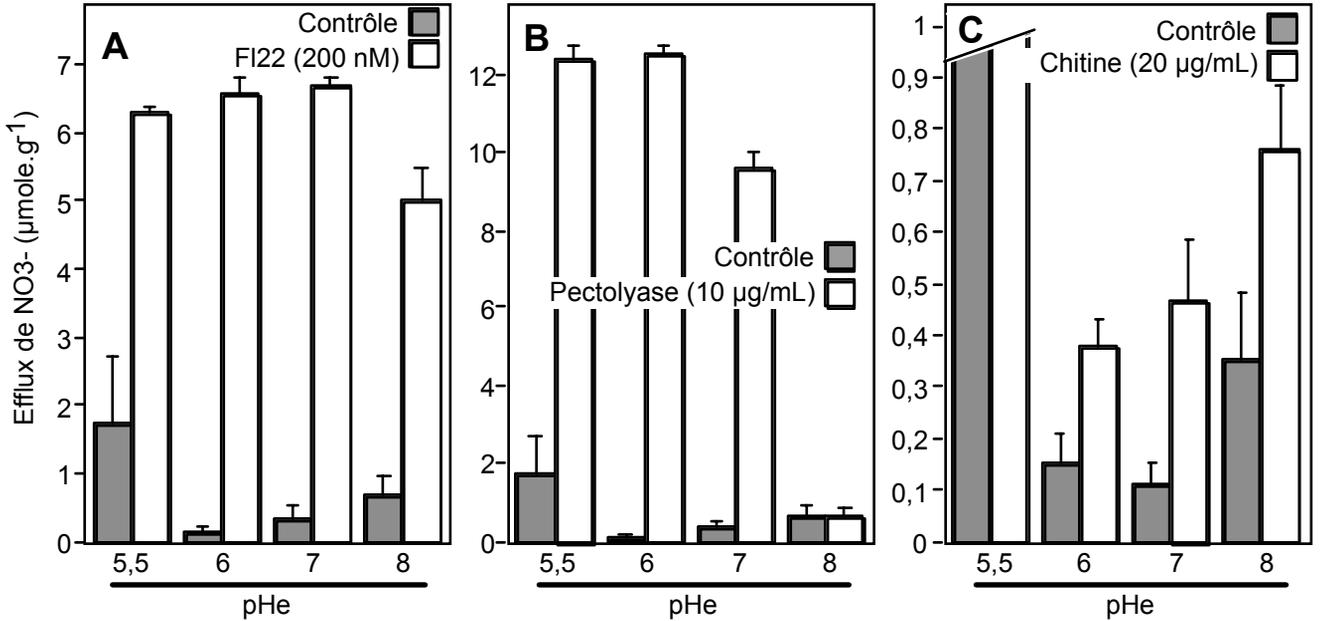


Figure III-7: Effet du pH extracellulaire sur l'intensité des efflux de nitrate déclenchés par la flagelline 22 (A) la pectolyase (B) et l'hydrolysat de chitine (C). Le pHe désiré est obtenu en mélangeant du Mes et du Tris de manière à obtenir une concentration totale finale de 50 mM. Les cellules en suspension sont équilibrées 10 minutes avant le déclenchement des efflux par 200 nM flagelline 22 (FI22), 10 µg/mL pectolyase et 20 µg/mL d'hydrolysat de chitine de Crabe. Le dosage colorimétrique présenté ici est effectué 30 minutes après le déclenchement des efflux.

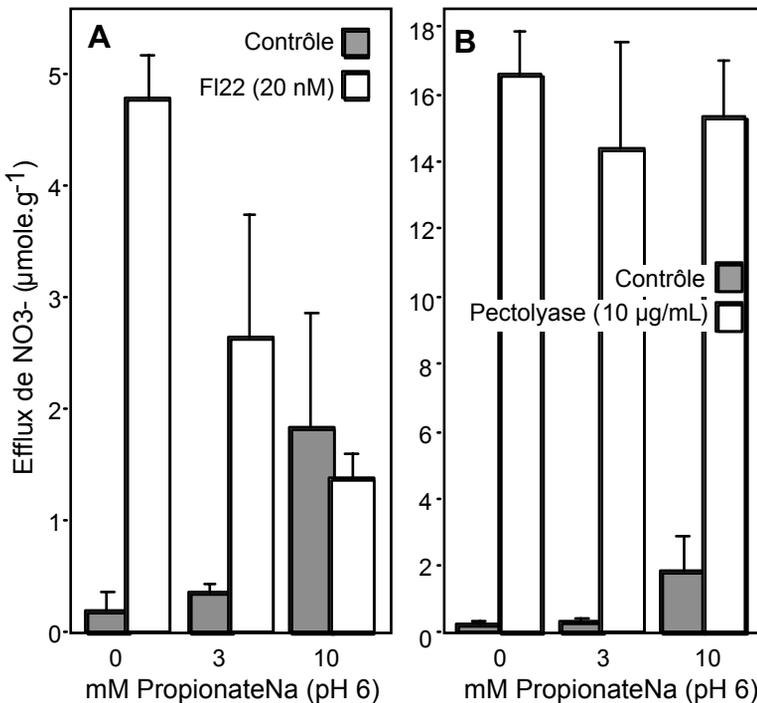


Figure III-8: Effet du pH cytosolique sur les efflux déclenchés par la flagelline 22 (A) et la pectolyase (B). Le propionate de sodium (1 M Propionate - NaOH (pH 6)) est ajouté en prétraitement 10 minutes avant le déclenchement des efflux par la flagelline 22 (20 nM) et la pectolyase (10 µg/mL). Le dosage colorimétrique est effectué 45 minutes après le déclenchement des efflux.

avons évalué l'effet de la modification du pH externe et de la teneur en anion externe sur les efflux d'anions.

Les anions externes ont été testés par l'apport de chlorure de choline dans le bain 10 minutes avant le déclenchement des efflux par la flagelline 22 (figure III-6). 100 mM Cl⁻ dans la solution d'efflux n'a pas d'effet inducteur et ne semble pas modifier significativement l'efflux de nitrate en réponse à la flagelline 22.

L'histogramme III-7 illustre l'effet d'une gamme de pH extracellulaire de 5,5 à 8 sur les efflux de nitrate induits par 3 signaux. L'efflux induit par la flagelline 22 est peu dépendant de ce paramètre: la réduction maximum a lieu à pHe 8 et n'atteint que 20 %. Par contre, l'efflux induit par la pectolyase est très sensible au pH et est complètement aboli à pHe 8. Ceci milite en faveur d'une régulation du canal par le pH mais peut aussi vouloir dire que la voie de signalisation de la pectolyase est stoppé. Un artefact possible est aussi que l'activité de l'enzyme soit impossible à des pHe si alcalins et qu'en conséquence, l'élicitation n'ait pas lieu. En ce qui concerne l'hydrolysate de chitine que nous avons testé, la variation des flux est trop faible pour être vraiment indicatrice. Néanmoins l'efflux de nitrate dépendant de la chitine apparaît toujours significatif à pHe 8, ce qui semble indiquer une sensibilité faible au pH externe.

L'effet du pH interne à lui aussi été testé sur les efflux déclenchés par la flagelline 22 et la pectolyase. Une charge acide produite par 3 et 10 mM de propionate de sodium (figure III-8), correspondrait à une acidification du cytoplasme de l'ordre de 0,2 et 0,6 unité de pH (pHe 6; pK_a_{propionate} 4,87; (Mathieu *et al.*, 1996)). L'effet est drastique sur l'efflux induit par la flagelline 22 puisque dès 3 mM de propionate, on observe une réduction de l'ordre de 50 %. Par contre, l'efflux déclenché par la pectolyase est inchangé dans cette gamme de concentration. Cela semble indiquer que les canaux mis en jeu par la flagelline 22 sont recrutés par alcalinisation interne alors que ceux recrutés par la pectolyase sont globalement insensibles au pH interne.

3- Discussion

Le tableau III-4 est un récapitulatif des caractéristiques des efflux obtenus en réponse aux différents signaux que nous avons testés. Plusieurs canaux semblent intervenir dans les quatre réponses. En effet, ces réponses présentent des caractéristiques différentes, en particulier de perméation et de sensibilité aux inhibiteurs. Le canal intervenant en réponse à la flagelline 22 est principalement perméable au nitrate alors que celui activé par la pectolyase laisse aussi passer d'autres anions comme le phosphate et certains anions organiques (figure III-4). Il en est probablement de même pour le canal activé par choc osmotique s'il est comparable à celui déclenché par choc hypoosmotique sur les parties aériennes de plantules (figure III-2). Les inhibiteurs usuels de canaux anioniques permettent aussi de distinguer des signaux déclenchant des efflux pouvant être inhibés, c'est le cas de la flagelline 22, de ceux dont les efflux semblent insensibles, c'est le cas de la pectolyase et du choc hypoosmotique.

Deux grandes populations de canaux semblent donc intervenir dans les efflux en réponse aux 4 inhibiteurs basés sur des propriétés de perméation et de profil pharmacologique (tableau III-4). Sur la base de ces caractéristiques, on peut proposer

EFFLUX DES CELLULES en SUSPENSION

PATCH CLAMP

		Flagelline 22	Pectolyase	Hydrolisat de chitine	Choc hypo-osmotique	Canal rapide	Canal lent
Sélectivité	Cl	nd	nd	nd	nd	+	+
	NO ₃	++	+++	+	+	++	+++
	SO ₄	nd	nd	nd	nd	++	0
	PO ₄	0	+	nd	nd	0	0
	Malate	0	+	nd	nd	0	0
	Citrate	0	+	nd	nd	nd	0
Pharmacologie	DIDS	0	0	nd	0	0	---
	Nif	---	0	nd	0	--	-
	NPPB	---	0	nd	0	--	-
	NH ₂ NPPB	---	0	nd	0	0	nd
Effet du chlorure externe		0	nd	nd	nd	++	0
Effet d'une alcalinisation externe		0	--	nd	nd	--	++
Effet d'une acidification interne		--	0	0 ?	nd	0	+

Tableau III-4: Récapitulation des résultats obtenus pour les efflux à partir des cellules en suspension et comparaison avec les caractéristiques des canaux anioniques lent et rapide décrits en utilisant la technique du patch-clamp. Perméation: '0' non, '+' à '+++' un peu à très perméant. Autre: '0' pas d'effet, '-' à '---' un peu à très inhibiteur, '+' à '+++' un peu à très activateur. 'nd' non déterminé. '?' à confirmer. Les résultats de patch-clamp ont principalement été obtenus à partir de protoplastes de cellules de l'hypocotyle.

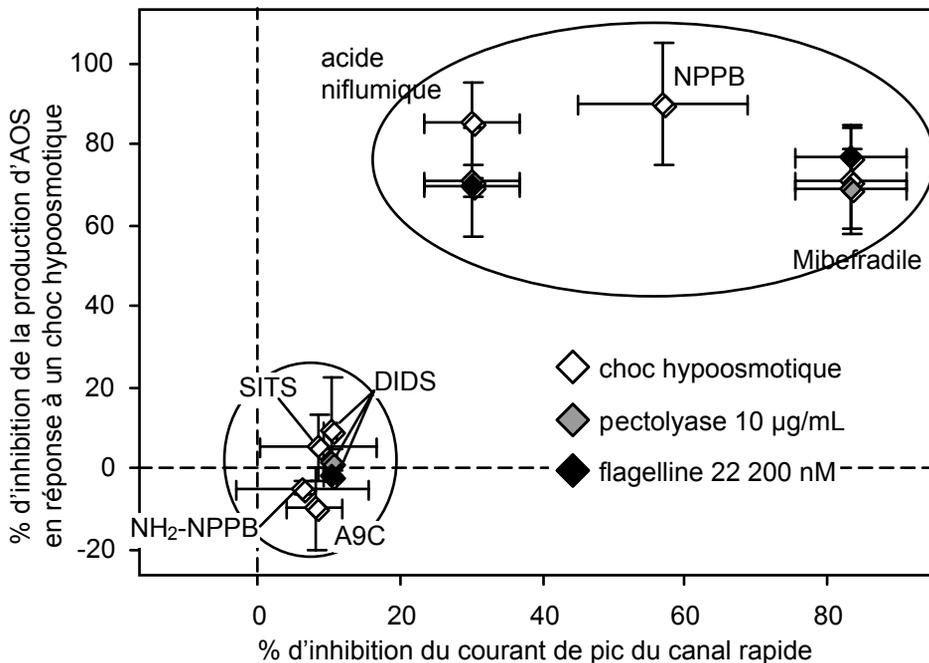


Figure III-9: Corrélation entre les profils pharmacologiques du canal rapide et de la production de formes activées d'oxygène (AOS) provoquée par un choc hypoosmotique, la pectolyase et la flagelline. Les inhibiteurs sont utilisés à des concentrations de 100 µM. La production d'AOS est mesurée par dosage colorimétrique de l'oxydation de l'épinéphrine (Nicolas Agier et Yves Mathieu, communication personnelle). On distingue deux groupes d'inhibiteurs, l'un actif sur les deux paramètres considérés, l'autre inactif sur ces mêmes paramètres (cercles).

qu'il existe sur la membrane plasmique des cellules en culture au moins un troisième canal anionique peu sélectif et peu sensible aux inhibiteurs testés, rendant compte des efflux déclenchés par la pectolyase et le choc osmotique.

Le tableau III-4 met également en parallèle les caractéristiques des efflux avec celles décrites en patch-clamp pour les deux canaux anioniques de la membrane plasmique. Sur la base de perméation et de la sensibilité aux inhibiteurs, le canal rapide est un bon candidat pour être activé en réponse à la flagelline 22, malgré l'effet du NH₂-NPPB, inhibiteur habituellement inefficace sur le canal rapide. Le DIDS, habituellement associé au canal lent, n'inhibe pas l'efflux en réponse à la flagelline 22.

Il est malheureux que le sulfate ne soit pas plus accumulé dans cette souche de cellule en suspension, car il serait assez informatif. Une des expériences clef à réaliser à court terme sera de réévaluer la perméation du sulfate dans un système cellulaire qui en accumule.

Les effets de la concentration en chlorure externe et des pH externe et interne n'a pas permis d'accumuler beaucoup plus de corrélation ou plutôt des corrélations négatives entre activité obtenues en patch-clamp et efflux de nitrate déclenché. On peut toujours argumenter que les conditions de patch-clamp sont sûrement très éloignées de celles au voisinage de la membrane lors des expériences d'efflux.

Au laboratoire, plusieurs personnes s'intéressent aux réponses précoces des cellules végétales au choc osmotique. Un choc hypoosmotique sur des cellules en suspension d'*Arabidopsis thaliana* provoque un burst oxydatif, c'est à dire une production de forme activé d'oxygène qu'il est facile de suivre par l'oxydation de l'épinéphrine (Yves Mathieu, communication personnelle). Pour essayer d'identifier les étapes de transduction du signal en amont de cette réponse, ils ont utilisé les inhibiteurs de canaux anioniques. La figure III-9 montre qu'il existe une corrélation entre le profil d'inhibition du canal rapide et celui du burst oxydatif en réponse au choc hypoosmotique, à la flagelline 22 et à la pectolyase. Il est donc possible que le canal rapide soit en amont de la production de formes activées d'oxygène. Ceci est en désaccord avec les résultats obtenus pour les efflux, en particulier pour la pectolyase et le choc osmotique: sur la base des caractéristiques pharmacologiques et de perméation, il est possible que pectolyase et choc hypoosmotique activent deux canaux anioniques différents, le premier de type rapide et impliqué dans la signalisation précoce et le second responsable des efflux massifs d'anions (figure III-10).

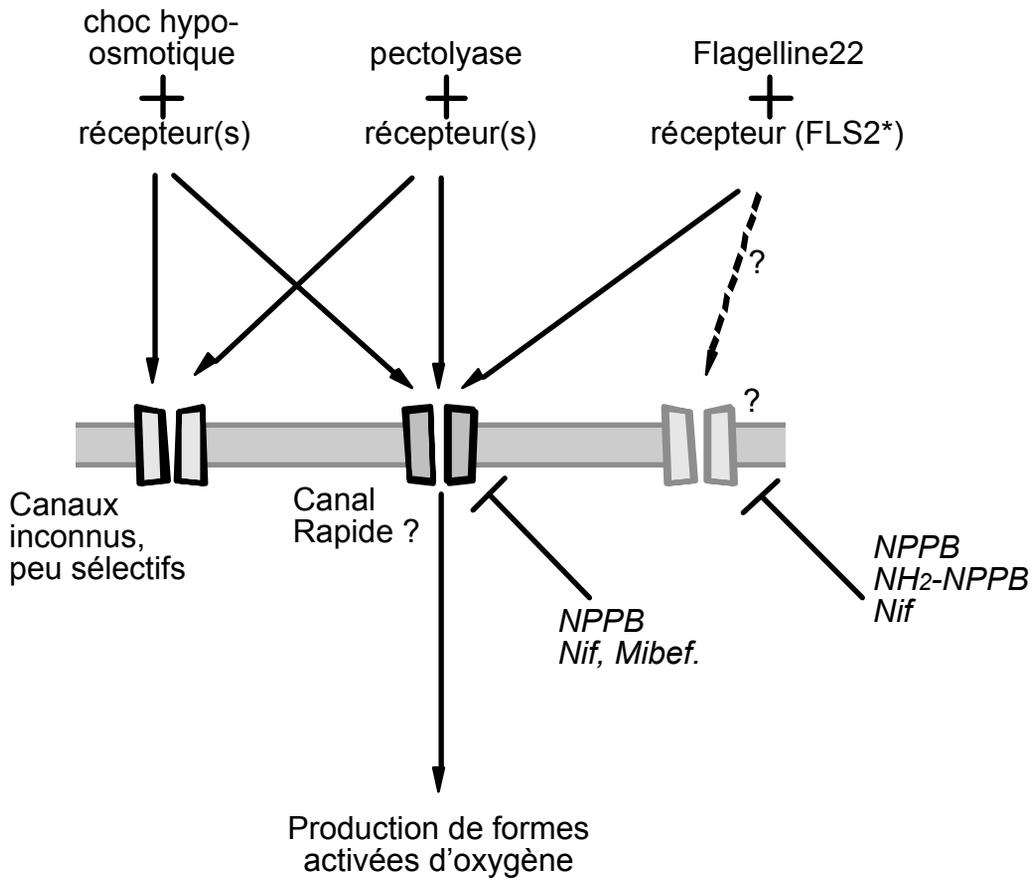


Figure III-10: Le canal anionique rapide pourrait être un élément important de la transduction du signal conduisant au burst oxydatif. Les efflux d'anions pourraient être possibles grâce à l'activation d'autres canaux anioniques. *Gomez-Gomez et al. 2000

D- Pour aller plus loin : premiers pas vers une activité déclenchée et observée en patch-clamp

L'idéal serait bien sûr d'observer directement la régulation d'un canal anionique par un signal, en utilisant la technique du patch-clamp. Il existe peu de description de telles approches réussies dans la littérature. Après plusieurs années de tâtonnement, plusieurs équipes ont montré que le canal lent des cellules de garde de *Vicia faba* (Li *et al.*, 2000; Schwarz *et al.*, 1998) et d'*Arabidopsis thaliana* (Pei *et al.*, 1997) était régulé par l'acide abscissique. Plus récemment, l'aluminium a été démontré activant des canaux des cellules de la racine de maïs et de blé. Dans chacun des deux cas le signal est appliqué avant l'investigation en patch-clamp. Celle-ci est utilisée pour révéler l'activité. La configuration cellule attachée a aussi permis de tels travaux. Par exemple la lumière (Cho *et al.*, 1996; Elzenga *et al.*, 1997a) et l'auxine (Philippar *et al.*, 1999) activent respectivement des canaux anioniques et des canaux potassiques de la membrane plasmique.

Le principal problème lors de telles approches est de maintenir les voies de signalisation suffisamment intègres. La production des protoplastes, c'est à dire la libération des cellules végétales de leur paroi pectocellulosique fait appel à des traitements forts, tels des digestions enzymatiques et parfois un choc hypoosmotique. Ils sont générateurs de stress, élicitent déjà probablement certaines réponses et détruisent certains maillons des voies de signalisation comme des protéines de la membrane plasmique abîmées par les traces de protéases dans les solutions d'enzymes. En second lieu, les configurations les plus informatrices du patch-clamp nécessitent la dilution du cytosol par la solution de pipette et donc imposent des conditions souvent non compatibles avec des voies de signalisation.

Néanmoins, le patch-clamp reste la preuve ultime d'une régulation d'un canal par un signal et j'ai pensé qu'il nous était nécessaire d'aller au delà de la recherche de corrélation entre efflux et activités. La première étape est alors de mettre au point des protoplastes qui répondent à certains signaux (ces essais ont été conduits par Marina Faillot et moi-même). Nous avons choisi comme signal la flagelline 22 et, parce que ils étaient plus faciles à utiliser, nous avons suivi les variations de pH externe induites par cet effecteur. A partir des cellules, dans nos conditions, la flagelline 22 provoque une alcalinisation du milieu extracellulaire d'une unité pH en 15 minutes, c'est à dire tout à fait comparable à ce qui est décrit dans la littérature (Felix *et al.*, 1999). Par contre les protoplastes préparés par une digestion sur la nuit de la paroi pectocellulosique, ne répondent plus à la flagelline 22. Sur les conseil de Jürg Félix qui sait obtenir des protoplastes y répondant, nous avons tenté de préserver l'intégrité des protoplastes en utilisant de l'acide ascorbique (10 mM), un anti oxydant, en "trompant" les protéases par inhibition compétitive avec de la Sérum Albumine Bovine (0,5 %) ou en utilisant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (SIGMA P8215). Rien n'y fait: les protoplastes ne répondent plus à la flagelline 22, même après une journée de récupération.

Chapitre IV

**RECHERCHE DE CRIBLES D'EXPRESSION EN
SYSTEMES HETEROLOGUES POUR LE CLONAGE DE
GENES CODANT DES CANAUX ANIONIQUES**

Chapitre IV:
RECHERCHE DE CRIBLES D'EXPRESSION EN
SYSTEMES HETEROLOGUES POUR LE CLONAGE DE
GENES CODANT DES CANAUX ANIONIQUES

A- Introduction

Malgré une connaissance de plus en plus approfondie des canaux de la membrane plasmique et la description de nombreuses régulations grâce à la technique du patch-clamp, leurs rôles physiologiques restent dans beaucoup de cas très hypothétiques. Cette technique utilisée seule ou complétée par d'autres approches plus intégrées telles les efflux d'anions, ne nous a pas encore permis de conclure quant à la fonction des canaux anioniques de la membrane plasmique des cellules de l'hypocotyle et des cellules en suspension. D'autre part, malgré des études bien entamées sur certaines familles de gènes codant potentiellement pour des canaux, comme les CLC, nous n'avons pas à ce jour d'évidence de leur implication dans les activités que nous avons caractérisées par la technique du patch-clamp. D'autre part, chez *Arabidopsis*, 62 % des protéines transmembranaires n'ont pas à ce jour de fonction connue (Ward, 2001). Parmi celles-ci, il est possible qu'il y ait des familles de gènes codant pour des canaux anioniques, familles non observées dans d'autres phylla ou n'ayant pas encore été caractérisées comme étant des canaux chez les animaux.

Un de mes objectifs a donc été, durant ces derniers mois, de mettre au point des cribles d'expression fonctionnelle en système hétérologue. Ceux-ci devraient nous permettre de cloner des gènes de plantes correspondant à des activités canal anionique sans faire d'hypothèse sur leur séquence. Cette approche s'inscrit donc en pendant de celle consistant à travailler sur des gènes candidats dont les homologues chez les systèmes animaux codent des activités canal. C'est le cas au laboratoire des familles CLC et plus récemment VDAC.

Un objectif annexe de cette approche est la mise au point de systèmes hétérologues d'expression pour les gènes codant des canaux ioniques potentiels en cours d'étude au laboratoire. En effet, contrairement à de nombreux CLC animaux, l'activité de transport des CLC végétaux n'a pas été démontrée et les seules données d'expression fonctionnelle publiées sont critiquées et remises en question par leurs auteurs (Lurin, 1998; Lurin *et al.*, 1996).

1- Quels sont les systèmes d'expressions à notre disposition?

Il existe plusieurs systèmes intéressants utilisés pour l'expression fonctionnelle. Le tableau IV-1 présente une liste des systèmes d'expression hétérologue dans lesquels il a été possible d'exprimer fonctionnellement des gènes codant des canaux ioniques

Tableau III-1: Exemple d'expression de canaux ioniques de plantes en système hétérologue reportés dans la littérature.

Système d'expression hétérologue	Origine	Gène	Type de Canal	Système de détection	Référence
Ovocyte de xénope	<i>Nicotiana tabacum</i>	NtCLC1	Anionique (CLC)	Voltage-clamp à 2 élec.	(1)
Ovocyte de xénope	<i>Nicotiana tabacum</i>	NtCLC2	Anionique (CLC)	Voltage-clamp à 2 élec.	(2)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtCLCc	Anionique (CLC)	Complémentation partielle du mutant <i>Gef1</i>	(3)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtCLCd	Anionique (CLC)	Complémentation partielle du mutant <i>Gef1</i>	(3)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Triticum aestivum</i>	TaVDAC1 à 3	Anionique (VDAC)	Complémentation partielle d'un mutant <i>VDAC</i> ⁻	(4)
<i>S. cerevisiae</i>	Pea	OEP24	Anionique (VDAC)	Complémentation partielle d'un mutant <i>VDAC</i> ⁻	(5)
Ovocyte de xénope	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtKAT1	K ⁺ entrant (Shaker)	Voltage-clamp à 2 électrodes	(6)
Ovocyte de xénope	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtAKT2/3	K ⁺ entrant (Shaker)	Voltage-clamp à 2 électrodes	(7)
Ovocyte de xénope	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtSKOR1	K ⁺ sortant (Shaker)	Voltage-clamp à 2 électrodes	(8)
Ovocyte de xénope	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtGORK	K ⁺ sortant (Shaker)	Voltage-clamp à 2 électrodes	(9)
Ovocyte de xénope	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtGNC2	Canal K ⁺ entrant	Voltage-clamp à 2 électrodes	(10)
Ovocyte de xénope	<i>Solanum tuberosum</i>	StKST1	K ⁺ entrant (Shaker)	Voltage-clamp à 2 électrodes	(11)
Ovocyte de xénope	<i>Solanum tuberosum</i>	StSKT1	K ⁺ entrant (Shaker)	Voltage-clamp à 2 électrodes	(12)
Ovocyte de xénope	<i>Lycopersicon esculentum</i>	LeLKT1	K ⁺ entrant (Shaker)	Voltage-clamp à 2 électrodes	(13)
Cellule d'insecte	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtKAT1	K ⁺ entrant (Shaker)	Patch-clamp	(14)
Cellule d'insecte	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtAKT1	K ⁺ entrant (Shaker)	Patch-clamp	(15)
Cellule d'insecte	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtKCO1	K ⁺ sortant (KCO)	Patch-clamp	(16)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtKAT1	K ⁺ entrant (Shaker)	Patch-clamp	(17)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtAKT1	K ⁺ entrant (Shaker)	Complémentation du mutant <i>trk1trk2</i> - Croissance à faible K ⁺	(18)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtKAT1	K ⁺ entrant (Shaker)	Complémentation du mutant <i>trk1trk2</i> - Croissance à faible K ⁺	(19)
Cellule COS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtAKT2/3	K ⁺ entrant (Shaker)	Patch-clamp	(7)

(1) Lurin (1998) (2) Lurin *et al.* (1996) (3) Gaxiola *et al.* (1998) (4) Elkeles *et al.* (1997) (5) Röhl *et al.* (1999) (6) Schachtman *et al.* (1992) (7) Lacombe *et al.* (2000) (8) Gaymard *et al.* (1998) (9) Ache *et al.* (2000) (10) Leng *et al.* (1999) (11) Müller-Röber *et al.* (1995) (12) Zimmermann *et al.* (1998) (13) Hartje *et al.* (2000) (14) Marten *et al.* (1996) (15) Gaymard *et al.* (1996) (16) Czempinski *et al.* (1997) (17) Bertl *et al.* (1995) (18) Anderson *et al.* (1992) (19) Sentenac *et al.* (1992)

végétaux. Dans le cas des cellules de plantes, plusieurs systèmes ont été utilisés pour l'expression et quelques-uns dans des stratégies de crible visant à discriminer parmi une population d'ADNc une séquence d'intérêt.

Le problème principal rencontré lors de la mise au point d'un crible d'expression fonctionnelle visant à retenir certains ARN sur une grande population, est qu'il nous faut pouvoir traiter de nombreuses séquences en parallèle. Nous ne pouvons alors nous focaliser que, d'une part, sur des organismes que l'on peut transformer et "tester" à grande échelle -le plus souvent il s'agit de microorganismes- ou, d'autre part sur des organismes que l'on peut injecter avec de nombreuses séquences d'ADNc, quitte ensuite à en réduire le nombre dans des étapes ultérieures -c'est principalement le cas de l'ovocyte de xénope.

Dans le premier cas, le crible ne peut être qu'extrêmement simple ce qui veut dire souvent assez indirect: on ne peut pas en effet imaginer "patcher" une grande quantité de cellules exprimant chacune un gène de plante. Donc un des inconvénients d'un tel système est qu'il nous faut nous focaliser sur des cribles rapides plus indirects que le patch-clamp. L'autre problème est que l'activité d'un canal constitué par deux ou plus de sous-unités ne pourra pas être révélée dans un système d'expression ne permettant pas d'obtenir l'expression d'un nombre important de protéines.

Les procaryotes et en particulier la bactérie *Escherichia coli* sont des systèmes courants d'expression. Des gènes eucaryotes, le plus souvent codant des protéines solubles, y ont été transcrits avec succès et leurs activités ont pu être caractérisées (Harris *et al.*, 1986). L'expression de transporteurs de plantes (Kim *et al.*, 1998) et de canaux anioniques animaux (Tulk *et al.*, 2000) sous forme fonctionnelle y a été possible. Néanmoins, les divergences dans la machinerie de maturation entre procaryotes et eucaryotes rendent beaucoup d'expressions impossibles et nous avons préféré écarter ce système d'expression lors d'une approche de crible fonctionnel.

Les systèmes d'expression eucaryotes ont l'avantage d'être plus proches des plantes d'un point de vue maturation des protéines. Parmi les levures, il existe plusieurs espèces intéressantes, comme *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Hansenula polymorpha* ou *Pichia pastoris* (Vernet, 1997). De plus, plusieurs systèmes ont été développés pour la caractérisation de protéines à partir d'organismes pluricellulaires. Les cellules en culture d'insecte (Gaymard *et al.*, 1997), les cellules HEK (cellules embryonnaires humaines), les cellules CHO (cellules ovariennes de hamster) et les cellules COS (cellules rénales de singe) (Binet *et al.*, 1997) peuvent être transformées avec des ORF d'intérêts. Les exemples d'expression et de caractérisation de canaux anioniques dans ces 4 systèmes ne manquent pas. L'ovocyte de xénope est aussi un système de choix dans la mesure où il est considéré comme une "machine" à traduire les ARNm. Il a l'avantage d'être aisément utilisable car de très grosse taille, facile à injecter par une multitude de séquences pas obligatoirement identiques et facile à mettre en œuvre pour des mesures de voltage-clamp (Stühmer, 1992). De nombreuses protéines transmembranaires de plante y ont été exprimées avec succès (Miller *et al.*, 2000).

2- Détecter une activité canal anionique dans un système hétérologue

La stratégie la plus courante de clonage de gènes en système hétérologue consiste à compléter les phénotypes de mutants d'autres organismes, en particulier de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. L'exemple le plus marquant dans le domaine végétal est probablement l'identification des premiers gènes codant pour des canaux potassiques chez les plantes (Schachtman *et al.*, 1992; Sentenac *et al.*, 1992). Ces canaux de la famille Shaker ont été clonés par complémentation du double mutant *trk1trk2* défectueux pour les systèmes d'absorption de potassium (Madrid *et al.*, 1998; Rodriguez-Navarro *et al.*, 1984). Comme organisme modèle, la levure est très travaillée, son génome a été totalement séquencé et il existe actuellement de nombreux outils, en particulier un grand nombre de mutants bien caractérisés. Le système *Saccharomyces cerevisiae* est donc indiqué pour des stratégies de clonage par expression hétérologue.

Dans le cas des canaux anioniques, la complémentation de mutants de levure est, pour l'instant difficilement imaginable: le seul gène de canal connu chez *Saccharomyces cerevisiae* est le gène GEF1 (Greene *et al.*, 1993; Schwappach *et al.*, 1998) qui code une protéine CLC. D'une part son activité canal n'a pas pu à ce jour être démontrée, d'autre part le mutant *gef1* présente un phénotype complexe et apparemment éloigné des phénomènes de transports d'anions et en relation avec l'homéostasie de certains métaux (Gaxiola *et al.*, 1998). Il faut de plus ajouter que parmi les membres de la famille des CLC végétaux, seuls AtCLCc et AtCLCd complètent seulement partiellement le phénotype complexe du mutant *gef1* (Gaxiola *et al.*, 1998).

La seule manière de détecter et de caractériser d'emblée une activité canal anionique, c'est à dire un transport de charges, est de mesurer les courants transmembranaires par une technique de voltage-clamp. Malheureusement ces mesures ne peuvent pas être automatisées, car elles requièrent beaucoup de temps et d'attention, et ne sont applicables à la mise au points de cribles que dans certains cas où l'organisme peut être transformé avec de nombreuses séquences. Le seul système répondant à ce critère est l'ovocyte de xénope, classiquement utilisé dans des expériences de voltage-clamp à deux électrodes (voir annexe B) et qui peut être injecté avec des ensembles ou des sous-ensembles de transcrits représentant une population ou l'ensemble des ARNm d'une cellule. Le crible consistera alors à détecter de nouvelles activités canal anionique, ressemblant à des activités déjà caractérisées sur les membranes végétales natives. Chez les animaux, une telle approche a conduit à l'identification du premier canal anionique de la famille CLC, nommé CLC0, à partir d'une banque d'expression d'ADNc de l'organe électrique du poisson torpille *Torpedo marmorata* (Jentsch *et al.*, 1990).

Dans le cas des végétaux, une approche de ce type a conduit à l'identification d'une syntaxine, qui intervient dans la signalisation précoce de l'ABA (Leyman *et al.*, 1999). La dernière partie de ce chapitre traitera d'une première expérience ayant l'ambition de conduire au clonage du canal anionique à cinétiques rapides par une approche de ce type.

Une autre philosophie de crible consiste à utiliser des techniques indirectes permettant de mesurer les conséquences d'une activité canal anionique sur la membrane plasmique. Celles ci sont d'une part une dépolarisation de cette membrane et, d'autre part, un flux d'anions.

Sébastien Thomine tente actuellement de mettre au point un crible basé sur les propriétés dépolarisantes des canaux anioniques (communication personnelle). L'idée est d'utiliser la toxicité de l'hygromycine B. Cet antibiotique, qui passe les membranes de façon dépendante du voltage, a donc une toxicité elle-même dépendante du voltage. Différentes expériences de mise au point sont actuellement en cours, consistant à vérifier que l'expression au niveau de la membrane plasmique d'une protéine dont l'activité est dépolarisante, rendra la levure plus résistante à l'hygromycine.

Un autre effet de l'activité de canaux anioniques sur la membrane plasmique est la modification de la compartimentation des anions dans la cellule. De par la polarisation de la membrane plasmique d'organismes tels les bactéries, les levures et les plantes, l'ouverture de canaux anioniques conduit à la sortie d'anions et doit en théorie -et en particulier si les systèmes d'influx sont incapables de contrebalancer la sortie- se traduire par une diminution globale des concentrations anioniques cytoplasmiques. J'ai essayé d'utiliser cette caractéristique pour bâtir un crible fondé sur les concentrations cytoplasmiques en anions toxiques. Cette idée est développée dans la partie qui va suivre.

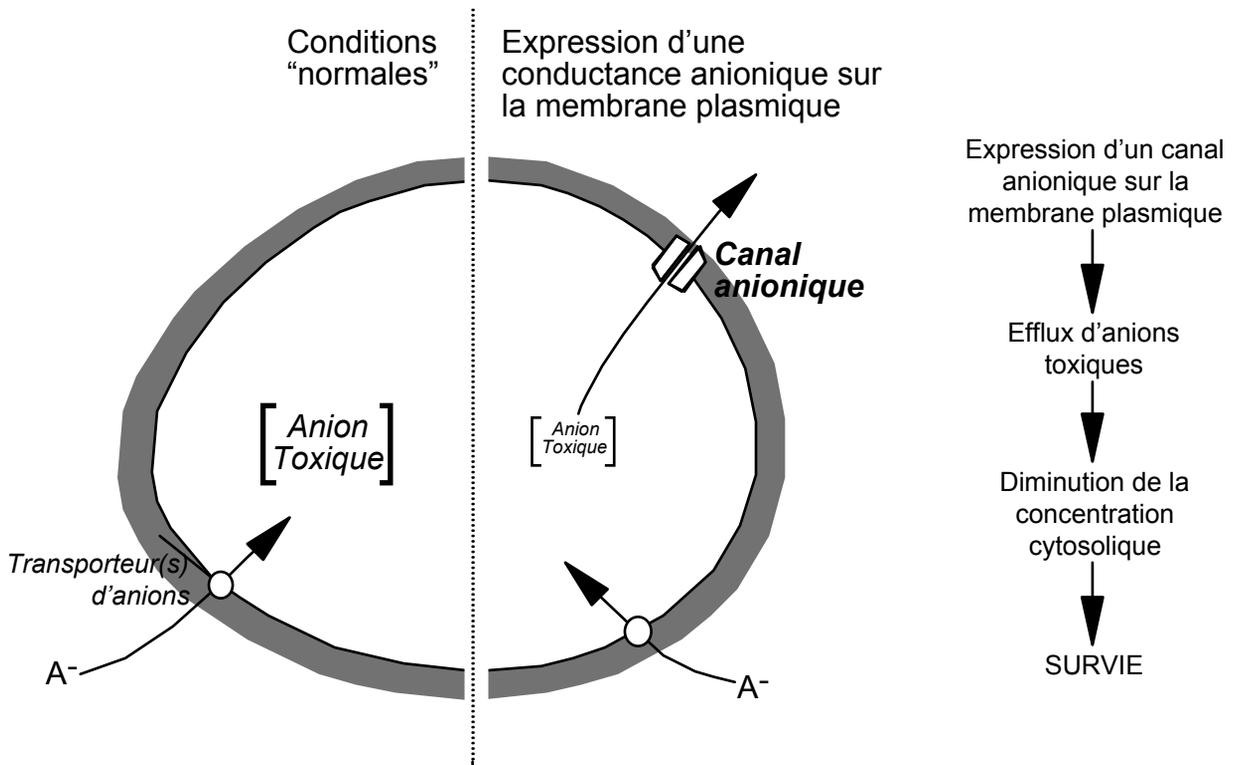


Figure IV-1: Principe de crible en levure fondé sur la toxicité de certains anions à forte concentration dans le cytoplasme.

B- Recherche d'un crible fondé sur la perméation d'anions toxiques dans le pore des canaux anioniques de la membrane plasmique

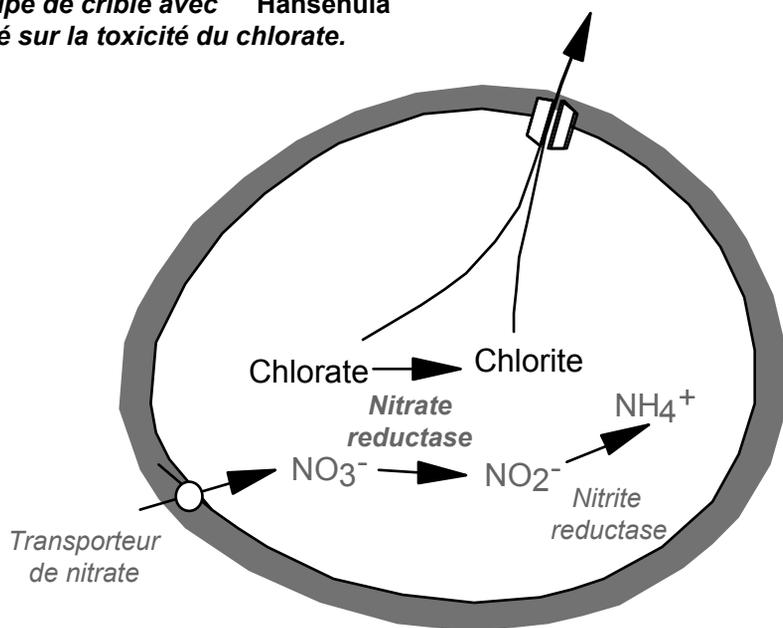
L'expression d'un canal anionique sur la membrane de levure a théoriquement un effet sur les concentrations cytosoliques d'anions. Notre idée (figure IV-1) est de rechercher des conditions dans lesquelles l'expression de canaux fera décroître des concentrations cytosoliques en anions toxiques au dessous du seuil critique -inhibiteur de la croissance- et permettra la restauration de la croissance des colonies. Il s'agit donc en théorie d'un crible positif.

Une condition nécessaire est l'accumulation effective des anions, potentiellement toxiques, dans le compartiment cytosolique. Comme nous l'avons vu, il faut pour cela un transport actif -c'est à dire énergisé- sur la membrane plasmique, car l'environnement membranaires des levures est très comparable à celui des cellules végétales: milieu extracellulaire pouvant être très dilué, forte accumulation dans le cytoplasme, potentiel de membrane très négatif dû en particulier à l'activité de pompes à protons et enfin, anions très loin de leur potentiel d'équilibre électrochimique. Il devrait donc exister des transporteurs d'anion sur la membrane plasmique des levures. Quelles en sont les preuves? Il y en a peu d'ordre fonctionnel. En utilisant la technique du patch-clamp appliqué à la membrane plasmique de *Saccharomyces cerevisiae*, on peut caractériser une conductance chlorure dont l'activité est dépendante du pH et qui pourrait correspondre à un tel transporteur (Roberts *et al.*, 2000). De plus, récemment, une protéine (YNL275w) présentant des homologies avec des cotransports animaux de type sodium/bicarbonate et chlorure/bicarbonate a été clonée et localisée sur la membrane plasmique (Zhao *et al.*, 2001). Sur la base de compétition avec le DIDS, les auteurs ont montré qu'elle avait de l'affinité pour les anions HCO_3^- , Cl^- , NO_3^- , I^- mais pas pour le SO_4^- et le PO_4^- . Enfin, *Hansenula polymorpha* possède un transporteur de nitrate YNT1 (pour *Yeast Nitrate Transporter 1*) (Perez *et al.*, 1997).

La perméation d'anions toxiques dans ce type de transporteur est très peu documentée. Cependant, on peut penser qu'une sensibilité de la levure à un anion est due à son effet toxique dans la cellule et qu'en conséquence il est activement transporté, d'autant plus que cette sensibilité existe à faibles concentrations.

Pour vérifier ces hypothèses et tenter de bâtir un crible d'expression, nous avons décidé de tester l'effet de l'expression de gènes codant pour des protéines dont l'activité canal anionique a déjà été démontrée. Ces contrôles positifs primordiaux doivent nous permettre de valider et d'éventuellement étalonner notre crible. Dans un premier temps nous avons décidé de tester le gène codant pour un canal chlorure des cellules de muscle squelettique humain, HsCLC1. Il s'agit d'un canal très étudié, activé par dépolarisation, et dont il existe des formes de mutants ponctuels présentant une sélectivité en faveur du nitrate et une régulation par le voltage affectée voir abolie (Fahlke *et al.*, 1997). Nous avons retenu les mutants G230A, G230E et G233A. Plus tard, nous avons voulu utiliser des gènes de canaux s'exprimant dans la levure. C'est le cas du TmCLC0, AtCLCc et AtCLCd qui complémentent fonctionnellement le gène GEF1 de levure (Gaxiola *et al.*, 1998). Même si la protéine GEF1 est censée se trouver sur la membrane de vésicules du Golgi, on peut supposer que la localisation sur leur

Figure IV-2 *Principe de crible avec Hansenula polymorpha* fondé sur la toxicité du chlorate.



membrane native de canaux capables de compléter le mutant *gef1* est autre. En effet, cette complémentation peut résulter d'une localisation transitoire dans le compartiment golgien, avant une autre destination telle que la membrane plasmique ou le tonoplaste.

Les vecteurs d'expression pour les différentes espèces de levure sont brièvement décrits dans le tableau A-1 de l'annexe B (Matériels et Méthodes).

1- Le système chlorate/nitrate réductase chez *Hansenula polymorpha*

Notre première idée était que la levure *Saccharomyces* était globalement insensible au statut des anions dans le milieu extracellulaire. Nous avons donc recherché des systèmes d'expression moins classiques pour lesquels il existait des arguments de sensibilité à certains anions toxiques. C'est le cas d'*Hansenula polymorpha*.

a- Le principe du trépied Chlorate, Nitrate reductase et Perméabilité

La levure *Hansenula polymorpha* est une levure méthylotrophique capable d'utiliser le nitrate comme source d'azote (figure IV-2) selon une voie d'assimilation comparable à celle des plantes c'est à dire faisant intervenir des protéines de transport (Perez *et al.*, 1997) couplées à une nitrate et une nitrite réductases (Avila *et al.*, 1995; Brito *et al.*, 1996). Ce système est fortement inductible par de faibles concentrations de nitrates dans le milieu (Avila *et al.*, 1998) et, dans ces conditions, *Hansenula* est sensible au chlorate. Cette sensibilité est probablement due à la réduction par la nitrate réductase du chlorate en chlorite, anion extrêmement réactif et donc toxique. Nous avons décidé d'utiliser ce système pour essayer de bâtir un crible: l'expression d'un canal anionique sur la membrane plasmique doit pouvoir faire décroître les concentrations cytosoliques en chlorite ou en son précurseur, le chlorate, et sauver la cellule.

Dans la même veine, nous avons imaginé utiliser des levures n'exprimant pas de nitrate réductase endogène mais transformées par une nitrate réductase de plante. Ces systèmes auraient alors l'avantage d'être dépouillés de tous les systèmes de contrôle de la voie d'assimilation du nitrate. Si le transport des anions dans le cytosol se fait bien, on peut imaginer avoir une sensibilité au nitrate ou au chlorate due à leur réduction en nitrite et chlorite. Les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia pastoris* ont été utilisées pour produire la nitrate réductase végétale, l'idée étant ensuite de l'extraire et de pouvoir bien étudier la régulation de son activité. Dans le premier cas (Truong *et al.*, 1991), l'activité n'a pas pu être mise en évidence malgré la production de l'apoprotéine. L'hypothèse des auteurs est une absence de maturation post-traductionnelle et en particulier l'impossibilité d'inclure le cofacteur molybdène. Il nous a paru difficile d'utiliser ce système et nous nous sommes tournés vers *Pichia pastoris*. Dans ce cas (Su *et al.*, 1996; Su *et al.*, 1997), une protéine active a pu être purifiée, ce qui indique que le problème rencontré avec *S. cerevisiae* ne se pose pas dans cette autre espèce de levure.

Nous avons fait le pari que l'activité nitrate réductase observée dans un extrait de levure traduirait une activité cytosolique. Quelques expériences ont été réalisées dans

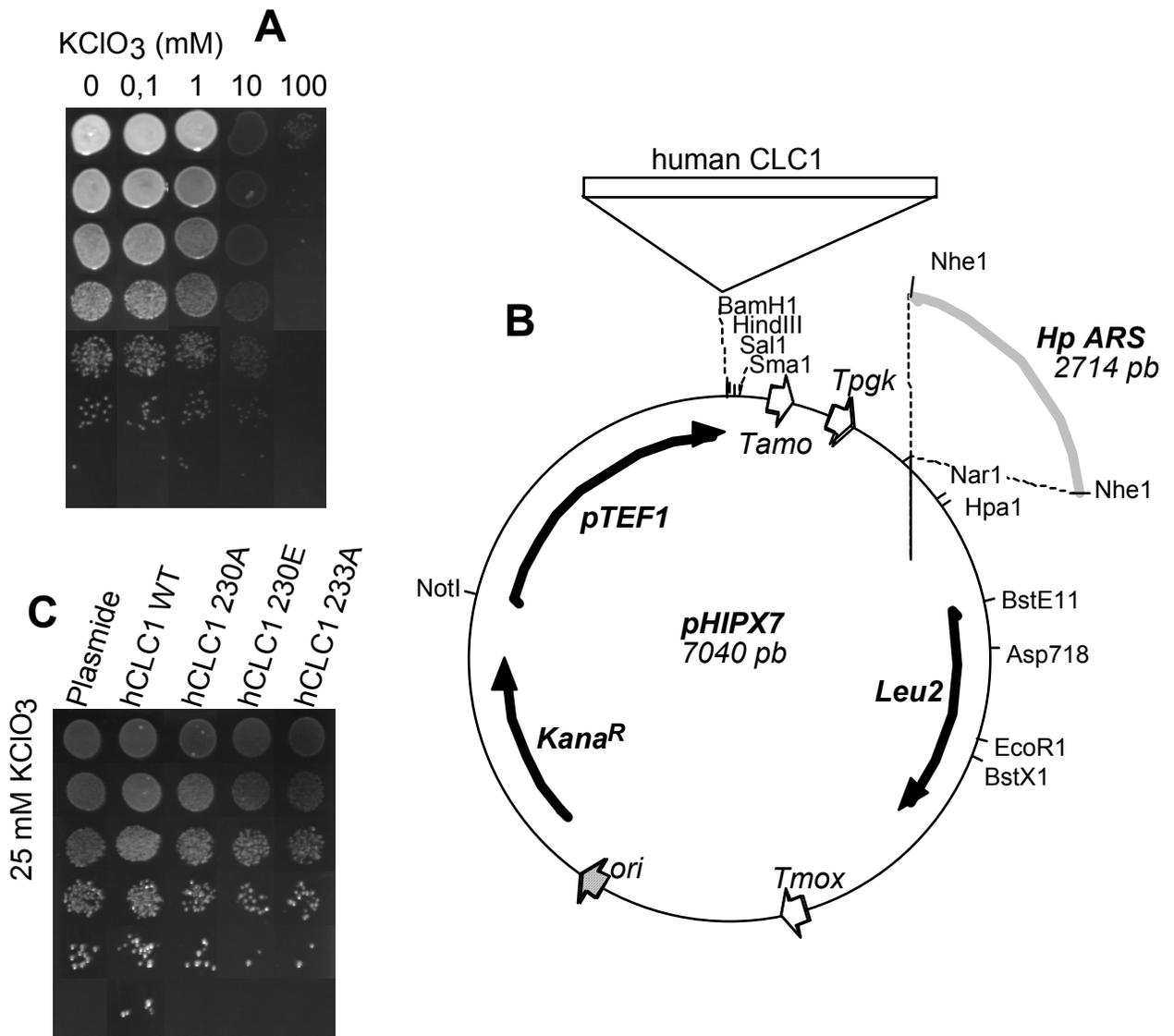


Figure IV-3: Résultats obtenus avec la levure *Hansenula polymorpha*. (A) Toxicité du chlorate dans le milieu HpYNB (voir annexe B) sur la souche sauvage NCYC 495. (B) Construction basée sur pHIPX7 (voir site du Dr Richard Baerends, www.biol.rug.nl/em/tools.htm), utilisée pour exprimer les gènes hCLC1 dans *Hansenula polymorpha*. Un fragment PCR contenant l'origine de réplication HARS1 (~2,7kb) entre deux sites Nhe1 a été cloné au site Nhe1 de pHIPX7, originairement plasmide intégratif. Des fragments PCR des gènes HsCLC1 sauvages et mutés entre 2 sites BamH1 ont été clonés au site BamH1 entre le promoteur constitutif et le terminateur de pHIPX7 (C) Effet de l'expression des différents gènes hCLC1 sur la croissance de la levure sur le milieu HpYNB (voir annexe B) contenant 25 mM chlorate de potassium. Les plasmides utilisés sont pHIPX7A et pHIPX7Aa à d.

ce système avec la souche GS115h (Su *et al.*, 1997) fournie par Nigel Crawford. Dans ce cas aussi nous espérons que l'expression de la nitrate réductase permette la réduction du nitrate ou du chlorate en nitrite et chlorite, qui faute de détoxification, tueront la cellule. L'expression d'un canal anionique devrait permettre l'efflux de ces deux anions ou de leur précurseurs et sauver la cellule.

b- Premiers essais: sensibilité de Pichia pastoris et Hansenula polymorpha aux précurseurs des anions toxiques

L'expression de la nitrate réductase chez Pichia pastoris ne modifie pas sa sensibilité au nitrate et au chlorate

Les essais dans *Pichia pastoris* montrent que le chlorate, jusqu'à une concentration de 100 mM, et le nitrate, jusqu'à 300 mM, n'induisent pas de modification de croissance dépendant de l'expression de la nitrate réductase de plante (non montré). De plus, la recherche d'une telle sensibilité a été rendue difficile par le comportement de la souche en milieu liquide. *Pichia* semble être capable d'adopter un mode de croissance à cellules bien séparées ou au contraire de former des agrégats sans que l'on en sache la raison. Ceci empêche de suivre la croissance avec des mesures de densité optique. Ce système, potentiellement intéressant, s'est donc révélé décevant et a été abandonné.

La levure Hansenula polymorpha est sensible au chlorate

Une première expérience a consisté à vérifier la sensibilité au chlorate de la levure *Hansenula polymorpha*, telle qu'elle est décrite par Perez et ses collaborateurs (1997), cultivée en milieu liquide. Nous avons effectivement observé une sensibilité au chlorate avec un EC₅₀ de l'ordre de 20 mM. Comme ces auteurs le font remarquer, cette sensibilité est très inférieure à celles qui ont pu être mises en évidence dans le cas des plantes, de l'ordre du millimolaire (Tsay *et al.*, 1993). Ceci pose la question du mécanisme d'entrée du chlorate dans la cellule. Est-ce réellement par un système de cotransport? On peut se demander si, à partir de fortes concentrations extérieures de chlorate, un simple phénomène diffusif ne suffirait pas à permettre des concentrations toxiques dans la levure de l'ordre de 10-100 µM. Qu'aura alors comme effet l'expression d'un canal anionique sur la membrane plasmique?

Dans un second temps, et puisque le but est de bâtir un crible d'expression sur boîtes de Pétri, nous avons vérifié que cet effet chlorate était conservé sur milieu solide (figure IV-3A). Les doses induisant une diminution de la croissance sont alors comparables à celles observées en milieu liquide, c'est à dire supérieures à 20 mM. J'ai refait la même expérience (résultats non montrés) avec des concentrations inférieures de nitrate (0.5 mM au lieu de 50 mM), afin de mettre en évidence une possible compétition entre nitrate et chlorate face à la nitrate réductase. Cela ne semble pas être le cas.

c- L'expression de hCLC1 sauvage et des mutants ponctuels n'induit pas de modification de croissance d'Hansenula polymorpha.

Les résultats concernant *Hansenula polymorpha* exprimant les gènes hCLC1 sauvage et mutant dans le plasmide pHIPX7 modifié (figure IV-3B) n'ont pas permis d'observer une tolérance accrue au chlorate (figure IV-3C).

Une première explication pourrait être que notre hypothèse de départ est fautive: le chlorate n'entre pas par des cotransports, mais par un phénomène diffusif. Ceci est cohérent avec le fait qu'il faille de fortes concentrations de chlorate pour réduire la croissance de la levure (figure IV-3A). Evidemment dans ce cas, l'expression d'un canal anionique risque de ne pas avoir d'effet sur la croissance, voire même d'accroître la sensibilité de la souche. Ce n'est pas cependant le cas.

Une autre explication possible est que la concentration de chlorate dans le milieu de culture soit trop forte. Dans ce cas, l'expression d'un canal anionique, surtout si elle est faible, n'est pas suffisante pour réduire les concentrations cytosoliques en dessous du seuil de toxicité.

Enfin, il est possible que hCLC1 ne soit pas fonctionnellement exprimé dans la levure, ou que sa localisation ne permette pas une modification de la sensibilité au chlorate. Il nous est donc nécessaire de réaliser de nouveaux contrôles positifs en utilisant des gènes de canaux, non pas sélectionnés sur leur capacité à transporter le nitrate et à présenter des caractéristiques idéales de dépendance au voltage, comme nous l'avons fait pour hCLC1, mais plus simplement de choisir des gènes connus pour être fonctionnellement exprimés dans la levure. C'est le cas du canal codé par le gène TmCLC0 du poisson *Torpedo marmorata* et des produits des deux gènes d'*Arabidopsis thaliana* AtCLCc et AtCLCd qui sont capables de compléter le mutant de levure *gef1* (Gaxiola *et al.*, 1998).

Au cours de cette expérience avec *Hansenula*, deux autres limites de ce système me sont apparues: tout d'abord à fortes concentrations en chlorate, il est possible d'observer des échappées, c'est à dire l'apparition de colonies poussant beaucoup plus vite que la normale, même sur de fortes concentrations en chlorate. Les raisons pourraient être, entre autres, des pertes de fonction soit du transporteur soit de la nitrate réductase. Evidemment ces colonies sont potentiellement des faux positifs dans un crible ! La seconde observation est que l'efficacité de transformation de cette levure, même si elle est présentée comme pouvant être de l'ordre de 10^6 (Faber *et al.*, 1994) est plutôt de l'ordre de 10^2 - 10^3 , c'est à dire largement insuffisante pour pouvoir cribler sans une longue optimisation du protocole de transformation. Pour ces raisons, nous avons décidé de ne pas nous acharner sur le système *Hansenula polymorpha*.

2- Les anions toxiques sans a priori

a- L'expression de canaux anioniques affecte peu la croissance de Saccharomyces, même sur des milieux riches en anions potentiellement toxiques

Comme précédemment, le principe des expériences qui vont suivre est fondé sur l'idée que les anions sont toxiques s'ils sont sur-accumulés dans les cellules. L'expression d'un canal anionique sur la membrane plasmique pourra faire décroître

Tableau IV-2: Résumé des différentes tentatives de recherche d'un phénotype sur anions toxiques induit par l'expression de gènes de canaux anioniques dans la levure.

Souche / gène	KCl	KSCN	KF	KBr	KI	KNO ₂	KClO ₃
Insv21 / HsClC-1 (sauvage et muté)	1-10-100mM ^a	1-10-100mM ^a	1-10-100mM ^a	1-10-100mM ^a	1-10-100mM ^a	1-10-100mM ^a	/
CN3 / HsClC-1 (sauvage et muté)	1-10-100mM ^a	1-10-100mM ^a	1-10-100mM ^a	1-10-100mM ^a	1-10-100mM ^a	1-10-100mM ^a	/
w303 / TmCLC-0	3-30-300mM ^b 150-1500mM ^c	3-30-300mM ^b	1-10-100mM ^b 3-30mM ^c	150-1500mM ^c	3-30-300mM ^b	0,1-1-10mM ^b 1-10mM ^c	3-30-300mM ^b
w303 / AtCLCa	3-30-300mM ^b 150-1500mM ^c	3-30-300mM ^b	1-10-100mM ^b 3-30mM ^c	150-1500mM ^c	3-30-300mM ^b	0,1-1-10mM ^b 1-10mM ^c	3-30-300mM ^b
w303 / AtCLCc	3-30-300mM ^b 150-1500mM ^c	3-30-300mM ^b	1-10-100mM ^b 3-30mM ^c	150-1500mM ^c	3-30-300mM ^b	0,1-1-10mM ^b 1-10mM ^c	3-30-300mM ^b
w303 / AtCLCd	3-30-300mM ^b 150-1500mM ^c	3-30-300mM ^b	1-10-100mM ^b 3-30mM ^c	150-1500mM ^c	3-30-300mM ^b	0,1-1-10mM ^b 1-10mM ^c	3-30-300mM ^b
CN3 / TmCLC-0	3-30-300mM ^b 150-1500mM ^c	3-30-300mM ^b	1-10-100mM ^b 3-30mM ^c	150-1500mM ^c	3-30-300mM ^b	0,1-1-10mM ^b 1-10mM ^c 3,3-6,6-10mM ^c	3-30-300mM ^b
CN3 / AtCLCa	3-30-300mM ^b 150-1500mM ^c	3-30-300mM ^b	1-10-100mM ^b 3-30mM ^c	150-1500mM ^c	3-30-300mM ^b	0,1-1-10mM ^b 1-10mM ^c 3,3-6,6-10mM ^c	3-30-300mM ^b
CN3 / AtCLCc	3-30-300mM ^b 150-1500mM ^c	3-30-300mM ^b	1-10-100mM ^b 3-30mM ^c	150-1500mM ^c	3-30-300mM ^b	0,1-1-10mM ^b 1-10mM ^c 3,3-6,6-10mM ^c	3-30-300mM ^b
CN3 / AtCLCd	3-30-300mM ^b 150-1500mM ^c	3-30-300mM ^b	1-10-100mM ^b 3-30mM ^c	150-1500mM ^c	3-30-300mM ^b	0,1-1-10mM ^b 1-10mM ^c 3,3-6,6-10mM ^c	3-30-300mM ^b

Composition des milieux: (a) YNB 0,17 % - (NH₄)₂SO₄ 0,5 % - D-glucose 2 % - Histidine 20 mg/ml - Tryptophane 50 mg/ml - Adénine 10 mg/ml - Leucine 100 mg/ml - Agar 1,5 %. (b) YNB 0,17 % - (NH₄)₂SO₄ 0,5 % - D-glucose 2 % - Histidine 20 mg/ml - Tryptophane 50 mg/ml - Adénine 10 mg/ml - Uracyl 20 mg/ml - Agar 1,5 %. (c) Milieu pauvre: YNB 0,034 % - (NH₄)₂SO₄ 0,15 % - D-glucose 0,24 % - MES 20 mM - NaOH jusqu'à pH 6 - Histidine 20 mg/ml - Tryptophane 50 mg/ml - Adénine 10 mg/ml - Uracyl 20 mg/ml - Agar 1,5 %.

cette concentration sous un seuil critique. Nous avons regardé la sensibilité de souches de *Saccharomyces* exprimant des canaux anioniques à toute une série d'anions sans *a priori*.

Plusieurs critères sont à prendre en compte pour établir un tel crible. Par exemple, il est intéressant de tester différentes souches ou mutants exprimant un canal anionique, avec comme idée qu'une résistance (ou une sensibilité) pourra être révélée dans le contexte d'une souche déjà pénalisée par certaines mutations. J'ai utilisé le mutant CN3 (Navarre *et al.*, 2000) qui est une levure dont le gène PMP3, codant un protéolipide, est muté. Elle présente comme phénotype d'avoir une membrane plasmique hyperpolarisée et des phénomènes de transport affectés: elle est hypersensible aux molécules chargées pénétrant de façon diffuse, comme l'antibiotique hygromycine B et le NaCl.

Un autre paramètre sur lequel on peut jouer, est le milieu de croissance. Il peut être plus ou moins appauvri, avec comme idée de pénaliser ou de favoriser les souches qui expriment les gènes dans des conditions limitantes. Les différentes conditions utilisées pour révéler un phénotype dépendant de l'expression d'un canal anionique sont résumés dans la tableau IV-2. Les anions ont été ajoutés sous forme de sel de potassium.

Parmi les différentes conditions de milieu, de plasmides et de souches, seules quelques combinaisons ont semblé intéressantes. Toutes les différences potentiellement intéressantes apparues lors d'un premier crible, ont été retestées dans les mêmes conditions sur une ou deux autres souches transformées indépendamment.

b- TmCLC0 confère une croissance plus faible à la levure CN3

La figure IV-4 montre que le gène TmCLC0 exprimé dans la souche de levure particulière CN3, dont le gène codant pour un protéolipide PMP3 est délété (Navarre *et al.*, 2000), induit un retard de croissance uniquement sur milieu appauvri (voir légende de la figure). Pour aller plus loin, nous avons refait ce type d'expérience en milieu liquide (figure IV-5). Sur un milieu YNB complet, la souche CN3/TmCLC0 croît normalement (figure IV-5A). Sur un milieu appauvri (figure IV-5B), j'ai de nouveau observé un retard de croissance par rapport à la souche contrôle.

La question que nous nous sommes posés est de savoir quel était le facteur limitant pour sa croissance dans ces conditions. L'ajout de KCl à des concentrations supérieures à 100 mM dans le milieu appauvri permet de restaurer une croissance comparable à celle de la souche transformée avec un vecteur vide (figure IV-5B et C). Je n'ai pas actuellement réalisé les expériences discriminantes montrant que cet effet KCl est bien dû à l'anion chlorure et non pas au potassium ou à un simple effet osmotique.

La réduction du taux de croissance induit par CLC0 peut être expliquée par une fuite d'anion hors de la cellule par la protéine CLC0: à faibles concentrations en chlorure, cette fuite est limitante. Elle ne l'est plus si on complète le milieu appauvri par un excès de l'anion.

L'effet de l'expression de TmCLC0 n'a pas été retrouvé avec d'autres membres de la famille que nous avons testés (AtCLCa, c et d; HsCLC1).

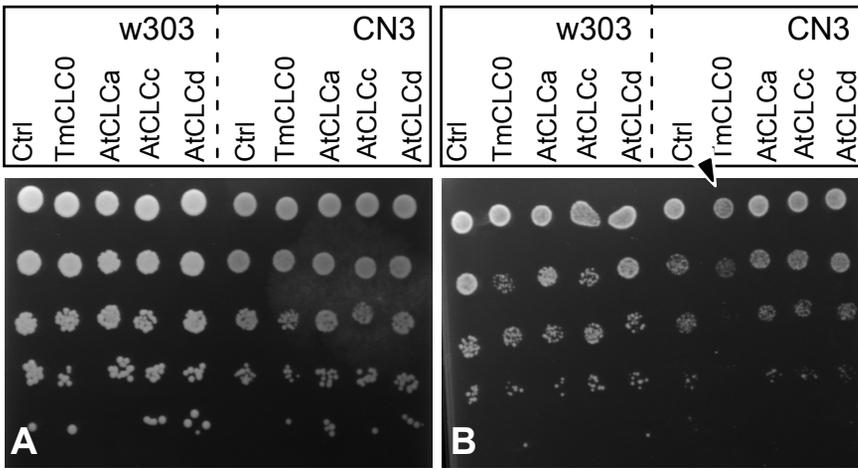


Figure IV-4: Sensibilité des souches W303 et CN3 exprimant des gènes de CLC au milieu de croissance. Les vecteurs utilisés sont respectivement

pRS315 (contrôle), pRG120 (TmCLC0), pRG175 (AtCLCa), pRG176 (AtCLCc) et pRG178 (AtCLCd). Remarquez l'effet de l'expression de TmCLC0 dans la souche CN3 (flèche). (A) Milieu YNB: 0,17 % yeast nitrogen base without amino acids and ammonium, 0,5 % (NH₄)₂SO₄, 2 % D-glucose, 20 mg/L histidine, 50 mg/L tryptophane, 10 mg/L adenine, 20 mg/l uracyl, 1,5 % Agar. (B) Milieu YNB appauvri: 0,034 % yeast nitrogen base without amino acids and ammonium, 0,15 % (NH₄)₂SO₄, 0,24 % D-glucose, 20 mg/L histidine, 50 mg/L tryptophane, 10 mg/L adenine, 20 mg/l uracyl, 1,5 % Agar.

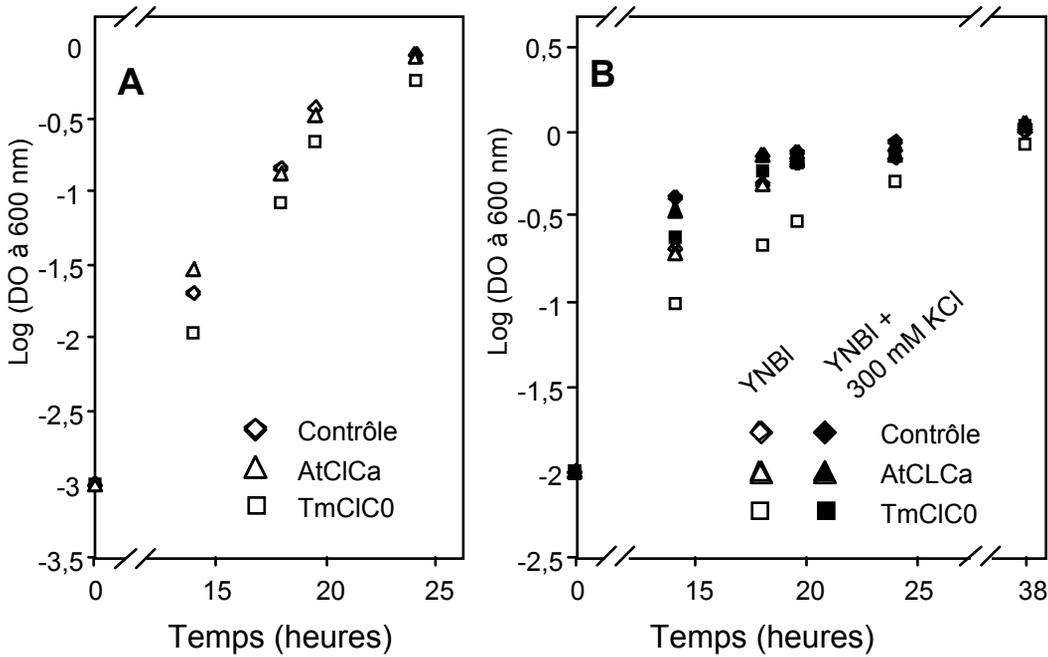
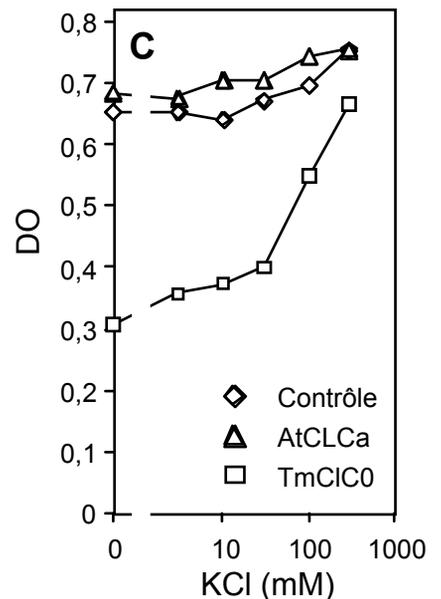


Figure IV-5: Caractérisation rapide de la souche CN3 exprimant TmCLC0 et AtCLCa. Les vecteurs utilisés (voir tableau A-2) sont

pRS315 (contrôle), pRG120 (TmCLC0) et pRG175 (AtCLCa). (A) Courbe de croissance (DO à 600 nm) en milieu riche liquide de la souche CN3 contenant l'un des 3 vecteurs. Milieu: 0,17 % yeast nitrogen base without amino acids and ammonium, 0,5 % (NH₄)₂SO₄, 2 % D-glucose, 20 mg/L histidine, 50 mg/L tryptophane, 10 mg/L adenine, 20 mg/l uracyl. (B) Courbe de croissance (DO à 600 nm) en milieu appauvri liquide de la souche CN3 contenant l'un des 3 vecteurs. Milieu: 0,034 % yeast nitrogen base without amino acids and ammonium, 0,15 % (NH₄)₂SO₄, 0,24 % D-glucose, 20 mg/L histidine, 50 mg/L tryptophane, 10 mg/L adenine, 20 mg/l uracyl. (C) Effet du KCl dans un milieu pauvre sur la croissance des 3 souches. DO à 600 nm après 19h30 de culture. 2 ml de milieuensemencés avec 20 µL d'une culture rincée à l'eau deux fois de DO 1 sont maintenus en agitation dans des tubes en verre de 5 mL hermétiquement scellés et de diamètre 1cm. La mesure de DO est effectuée en plaçant directement ces tubes dans la chambre du spectrophotomètre.



3- Conclusion sur la mise au point d'un crible basé sur la perméabilité d'anions toxiques dans le pore des canaux anioniques

Il nous a été à ce jour impossible de trouver des conditions dans lesquelles l'expression d'un CLC donne un avantage sélectif aux levures, qu'elles soient de l'espèce *Hansenula polymorpha* ou *Saccharomyces cerevisiae*. Par contre CLC0 exprimé spécifiquement dans la souche CN3 est capable d'induire un retard de croissance sur certains milieux.

Cet effet, observable apparemment uniquement dans le cas de cette souche montre l'importance d'utiliser plusieurs souches différentes avec un intérêt particulier pour celles ayant des problèmes de transport ou de détoxification. Je pense qu'il est important de continuer de telles approches avec de nouvelles souches. Des souches me semblant intéressantes sont les mutants sans vacuole que l'on peut penser être affectés dans la détoxification au sens large (Robinson *et al.*, 1991). Un autre travail potentiellement intéressant pour nous est l'analyse du turn-over et de la localisation de la protéine membranaire CFTR exprimée dans différents mutants du trafic membranaire ou de dégradation des protéines (Liser *et al.*, 2001). Certains d'entre eux pourraient se révéler idéal pour tenter l'expression de canaux ou tenter d'accroître des effets en modifiant, c'est à dire en forçant l'adressage de protéines canal.

a- Perspective : l'expression de CLC0 fournit de nouvelles pistes pour la compréhension du rôle des canaux anioniques dans les cellules animales et végétales

Je n'ai malheureusement pas pu aller beaucoup plus loin dans la caractérisation de l'effet de CLC0 dans la souche CN3 au moment de la rédaction de ce manuscrit de thèse. Dans un premier temps, je compte travailler sur les conditions du milieu pour essayer d'accroître l'effet d'une telle expression sur la croissance de la souche CN3. Le milieu pauvre phosphate/arginine semble assez intéressant car il ne contient pas d'anions autres que le phosphate (Rodriguez-Navarro *et al.*, 1984).

Je voudrais de plus confirmer que cet effet est bien dû à l'expression fonctionnelle du canal anionique TmCLC0. L'anion chlorure semble capable de restaurer la croissance de la levure qui exprime le canal. Je voudrais savoir si d'autres anions ont cette même capacité et s'il y a une relation entre cet effet et la sélectivité du pore de CLC0 caractérisé en patch-clamp (Paulmichl *et al.*, 1993). De plus, on peut imaginer utiliser les inhibiteurs de canaux anioniques bloquant l'activité de CLC0 et qui devraient être capables de restaurer une croissance normale à la souche CN3 exprimant le canal sur un milieu appauvri. Enfin, la preuve ultime nous viendra peut-être du patch-clamp appliqué à la levure qui devrait nous permettre de caractériser de nouveau la conductance CLC0.

b- Pour aller plus loin...

Outre l'intérêt pour la caractérisation du CLC0, qui ne nous concerne que modérément en tant que laboratoire de physiologie *végétale*, ces premiers résultats montrent que l'on peut bâtir un crible en système levure pour identifier de nouveaux gènes de canaux anioniques. Il consisterait à rechercher des colonies croissant mal sur

milieu pauvre en anions et dans un second temps voir si cet effet est réversé sur un milieu riche. Comme tout crible négatif, il est délicat à mettre en œuvre et nécessite de travailler les conditions de manière à en trouver pour lesquelles la réponse soit du type tout ou rien.

On peut aussi imaginer utiliser un tel système pour rechercher de nouveaux inhibiteurs de canaux anioniques. De telles molécules devraient être capables de restaurer la croissance de la souche dans des conditions de milieu à faible teneur en anions. Comme nous l'avons déjà plusieurs fois mentionné, nous manquons cruellement d'inhibiteurs spécifiques des canaux anioniques.

Un autre intérêt est, en particulier si l'on peut retrouver l'activité du CLC0 sur la membrane plasmique grâce au patch-clamp, est qu'il va être possible en se basant sur des chimères de "forcer" l'adressage d'autres CLC à cette membrane. On sait que l'adressage est une des grandes limites du système levure. J'envisage donc de systématiquement fusionner la partie N-terminale du CLC0 avec les 7 autres CLC d'*Arabidopsis* pour voir d'une part s'ils modifient le taux de croissance de la levure CN3, et d'autre part si, en patch-clamp il est -enfin- possible de caractériser les activités des membres CLC végétaux.

C- Tentative de clonage du canal anionique à cinétiques rapides: l'effet activateur du sulfate est-il conservé en ovocyte de Xénope?

1- Principe

Nous avons vu que le canal anionique à cinétiques rapides des cellules de l'hypocotyle (article n°1) ainsi que ceux des cellules en culture (chapitre II), des cellules de racines (Kiegle *et al.*, 2000) et des cellules de garde (Pei *et al.*, 2000) était perméable pour le sulfate mais aussi était efficacement activé par cet anion en patch-clamp. Le mécanisme de cette activation n'est pas encore connu mais semble faire intervenir des éléments étroitement associés au canal (voir ajout discussion article n°1). Ces deux caractéristiques, perméation et régulation, permettent de bien identifier le canal dans son système d'origine et pourraient nous permettre de le caractériser dans un système hétérologue.

L'ovocyte de xénope est un système aisément injectable par des ARN messagers ou des ARN complémentaires (Soreq *et al.*, 1992). S'il est possible de suivre une activité canal dans des ovocytes ainsi injectés, par exemple avec les ARN polyA extraits de cellules végétales, une stratégie de clonage peut consister à remonter au gène codant cette activité en divisant la population d'ARN selon des critères à définir, le plus courant étant la taille des messagers. Il est possible d'appliquer à l'ovocyte une technique de voltage-clamp robuste (Stühmer, 1992) qui a déjà permis la caractérisation de nombreuses protéines électrogènes (Boorer *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 2000; Sigel, 1990). Le premier CLC cloné, provenant du poisson torpille *Torpedo marmorata*, a été cloné par une stratégie identique d'expression de large population d'ARNm (Jentsch *et al.*, 1990). Chez les plantes, un gène codant pour une protéine, la syntaxine, intervenant dans la signalisation ABA et régulant des conductances de la membrane plasmique a été cloné de façon semblable (Leyman *et al.*, 1999).

Toutefois, un des inconvénients majeurs du système ovocyte est que la conductance de la membrane plasmique est dominée par des canaux anioniques (Weber, 1999) et qu'il peut devenir difficile de distinguer les conductances endogènes de celle provoquée par l'expression de séquences exogènes. C'est pour nous une limite à l'expression hétérologue, surtout si l'on ne sait pas bien ce que l'on recherche. Le sulfate peut nous permettre de pallier ce problème dans la mesure où il est concevable qu'il ne soit pas perméant dans les canaux endogènes de l'ovocyte. Des expériences préliminaire d'injection de K_2SO_4 , jusqu'à 20 mM (concentration finale évaluée), ont montré que le sulfate ne modifiait pas de façon notable la courbe IV de la membrane plasmique (résultat non montré). Par contre dans les systèmes végétaux, nous avons montré que le sulfate à des concentrations de cet ordre ralentit fortement le run-down du canal rapide (article n°1).

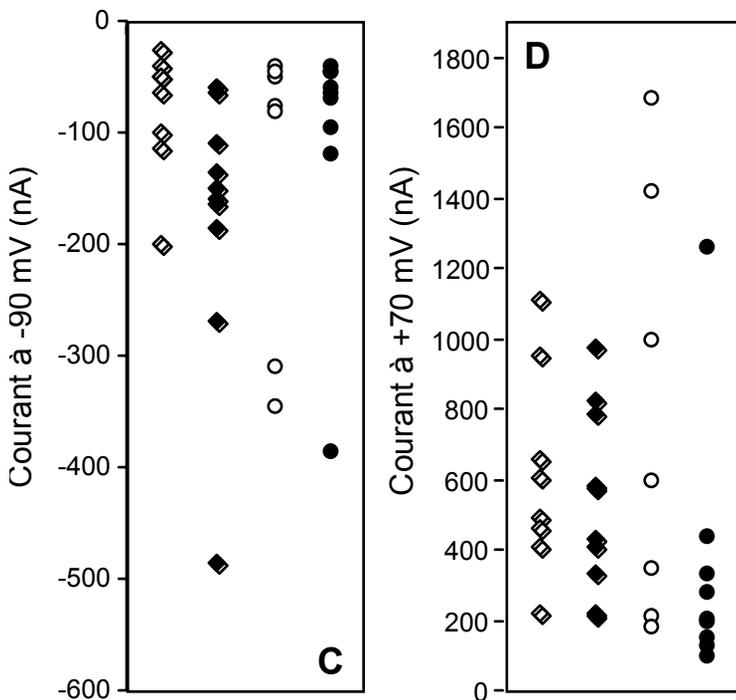
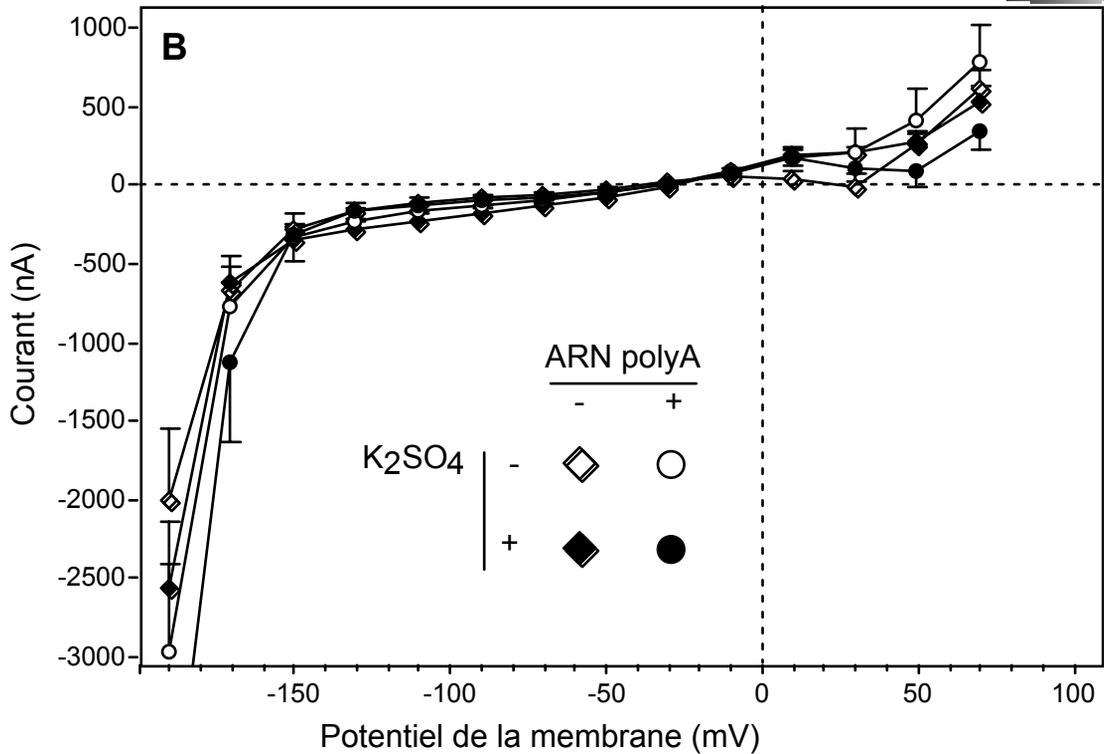
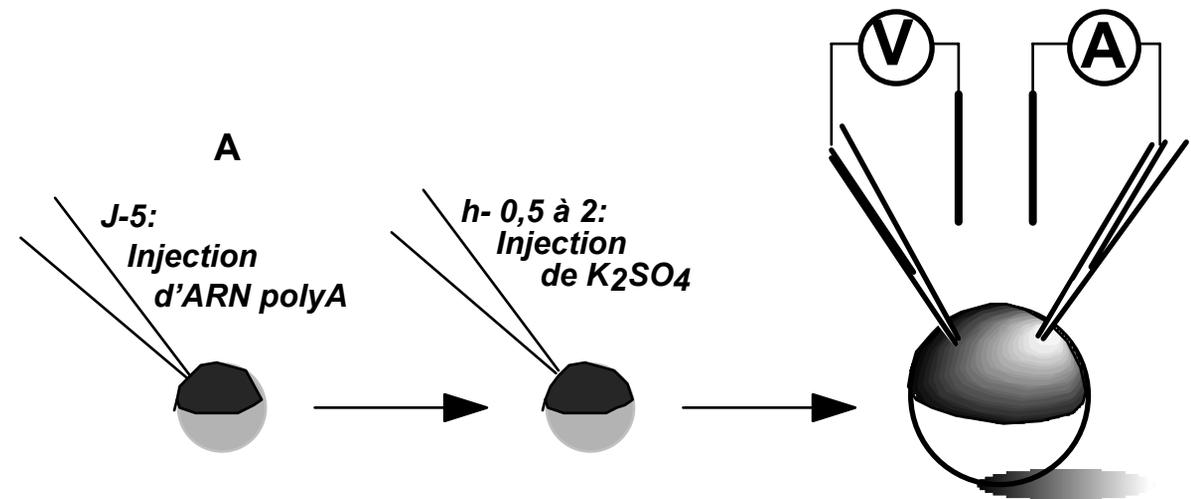


Figure IV-6: Effet de l'injection de sulfate et/ou d'ARN polyA sur les courants de la membrane plasmique de l'ovocyte de xénope suivi en voltage clamp à deux électrodes. (A) Principe de l'expérience. (B) Courants moyens (\pm SE) obtenus à la fin de pulses de 2680 ms balayant les voltages de 70 mV à -190 mV par pas de 20 mV. Le potentiel de repos est de -30 mV et les pulses sont effectués toutes les 8 secondes. (C) Récapitulation des courants obtenus à -90 mV dans les différentes conditions pour chaque ovocyte. Même signification des symboles que pour B. (D) Récapitulation des courants obtenus à 70 mV dans les différentes conditions pour chaque ovocyte. Même signification des symboles que pour B.

2- Première expérience: l'injection de sulfate ne permet pas d'activer de conductance de type rapide dans les ovocytes de xénope préalablement injectés avec des ARN polyA

La première expérience que nous avons faite a consisté à rechercher la signature anionique du canal du type rapide dans des ovocytes de xénope injectés avec des ARN polyA d'*Arabidopsis*. La figure IV-6A résume cette expérience: j'ai dans un premier temps injecté des ARN polyA (50 nL) ou de l'eau (50 nL) à deux lots d'œufs puis quelques heures avant l'expérience de voltage-clamp injecté à nouveau soit du sulfate de potassium (50 nL d'une solution mère à 100 mM) soit de l'eau (50 nL). La technique du voltage-clamp à deux électrodes permet d'avoir une idée des activités des différents transporteurs électrogènes de la membrane plasmique dans les quatre lots d'œufs obtenus et de bâtir la courbe IV dans chacun des cas (figure IV-6B). J'ai choisi de n'écarter aucun ovocyte sur des critères de potentiel de membrane ou de conductance, car l'effet d'une expression des protéines de plantes sur ces paramètres m'est inconnu. Les figures IV-6C et D montrent les courants obtenus pour chaque ovocyte à deux potentiels pour lesquels une activité de type canal anionique doit avoir une influence: à -90 mV, on se situe près du potentiel du pic de courant (causé par la perméation, dans ce cas, du sulfate interne et des anions endogènes comme le chlore) et à 70 mV, on sait le canal rapide présente un fort courant sortant correspondant à un influx des anions du bain (la concentration d'ion chlorure dans le bain ORC2 (voir matériels et méthodes) modifié pour les expériences de voltage-clamp est proche de 90 mM). Comme le montre la figure IV-6, il n'est pas possible de conclure à l'expression d'une conductance anionique de type rapide sur le membrane des ovocytes exprimant potentiellement des protéines d'*Arabidopsis*.

3- Discussion et perspectives

Cette première expérience n'a pas été très concluante. Néanmoins elle n'est pas non plus suffisante pour écarter ce type de crible et j'envisage d'aller plus loin en améliorant les points par lequel le système pêche.

On peut proposer plusieurs raisons pour ce premier résultat non positif.

Tout d'abord, il est possible que notre protéine d'intérêt ne soit pas fonctionnellement exprimée dans ce système ou que le sulfate ne soit pas capable de l'activer parce qu'il manque des étapes dans la "signalisation sulfate".

On peut aussi imaginer qu'elle soit bien exprimée, mais que sa densité soit trop faible pour être détectée par la technique du voltage-clamp à deux électrodes. En effet, il ne serait pas étonnant qu'une partie des ARNm de plantes ne soit pas ou soit peu efficacement traduite par la machinerie de l'ovocyte. Pour essayer d'accroître les chances de détection d'une perméabilité au sulfate, j'ai pensé qu'il me fallait favoriser l'expression des gènes de plantes, en particulier il est maintenant démontré que l'on peut stabiliser les transcrits en les fusionnant aux séquences flanquantes non codantes de la β -globine (Krieg *et al.*, 1984). Le vecteur est construit: il contient la séquence codante de la GFP entre les deux sites Sfi1A et Sfi1B, fusionnée avec les séquences non codantes de la β -globine (figure IV-7A). Le produit de la transcription d'une telle

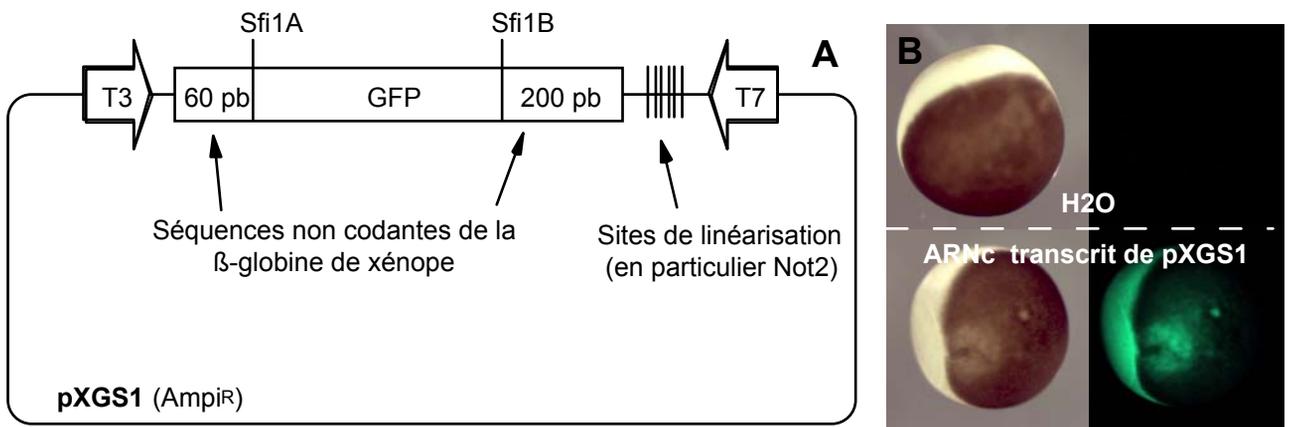


Figure IV-7: Validation du vecteur de transcription pour ovocytes de xénope. (A) Vecteur pXGS1 prévu pour le clonage de la banque d'ADNc. Un fragment PCR est utilisé pour amplifier la séquence codante de la GFP et lui adjoindre, avant l'ATG, les sites BamHI1 et Sfi1A, et au delà du codon stop les sites Sfi1B puis BamHI1. Ce fragment est sous cloné dans le vecteur pXβG-ev1 (Maurel et al. 1993) au site Bgl2 en utilisant les sites BamHI1. (B) Exemples d'ovocytes injectés avec 50 nL d'eau ou avec 50 nL de transcrit (0,4μg.μL) GFP. Gauche: lumière visible. Droite: excitation autour de 430 nm, image obtenue autour de 530 nm. Les ARNc sont obtenus par linéarisation du vecteur pXGS1 au site Not2 et transcription T3. Les sites Sfi1A et B ont été séquencés pour vérification.

construction, injecté dans des ovocytes, permet l'expression de la GFP (figure IV-7B). De l'autre côté, nous avons construit la banque d'ADNc entre les deux mêmes sites de restrictions (voir matériels et méthodes). Par contre, nous n'avons pas encore introduit ces fragments dans ce vecteur.

D'autre part, il se peut que le système de voltage-clamp ne soit pas assez sensible pour la détection d'une activité codée par une ou quelques séquences "noyées" dans beaucoup d'autres. Je pense qu'il est nécessaire dans les premières étapes du crible d'avoir une approche moins fine mais plus sensible que la technique du voltage-clamp. Cela pourrait consister à utiliser du sulfate marqué radioactif, microinjecté dans les ovocytes exprimant la banque d'ADNc végétaux, qui nous permettrait de suivre un efflux de radioactivité. Mes calculs, intégrant la taille de l'ovocyte et une évaluation de l'efficacité de transcription, montre qu'un tel système est tout à fait utilisable.

Ce travail, initié tardivement au cours de ma thèse, n'a pas dépassé le stade des premières expériences. Outre le manque de temps, l'une des raisons en est le point délicat de la construction d'une banque d'expression en système hétérologue qui nécessite d'optimiser d'une part le ligation des fragments dans le vecteur et d'autre part d'avoir une efficacité de transformation des bactéries supérieure à 10^8 . Cela n'a pas été le cas des lots de bactéries produit récemment au laboratoire.

D- Conclusion sur les systèmes hétérologues utilisés lors de crible d'expression

Durant ma thèse j'ai décidé de développer deux des idées que nous avions pour tenter de cloner les gènes codant des canaux anioniques de la membrane plasmique. Le premier, basé sur la perméabilité de canaux exprimés en système hétérologue à des anions toxiques, a donné des résultats mitigés mais a ouvert une porte sur l'étude des CLC dans la levure à travers l'expression de TmCLC0. La seconde, fondée sur l'activation par le sulfate du canal anionique rapide exprimé en ovocyte de Xénope n'a pas été concluante, mais nécessite d'être continuée car toutes les expériences critiques n'ont pas été effectuées. Parallèlement à ces deux approches, Sébastien Thomine développe un crible basé sur le potentiel de membrane qui en est lui-aussi à des phases de mise au point.

Nous espérons qu'une de ces trois approches, ou d'autres que nous pourrions développer dans l'avenir, nous permettra à terme d'identifier de nouveaux gènes de canaux. Leur méconnaissance est actuellement un obstacle à la compréhension de la fonction de ces activités, car elle nous ferme le prometteur domaine de la génétique réverse.

La mise au point de tels systèmes fournit aussi des outils pour la compréhension du rôle des gènes isolés par des techniques plus classiques. Les CLC végétaux n'ont à ce jour pas d'activité démontrée, ce qui est une limite importante dans leur étude. Le groupe dans lequel j'ai effectué ma thèse considère que c'est un des objectifs majeurs pour les années à venir. Les approches initiées avec différentes espèces de levure seront peut-être à même un jour de nous fournir les outils adéquats pour cette expression hétérologue de protéines canal fonctionnelles.

Chapitre V

CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES

Chapitre V: CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES

1- Rappel des principaux résultats et perspectives à court terme

La technique du patch-clamp nous a permis d'aller plus loin dans la caractérisation des conductances présentes sur la membrane plasmique des cellules épidermiques d'*Arabidopsis thaliana*. Deux populations de canaux anioniques bien distinctes coexistent sur la même membrane et présentent des caractéristiques de régulation qui leur sont propres. Malgré l'absence de preuves moléculaires, nous pensons qu'il s'agit de deux canaux distincts. Le canal rapide est principalement régulé par le voltage et certains paramètres de l'environnement tels que les concentrations en anions externes (article n°2), le sulfate interne (article n°1) et le pool de nucléotides internes (Thomine et al. 1995, 1997a et article n°2). De plus, il est très perméant au sulfate (article n°1). Le canal lent est quant à lui peu régulé par le voltage et très perméable au nitrate. Durant ma thèse, j'ai contribué à l'étude de ces deux canaux en travaillant sur la perméabilité du canal anionique rapide (article n°1). J'ai de plus décrit assez finement sa régulation par le voltage, les nucléotides et les anions externes, et donné une interprétation biophysique de cette régulation (article n°2). Enfin j'ai participé à la description du canal de type lent sur ces mêmes cellules (article n°3). Ces deux canaux semblent distincts (article n°4) et interviennent probablement dans des phénomènes bien différents. Le patch-clamp nous donne une vision de plus en plus claire de ces deux canaux de la membrane plasmique. Par conséquent, nos efforts dans cette approche descriptive des deux conductances anioniques de la membrane plasmique doivent être maintenus et étendus à la recherche de nouveaux canaux.

Cependant, malgré des "cartes d'identités" de plus en plus détaillées pour ces deux canaux et de nombreuses hypothèses échafaudées sur chacune des régulations mises à jour, aucune fonction n'est clairement attribuée à ces canaux, et il semble que la technique du patch-clamp ne permette pas de le faire par elle-même. Nous avons donc développé différentes approches pour essayer de relier les activités des canaux anioniques décrites en patch-clamp à des processus physiologiques à l'échelle de la cellule ou de l'organe. Une première approche d'ordre développemental avait permis d'impliquer potentiellement des canaux anioniques dans des processus de régulation de l'élongation cellulaire dans l'hypocotyle en réponse à l'auxine (Thomine *et al.*, 1997b), mais n'avait pas permis l'identification d'une activité canal particulière. Pour aller plus loin, nous avons mis au point des approches à une échelle intermédiaire. L'ouverture d'un canal anionique ayant comme conséquence de dépolariser la membrane plasmique et de provoquer une sortie d'anions, nous avons engagé des études indirectes d'activités des canaux sous ces deux angles. L'utilisation de microélectrodes intracellulaires pour mesurer le potentiel de la membrane en réponse à l'environnement est en cours au laboratoire et dans le contexte d'une collaboration avec Jean-Louis Julien de l'Université de Clermont-Ferrand II. D'autre part, j'ai

entrepris de travailler sur les efflux d'anions déclenchés par des signaux de l'environnement en utilisant comme système les cellules en culture d'*Arabidopsis thaliana*. Peu de signaux testés se sont révélés capables de déclencher de tels efflux. Seuls certains éliciteurs, comme la flagelline 22, l'hydrolysate de chitine et la pectolyase, et un choc hypoosmotique activent dans nos conditions des canaux anioniques de façon suffisante pour être détectable. La caractérisation de ces efflux a montré qu'il existait probablement au moins un troisième canal sur la membrane plasmique, ayant une perméabilité à certains anions organiques et au phosphate. L'activité de ce canal doit être recherchée et caractérisée en utilisant la technique du patch-clamp. D'un autre côté, nous n'avons pas réussi à impliquer un de nos canaux anioniques dans ces efflux déclenchés. Pour progresser sur ce point, je pense qu'il est important de poursuivre nos efforts pour la production de protoplastes "patchables" sensibles à certains de ces signaux comme nous avons commencé à le faire. A ce propos, il est envisageable d'engager une collaboration avec l'équipe de Thomas Boller au FMI (Bâle, Suisse) qui semble avoir des conditions favorables pour l'obtention de protoplastes réceptifs à la flagelline 22.

Dans le laboratoire, ce travail s'inscrit en pendant de celui consistant à caractériser des gènes codant peut-être pour des canaux anioniques, sur des critères d'homologie de séquences. De telles approches ont été développées au laboratoire par Claire Lurin (Lurin, 1998) puis Marion Vinauger-Douard (Vinauger-Douard, 2001) et leurs collègues à propos des membres végétaux de la famille. Considérant la diversité des activités canal de la cellule, il est probable que d'autres familles de gènes soient impliquées dans ces activités. J'ai donc entrepris de développer des cribles d'expression en système hétérologue pour tenter d'isoler certains d'entre eux. Deux systèmes ont été retenus: les levures et l'ovocyte de xénope. Dans le premier cas, il s'agissait de trouver des conditions dans lesquelles une souche exprimant un canal anionique soit avantagée par rapport aux souches contrôles, en particulier en jouant avec les teneurs du milieu en anions potentiellement toxiques. Cette approche n'a pas été concluante dans son but premier. Néanmoins elle a permis de mettre en évidence un effet de l'expression d'un CLC animal dans la levure *S. cerevisiae*. Pour aller plus loin, il nous faut évaluer la faisabilité d'un crible négatif dans la levure. L'autre intérêt est -en particulier si l'on peut retrouver l'activité du CLC0 sur des membranes "patchables" telles la membrane plasmique ou le tonoplaste- qu'il va être possible en se basant sur des chimères de "forcer" l'adressage et l'expression fonctionnelle d'autres CLC. On sait que l'adressage est une des grandes limites du système levure. J'envisage donc de systématiquement fusionner des morceaux du CLC0 -en particulier la partie N-terminale- avec les sept protéines CLC d'*Arabidopsis* pour voir d'une part s'ils modifient le taux de croissance de la levure CN3, et d'autre part si, en utilisant la technique du patch-clamp, il est possible -enfin- de caractériser les activités des différents membres végétaux de la famille des CLC.

La deuxième approche, qui consistait à activer grâce à des injections de sulfate une conductance rapide sur la membrane plasmique d'ovocyte exprimant des protéines végétales, est encore débutante et nécessite d'être poursuivie. A ce propos, l'ovocyte de Xénope peut lui-aussi être utilisé pour fusionner systématiquement des morceaux des CLC végétaux avec des CLC animaux s'y exprimant (comme le CLC0), ceci afin de

forcer l'activité/adressage. Les approches d'électrophysiologie sur ovocytes de Xénope sont beaucoup moins délicates que sur la levure.

2- Les couples patch-clamp/approches-complémentaires pour comprendre la fonction des canaux anioniques

Les expériences d'efflux d'anions ont été présentées et initiées comme une approche intermédiaire entre le patch-clamp et les approches testant l'effet des inhibiteurs sur le développement de plantules, c'est à dire nous permettant potentiellement de faire le lien entre une activité bien décrite en patch-clamp et une fonction intégrée plus complexe. Malgré ces nouvelles approches, que ce soit à partir des parties aériennes de plantules ou à partir des cellules en suspension, il nous est toujours difficile d'intégrer les canaux à certaines fonctions cellulaires. Peut-être nous faudra-t-il dans l'avenir développer de nouvelles approches intermédiaires entre la mesure globale d'efflux et les activités canaux ou développer des collaborations avec des laboratoires possédant ces techniques.

Il me semblerait par exemple intéressant de mesurer, en réponse aux signaux, des efflux locaux en utilisant des électrodes sélectives et en travaillant à l'échelle de la cellule dans son environnement. Un tel travail a été réalisé sur les cellules de garde de *Vicia faba* et a permis la confirmation d'autres travaux utilisant des approches plus invasives (Felle *et al.*, 2000). Il existe aussi des électrodes vibrantes (*vibrating probe*) qui permettent d'avoir une bonne résolution des flux de charges au contact de la cellule. A l'aide de cocktails sélectifs particuliers, elle permettent de bâtir une cartographie des lignes de courant concernant des ions bien distincts et assez variés (Smith, 1995). Dans nos systèmes, cela permettrait, entre autres, de travailler sur des populations de cellules bien caractérisées et d'enregistrer des courants de très faibles amplitudes. On peut en effet imaginer que ces techniques permettent de travailler sur des intensités de réponses que nous ne sommes pas capables d'observer avec l'approche efflux global et ainsi, d'élargir notre gamme de signaux capables de déclencher des efflux significatifs.

Les techniques de voltage-clamp à une ou deux électrodes sont aussi prometteuses. Elles permettent de mesurer des courants transmembranaires en imposant des tensions mais contrairement aux techniques de patch-clamp, elles ne nécessitent pas la production de protoplastes. Elles sont donc beaucoup moins invasives. Néanmoins, une de leurs limites est qu'il faut travailler dans un système fermé électriquement c'est à dire un système végétal ne possédant pas de plasmodesmes. Elles ont donc été appliquées à ce jour à des types cellulaires particuliers comme les stomates, les cellules en suspension ou les poils racinaires. Des canaux anioniques de type lent (Forestier *et al.*, 1998a, b) et de type rapide (Roelfsema *et al.*, 2001) ont pu être observés dans les cellules de garde de plusieurs plantes par ces techniques. Dans notre système, on peut imaginer isoler de petits morceaux de tissus, par exemple par ablation laser, contenant toujours quelques cellules viables, isolées électriquement et possédant des caractéristiques de différenciations identiques à celles du tissu d'origine. Il serait ensuite possible de les utiliser pour des expériences de voltage-clamp.

A mi-chemin entre le patch-clamp et le voltage-clamp, la technique de patch-perforé consiste à effectuer le scellement sur la membrane d'un protoplaste d'une pipette contenant, entre autres, un ionophore comme la nystatine (Horn *et al.*, 1988). Dans cette variante de la configuration cellule-attachée (figure A-2), on se trouve en continuité électrique avec le cytoplasme, grâce à la perforation du morceau de membrane à l'extrémité de la pipette. Les ions diffusent dans le cytoplasme, mais les grosses molécules ne sont pas "lavées" dans la solution de pipette, et l'intégrité des voies de signalisation est théoriquement maintenue. Dans ces conditions, on peut imaginer observer les modifications de la courbe courant-voltage en réponse aux signaux de l'environnement. Dans les systèmes végétaux, à ce jour et à ma connaissance, cette approche ne fait l'objet d'aucun article, probablement à cause des difficultés techniques liées à sa mise en oeuvre.

Enfin une autre approche pourrait être de développer des sondes anioniques, comme il en existe en particulier pour le calcium (Allen *et al.*, 1999a; Roos, 2000). Il existe quelques molécules ayant été utilisées pour évaluer la teneur en chlorure. Récemment, des variantes de la GFP sensibles aux halides ont été créées (Jayaraman *et al.*, 2000). L'une d'entre elles possède un Kd pour le nitrate de 10 mM (Galiotta *et al.*, 2001) et pourrait fournir un outil puissant pour suivre le comportement des pools d'anions dans les différents compartiments subcellulaires ou à l'échelle du tissu en fonction de paramètres de l'environnement ou de signaux particuliers.

Mais la compréhension de la fonction des canaux anioniques se heurte à une autre limite: le va-et-vient entre les approches visant à former des couples activités-canal/processus-intégré est généralement effectué grâce à des molécules inhibitrices de conductances, que l'on espère capables de perturber spécifiquement la fonction dans laquelle un canal donné intervient. Durant ce travail de thèse, j'ai moi-même beaucoup utilisé ces molécules. La littérature nous montre qu'elles sont relativement spécifiques chez les animaux mais le sont beaucoup moins dans les systèmes végétaux. Il nous faut interpréter les résultats avec précaution. Une des grandes avancées dans le domaine de la compréhension de la fonction des canaux anioniques pourrait consister à rechercher des inhibiteurs plus spécifiques des conductances anioniques de plante mais aussi ayant une meilleure affinité pour leur cible.

Une perte d'activité des canaux anioniques peut aussi être obtenue grâce à l'identification de mutants des gènes de canaux, en particulier par génétique réverse. Cet outil est actuellement très performant: dans les nombreuses collections de mutants insertionnels dans le monde, il doit être possible de trouver un mutant pour chaque gène. En fait, la limite actuelle pour nous se situe plutôt dans l'identification des gènes impliqués dans les activités canal anionique. Malgré l'émergence de banques FST (pour *Flanking Sequence Tags*) censées "bioinformatiser" le criblage des banques d'insertion, la recherche et la caractérisation des mutants est un long travail. Il est donc nécessaire de se focaliser sur un nombre de gènes restreints, préalablement identifiés sur des critères fiables.

3- Identifier à tout prix les gènes des canaux anioniques des cellules végétales

J'ai choisi durant ma dernière année de thèse de développer une stratégie consistant à rechercher par des cribles d'expression les gènes codant pour des canaux anioniques. Ceci n'est bien sûr pas la seule approche possible et d'autres sont actuellement développées au laboratoire avec un but similaire:

L'approche la plus simple *a priori* est de tenter d'identifier par homologie de séquence des gènes candidats de canaux anioniques et de montrer qu'il en sont effectivement. Par exemple, la famille des CLC comporte des homologues chez les végétaux qui sont intensivement étudiés au laboratoire. Malgré des résultats de plus en plus nombreux, leur nature de canal anionique n'a pas pu être encore démontrée (Lurin, 1998; Vinauger-Douard, 2001).

Par une approche de protéome, Anne Marmagne et Marie-Aude Rouet tentent au laboratoire d'identifier directement les protéines de la membrane plasmique. Les canaux anioniques doivent théoriquement être des protéines très hydrophobes, puisqu'ils ménagent un pore dans la membrane. Le nombre de protéines répondant à ce critère est important: 18 % des produits de gènes d'*Arabidopsis* ont plus de deux de ces domaines (Ward, 2001) et la membrane plasmique, interface de la cellule avec son environnement, doit en contenir une large part. Malgré des techniques d'identification modernes bénéficiant du séquençage du génome d'*Arabidopsis thaliana* (Seigneurin-Berny *et al.*, 1999), cette approche se heurte à la faible représentativité de quantité de protéines.

D'autres approches n'ont pas encore été développées au laboratoire mais pourraient conduire à l'identification de canaux anioniques:

Une approche difficile consiste à purifier par étapes la protéine en tentant de retrouver son activité canal ou de liaison à un ligand. C'est ainsi qu'ont été clonés les gènes du canal MscL (pour *Mechanosensitive channel Large*) de *Echerichia coli* (Sukharev *et al.*, 1994) et du canal CLIC/p64 du boeuf (Landry *et al.*, 1989). C'est une approche de longue haleine, nécessitant une mise au point minutieuse. Elle est restreinte à des protéines abondantes et, dans le premier cas, fonctionnelles après reconstitution en bicouche lipidique. A cause de ces limites, cette approche n'est pas envisagée au laboratoire.

Le séquençage systématique du génome d'*Arabidopsis thaliana* a permis l'identification de 18 % de protéines hydrophobes et donc probablement membranaires parmi lesquelles deux tiers n'ont pas encore de fonction. Dans les approches post-génomiques, une expression systématique dans des systèmes hétérologues de ces protéines devrait permettre l'identification de transporteurs et de canaux.

La génétique classique pourrait elle aussi conduire à l'identification de gènes de canaux anioniques. Il se peut que par hasard une équipe parvienne à isoler un gène de canal en clonant le gène impliqué dans un phénotype complexe, *a priori* éloigné du statut des anions. C'est ainsi, par exemple, qu'a été retrouvé le gène *AtCNGC2* (pour *Cyclic nucleotide gated channel*) codant un canal cationique (Leng *et al.*, 1999) dont la mutation provoque le phénotype DND (pour *Defense-No Death*) (Clough *et al.*, 2000). Mais on peut aussi concevoir des cribles plus directement dirigés contre les

canaux anioniques. Ces idées, qui me tiennent particulièrement à cœur, sont développées dans cette dernière partie.

4-Perspectives: la génétique pour l'étude de l'homéostasie des anions

Les anions à l'échelle de la plante semblent avoir, nous l'avons dit, un statut complexe. Les approches que nous avons développées consistaient à travailler sur un type d'activité contrôlant le statut des anions: les canaux anioniques. Afin de mieux comprendre comment la plante gère les anions au niveau des cellules et des organes, il est nécessaire de développer des approches sans a priori. Pour cela la génétique classique me semble tout indiquée. Bien sûr, l'identification des mutants de canaux anioniques est notre principal objectif à moyen terme mais la compréhension de leur fonction, et en particulier la manière dont ils interagissent avec d'autres éléments cellulaires, passe par une analyse plus large des mutants affectés dans le statut des anions.

a- Un crible large pour l'homéostasie des anions

Nous avons vu qu'une mutation dans le gène AtCLCa affecte chez *Arabidopsis thaliana* le stock de nitrate interne (Geelen *et al.*, 2000). Ceci est également vrai pour un mutant dans le gène AtCLCe (Vinauger-Douard, 2001). Au laboratoire, ces deux CLC ont été localisés sur deux membranes différentes (Vinauger-Douard, communication personnelle). Ceci indique que la mutation d'un gène intervenant dans l'homéostasie des anions -des gènes de canaux anioniques dans ce cas- peut affecter le contenu en anions de la plante de façon relativement spécifique (seul le pool de nitrate est affecté chez les deux mutants de CLC). Un crible primaire simple pourrait donc consister à rechercher des plantules mutantes affectées dans leur contenu en anions.

Le travail de génétique est laborieux mais faisable: à raison de 25 mutations à l'état homozygote par graine mutagénisée (et beaucoup plus à l'état hétérozygote), on peut imaginer commencer à isoler des mutants après avoir dosé les contenus en anions de quelques centaines de plantules M2. La technique d'électrophorèse microcapillaire est tout indiquée pour cela: elle permet un dosage rapide, précis et reproductible de tous les types d'anions dans un échantillon. Chaque dosage dure une vingtaine de minutes et peut être automatisé.

b- Les anions toxiques encore et toujours...

Un second crible, qui pourrait d'ailleurs être aussi un crible secondaire à celui que je viens de décrire, pourrait consister à rechercher des mutants d'*Arabidopsis* hypersensibles ou insensibles à certains anions toxiques. Le crible est relativement semblable à celui utilisé pour isoler les mutants SOS (pour *Salt Overlay Sensitive*), hypersensible au Na⁺ (Zhu *et al.*, 1998). J'ai réalisé quelques essais dans ce cadre: par exemple, le thiocyanate, un anion très perméant dans certains canaux anioniques comme les canaux lents, inhibe à des concentrations de l'ordre de la dizaine de millimolaires la croissances de la racine des plantules.

c- Classer les mutants, retenir ceux affectés dans des activités canal anionique

Les mutants isolés lors de cribles de ce genre (teneur an anions ou sensibilité modifiée vis à vis d'anions toxiques) pourraient être impliqués dans le transport des anions à l'échelle des compartiments, des tissus et/ou des organes, dans le métabolisme, d'un ou de plusieurs anions ou dans une voie de régulation de l'expression des gènes impliqués dans le maintien de leur homéostasie. Enfin pour les cribles basés sur des anions toxiques, on peut toucher également des processus de détoxification.

Les canaux ioniques sont souvent des multimères. On peut donc imaginer que certaines mutations dans ces protéines soient dominantes. Et en effet, beaucoup de maladies génétiques causées par des mutations de canaux anioniques chez l'homme le sont (Dworakowska *et al.*, 2000). Retenir des mutants de canaux obtenus lors d'un crible très large pourrait alors consister à identifier ceux qui sont dominants ou semi-dominants. Les cribles et le travail de génétique en sont bien évidemment facilités, car il est d'une part possible de réaliser un crible sur la génération M1 et d'autre part possible de suivre simplement le phénotype lors de la série de back-cross.

Si le nombre de candidats est relativement faible, on peut imaginer rechercher systématiquement les conductances anioniques que nous savons identifier en utilisant la technique du patch-clamp. C'est un travail peu couteux (théoriquement 2 jours de patch-clamp par mutant) mais il est difficile d'imaginer les chances de succès.

Un autre point intéressant pourrait consister à classer les mutants par grande fonction: la génétique classique, type mutagénèse EMS, permet d'obtenir de nombreux mutants et des techniques comme l'électrophorèse capillaire, de nombreux paramètres sur chacun de ces mutants. On peut donc les "classer" en groupe selon leur comportement de stockage et grâce à certains mutants déjà décrits dans la littérature (transporteur, nitrate reductase, stress osmotique, etc...) tirer des enseignements quant aux fonctions affectées.

ANNEXES

Annexe A- Principes d'électrophysiologie et de patch-clamp

1- Force électromotrice d'un ion

La force motrice à laquelle est soumis un ion transitant à travers une membrane, est bipartite. Elle est la somme d'une composante chimique -ou diffusible- et d'une composante électrique (1). La composante chimique est créée par la différence des concentrations de l'ion considéré de part et d'autre de la membrane (2) alors que la composante électrique est due au potentiel transmembranaire (3). La force électromotrice d'un ion donné est donc croissante, fonction du potentiel membranaire. Le potentiel pour lequel $\Delta G=0$, correspond au potentiel d'équilibre de l'ion. Il est aussi nommé potentiel de Nernst (4): à cette valeur, la force appliquée à l'ion créée par la composante électrique est égale, mais de sens opposé, à la force chimique, due au gradient de répartition de l'ion de part et d'autre de la membrane. Dans ce cas le flux net des ions est nul (le courant porté par cet ion est nul).

$$\Delta G = \Delta G_{\text{diffusion}} + \Delta G_{\text{électrique}} \quad (1)$$

$$\Delta G_{\text{diffusion}} = R \cdot T \cdot \ln (C_i / C_e) \quad (2)$$

$$\Delta G_{\text{électrique}} = z \cdot F \cdot E_m \quad (3)$$

$$E_{\text{Nernst}} = - (RT/zF) \cdot \ln (C_i / C_e) \quad (4)$$

Les symboles R, T et F ont leur signification usuelle (voir "abréviations"). E_m potentiel de membrane. E_{Nernst} Potentiel d'équilibre thermodynamique. C_i concentration interne. C_e concentration externe. z charge de l'ion considéré.

2- Intensité du courant, potentiel de réversion

Les canaux, assimilables à des pores sélectifs, rendent la membrane perméable à certains des ions présents dans le système et sont alors caractérisés par une conductance. Si on considère un ion donné et une conductance de membrane constante, le courant est proportionnel à la force électromotrice et est donc une fonction croissante du potentiel membranaire (figure A-1A). La perméation est bien sûr un processus plus complexe et cette fonction n'est en fait jamais linéaire. Par convention un courant positif correspond à une sortie de charges positives ou à une entrée de charges négatives. Le potentiel de réversion ($I=0$) est alors égal au potentiel de Nernst de l'ion perméant.

En réalité, les canaux sont toujours perméants à plusieurs ions. Il faut alors considérer qu'à un voltage donné, le courant passant par le pore d'un unique canal se décompose en courants portés par chacun des ions perméants du système pondéré d'une perméabilité relative. Le potentiel de réversion du canal dans les conditions considérées est alors proche du potentiel de Nernst de l'ion le plus perméant et le plus abondant. Il s'agit donc d'une valeur très informative qui permet de calculer, dans des conditions relativement simples les rapports de perméabilités des ions en présence.

Lorsque l'on travail sur une membrane native, il existe un niveau de complexité supérieure puisqu'on y trouve généralement plusieurs populations de canaux ioniques bien distinctes, caractérisées par des comportements différents vis-à-vis de l'environnement. Il est donc important de choisir -ou de faire varier- les paramètres

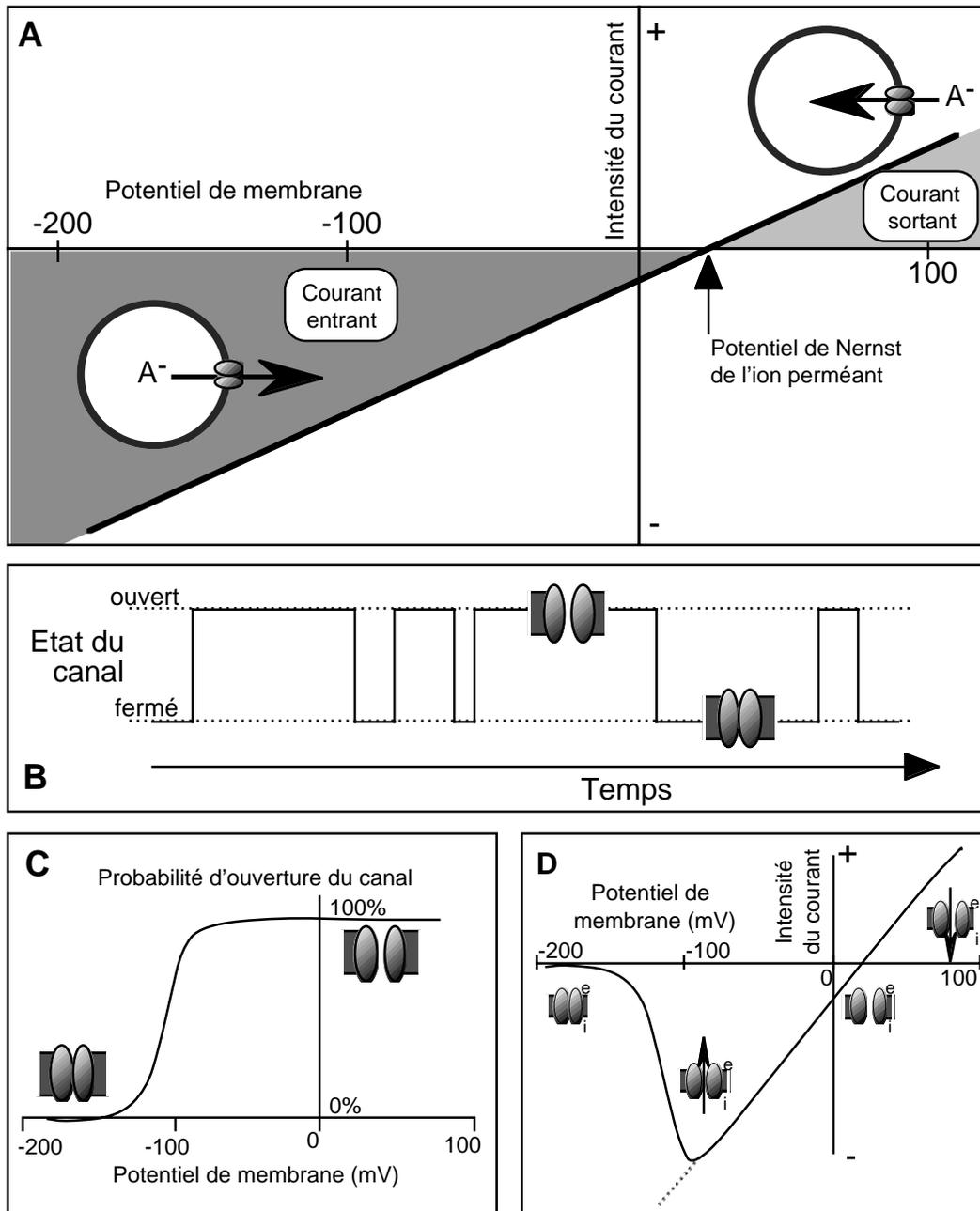


Figure A-1: Caractéristiques des courants anioniques portés par des canaux dépendant ou non du voltage. (A) Cas d'un canal insensible au voltage. Le courant est linéaire, et est porté par un efflux d'anions internes lorsqu'il est entrant (courant négatif), et un influx d'anions externes lorsqu'il est sortant (courant positif). Le potentiel pour lequel le courant est nul est le potentiel de réversion. Il est égal en théorie au potentiel de Nernst de l'ion perméant. (B) Alternance au cours du temps de phases d'ouverture et de fermeture. (C et D) Cas d'un canal dépendant du voltage. Aux potentiels très négatifs, les canaux ont tendance à être fermés et s'ouvrent lorsque la membrane se dépolarise (C). Ceci se traduit par un courant non linéaire en fonction du potentiel de membrane (D), et des courants faibles aux potentiels très négatifs malgré une force électromotrice forte.

d'étude de manière à simplifier l'interprétation des activités globales expérimentales des canaux à l'échelle de la membrane.

3- Fermeture des canaux ioniques

Si on considère une unique protéine canal, on observe le plus souvent l'alternance de phases d'ouverture -ce qui se traduit par un courant-, et de fermeture -le courant est alors nul- (figure A-1B). Ces deux types de phases sont expliqués le plus souvent par l'existence de modifications conformationnelles. L'équation simple rendant compte de ce phénomène s'écrit alors:

$$\text{Etat ouvert} \Leftrightarrow \text{Etat fermé}$$

Dans la réalité, ces modifications sont rarement aussi simples, et l'équation traduisant l'activité du canal comporte plusieurs états ouverts ou/et fermés avec un enchaînement et des probabilités relatives pour chaque état caractéristique de la protéine canal:

$$\text{Etat(s) ouvert(s)} \Leftrightarrow \text{Etat(s) fermé(s)}$$

Rechercher des régulations de canaux consiste souvent à rechercher un facteur capable de déplacer cet équilibre plus ou moins complexe dans un sens ou dans l'autre.

L'un des principaux paramètres affectant cet équilibre est souvent le potentiel transmembranaire. De nombreux canaux, et en particulier nos deux canaux anioniques, présentent des modulations de leur activité dans certaines gammes de voltage. Ce phénomène est alors indépendant de la perméation (figure A-1C). Et la relation courant voltage d'un canal peut alors être considérée comme une composition de deux fonctions, l'une étant la perméation et l'autre étant la probabilité de fermeture du canal en fonction du voltage (figure A-1D).

4- Les techniques de voltage-clamp et la technique du patch-clamp appliquée à la membrane plasmique des cellules végétales

Les techniques de voltage-clamp consistent à imposer un potentiel de part et d'autre de la membrane et à enregistrer le courant qui en résulte. Ce courant correspond à un ou plusieurs flux de charges qui traversent la membrane en passant majoritairement par des canaux, en suivant leur gradient électrochimique, ou par des transporteurs électrogènes.

La technique du patch-clamp permet de jouer sur les deux forces qui s'appliquent aux ions: il s'agit d'une technique de voltage-clamp -qui permet donc d'imposer un potentiel transmembranaire- mais il est aussi possible de fixer les conditions ioniques des deux cotés de la membrane étudiée -les compositions des milieux interne et externe correspondent aux solutions dans la pipette et de bain-. Dans ces conditions extrêmement bien définies, le patch-clamp consiste à mesurer les courants, c'est à dire les flux de charges, qui transitent au travers de la membrane. En choisissant

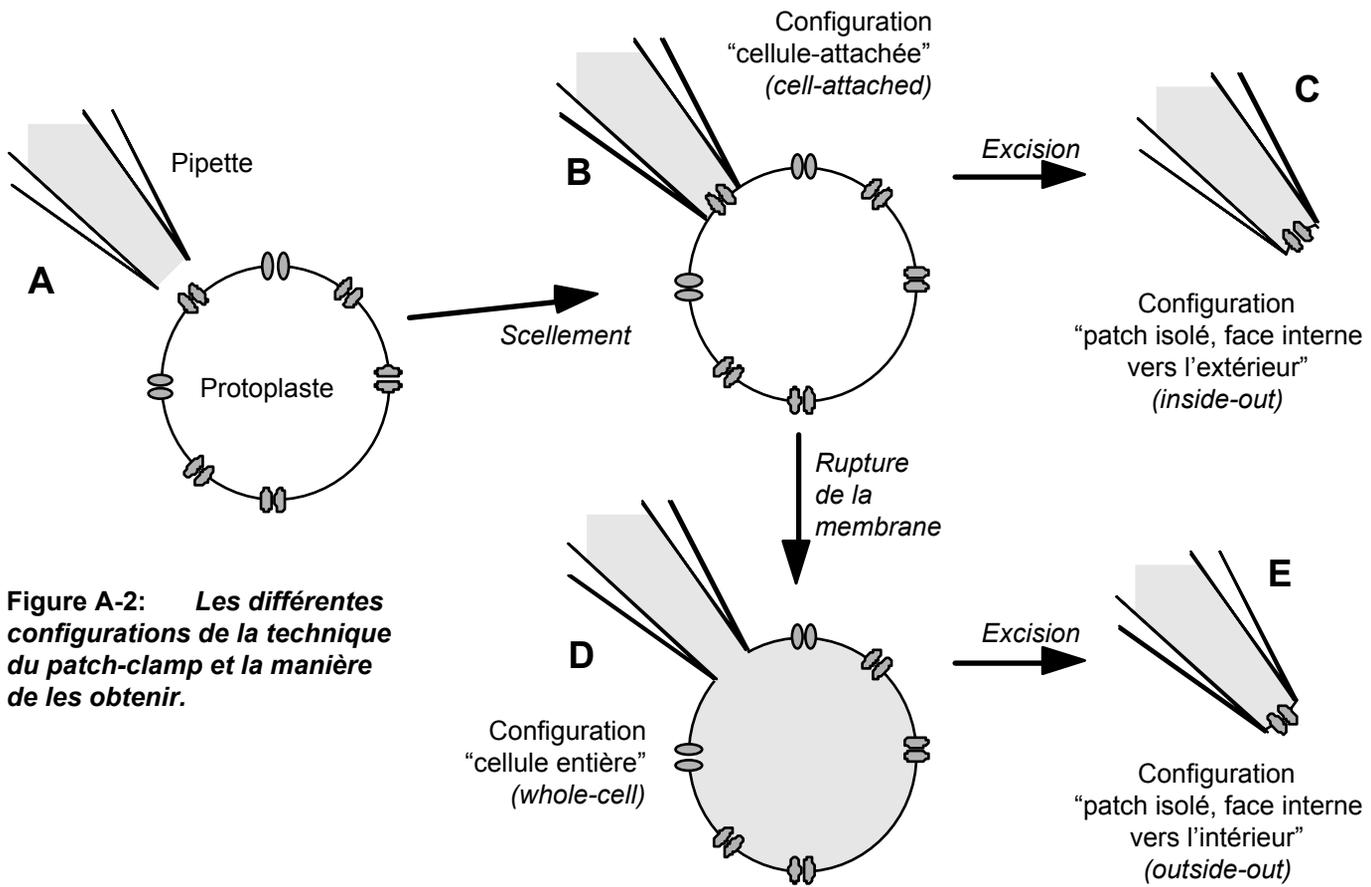


Figure A-2: Les différentes configurations de la technique du patch-clamp et la manière de les obtenir.

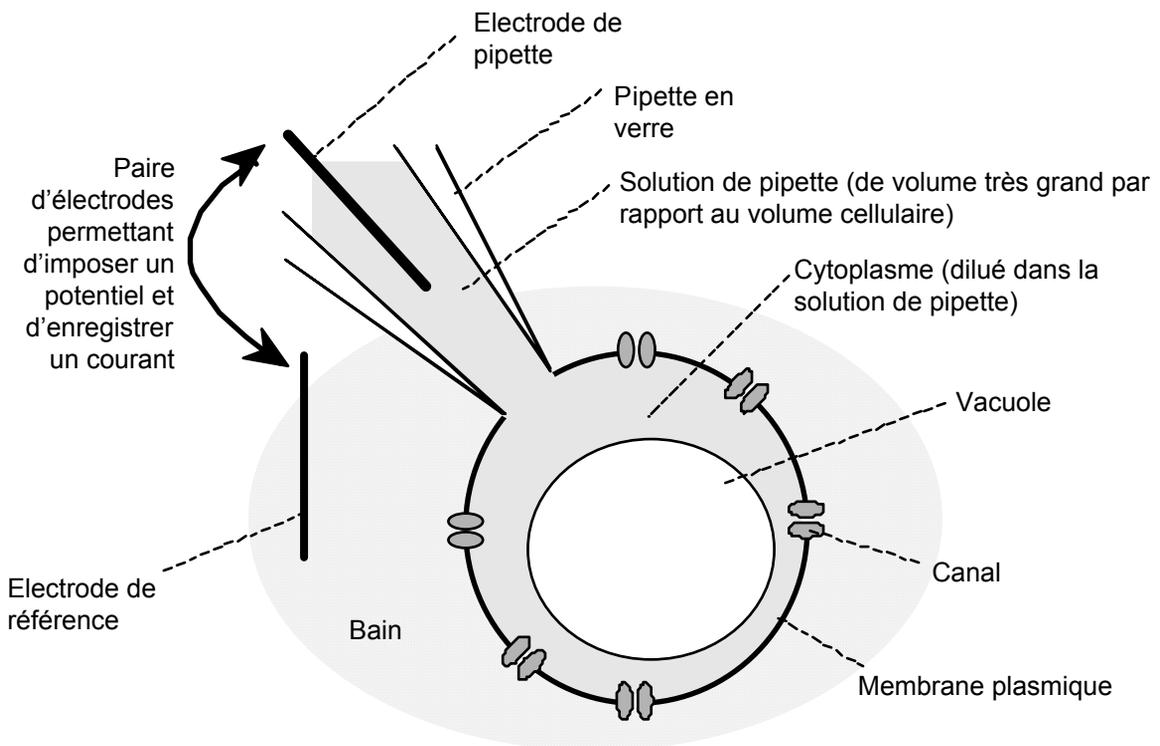


Figure A-3: Schématisation de la configuration "cellule-entière" pour l'étude des conductances de la membrane plasmique.

judicieusement les conditions de l'expérience, il est possible d'"isoler", et donc d'enregistrer le courant transitant par un seul type de canaux. On peut en déduire alors les caractéristiques cinétiques et, en jouant sur la composition des milieux, la sélectivité et la sensibilité aux molécules d'intérêt (messagers secondaires, nucléotides, hormones, ...).

Il existe plusieurs configurations en patch-clamp que l'on peut obtenir successivement et qui ont des avantages et des inconvénients: lorsque la pipette est appliquée sur la membrane du protoplaste (figure A-2A), on se trouve en configuration "cellule-attachée" (ou *cell-attached*) qui permet d'enregistrer des activités de canaux unitaires (figure A-2B). Elle a comme avantage de maintenir une certaine intégrité du cytoplasme et donc des voies de signalisation. Par contre elle ne permet pas de contrôler la totalité des conditions environnementales. Par exemple, la composition ionique du cytoplasme n'est pas maîtrisable, rendant difficile l'étude biophysique des canaux. De plus, dans toutes les expériences de canal unitaire, il est nécessaire que les canaux étudiés soient raisonnablement abondants pour que la probabilité de les avoir à l'extrémité de la pipette soit suffisante. De la configuration "cellule-attachée", il est possible de passer en configuration "patch-isolé face interne vers l'extérieur" (ou *inside-out*) en détachant du protoplaste le morceau de membrane situé à l'extrémité de la pipette (figure A-2C). Cette configuration permet l'étude de canaux unitaires en contrôlant parfaitement l'environnement. A partir de la configuration "cellule-attachée" il est aussi possible de passer en configuration cellule-entière (ou *whole-cell*) en brisant ce petit morceau de membrane à la pointe de la pipette (figures A-2D et A-3). Cela a pour conséquence de diluer la solution du cytoplasme avec la solution de pipette (de volume très supérieure). Le voltage est alors imposé sur la totalité de la surface du protoplaste et les courants enregistrés sont portés par un grand nombre de canaux. Cette configuration, bien qu'ayant un moins bon niveau de résolution que les configurations "canal-unitaire", permet de travailler sur une grande population de canaux: les courants sont équivalents à des moyennes d'activités ce qui est statistiquement très satisfaisant. De la configuration "cellule-entière", il est possible de passer en configuration "patch-isolé face externe vers l'extérieur" (ou *outside-out*) en reculant la pipette de la membrane du protoplaste de manière à en garder qu'un faible morceau à l'extrémité (figure A-2E). Cette configuration permet en théorie de travailler au niveau unitaire sur des canaux précédemment caractérisés en configuration cellule-entière sur le même protoplaste.

Nous avons principalement utilisés pour la caractérisation des canaux anioniques de la membrane plasmique la configuration cellule-entière (figure A-3) et dans une moindre mesure la configuration "patch-isolé face externe vers l'extérieur".

5- Protocoles de voltage utilisés dans les expériences de patch-clamp: signification et informations

a- Le pulse de voltage et sa signification

Le logiciel qui pilote le poste de patch-clamp permet la réalisation de nombreux protocoles de voltage, totalement différents les uns des autres et diversement

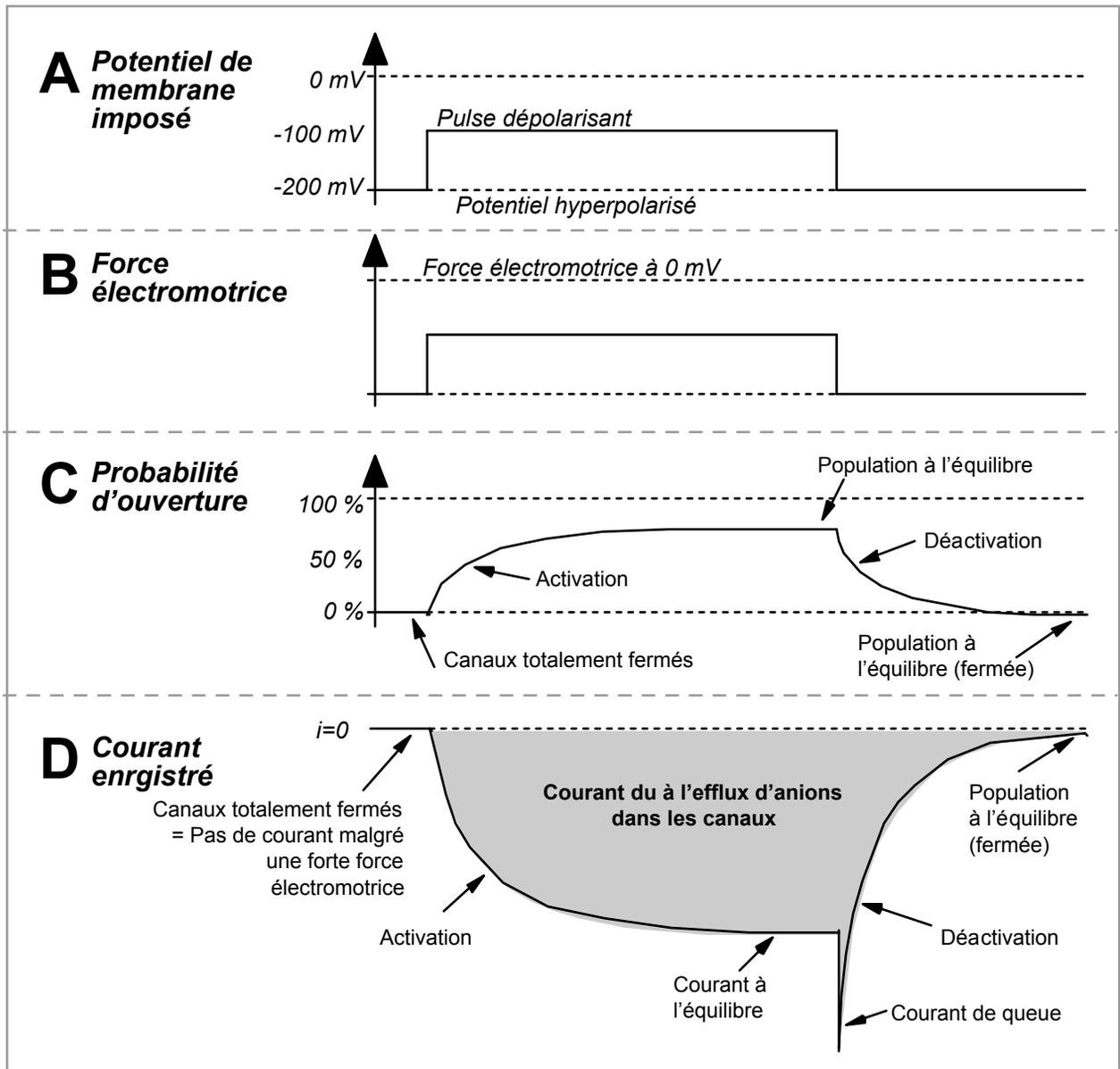


Figure A-4: Le pulse de voltage de la technique du patch-clamp et sa signification pour l'étude des canaux ioniques. Exemple d'une conductance activée par dépolarisation. Voir texte pour signification.

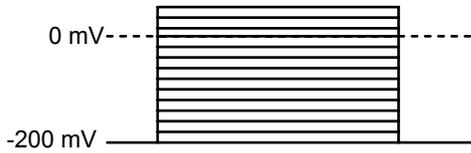
informateurs sur le comportement de la population de canaux présents sur la membrane plasmique.

Les protocoles les plus utilisés sont principalement ceux dits de "pulses" qui consistent à faire des sauts de voltage brusques. Le système enregistre alors un courant correspondant au déséquilibre puis au retour à un nouvel état d'équilibre de la population de canaux. La figure A-4 présente un exemple théorique concernant un canal activé par dépolarisation, ce qui est le cas de nos deux canaux décrits dans la première partie des résultats. Ce canal imaginaire est fermé aux potentiels les plus négatifs (figure A-4A "potentiel hyperpolarisé") et on effectue un saut de voltage ("pulse dépolarisant") pour lequel les canaux s'ouvrent. La figure A-4B présente les variations de la force électromotrice. Elle est une fonction linéaire du voltage et donc très négative au potentiel hyperpolarisé. Les canaux réagissent à ce saut de voltage (figure A-4C) par une activation qui est caractérisée par une cinétique, dite d'"activation", plus ou moins complexe, conduisant à un état d'équilibre d'ouverture variant de 0 à 100% selon le voltage (dans l'exemple, à l'équilibre, 70 % des canaux sont ouverts). Si on retourne à un potentiel hyperpolarisé les canaux se referment avec une certaine cinétique dite de "déactivation" conduisant à un nouvel équilibre fermé. La figure A-4D présente l'enregistrement théorique du courant en réponse à ce pulse de voltage. Comme nous l'avons vu, il s'agit simplement d'un produit des fonctions de probabilité d'ouverture et de force électromotrice. Lors du pulse dépolarisant, le courant augmente selon la cinétique d'ouverture -ou d'activation- caractéristique du canal et atteint un plateau pour lequel un nombre important de canaux est ouvert (70 % dans notre exemple). Lors du retour au potentiel hyperpolarisé, la force électromotrice augmente brusquement, ceci avant que les canaux ne répondent par leur fermeture: on enregistre donc un fort mais bref courant, dit courant de queue (ou "Tail"), caractéristique du nombre de canaux ouverts à l'équilibre à la fin du pulse dépolarisant précédent. Puis le courant décroît avec une cinétique caractéristique de la déactivation aux potentiels hyperpolarisés.

b- Protocoles d'activation et de déactivation. Qu'en conclue-t-on?

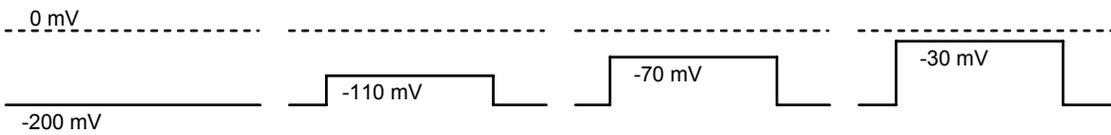
L'un des deux grands types de protocoles de pulses est le protocole d'activation (figure A-5A). Ces protocoles consistent en sauts de voltages successifs visant à déséquilibrer momentanément la population de canaux. Comme nous l'avons vu, celle-ci, après une durée caractéristique, se retrouve à un nouvel équilibre et on enregistre un courant dépendant de la probabilité d'ouverture et de la force électromotrice (figure A-5B ronds). La relation entre ce voltage et ce courant à l'équilibre est la courbe courant-voltage (ou IV) du canal (figure A-5C). Le protocole d'activation permet aussi d'étudier les cinétiques d'activation en fonction du voltage. Son dernier intérêt est l'étude de la probabilité d'ouverture des canaux à travers l'étude des courants de queue (ou "Tail"): à la fin du pulse dépolarisant, la population de canaux est caractérisée par une probabilité d'ouverture dépendante du voltage qu'il est difficile d'étudier car le courant est aussi dépendant de la force électromotrice des anions (qui est une fonction du voltage). Le retour au potentiel hyperpolarisé (figure A-5B, carrés) permet l'obtention de courants de queue dont l'amplitude est directement fonction du nombre de canaux activés à la fin du pulse dépolarisant et ne dépend que de la force électromotrice au potentiel hyperpolarisé, c'est à dire d'une

A Protocole d'activation

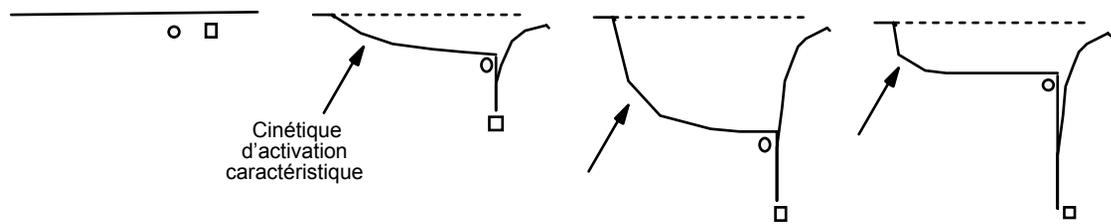


B Exemples d'enregistrement pour 4 pulses de voltage différents

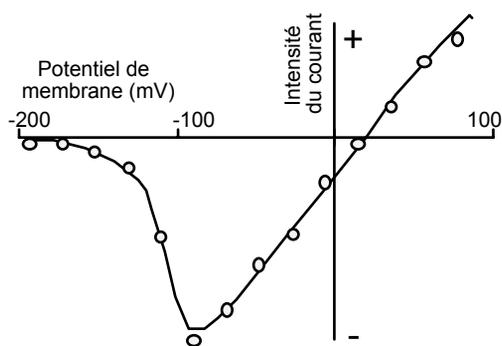
1- Voltage imposé



2- Courant enregistré



C Courbe courant-voltage (IV)



D Probabilité d'ouverture

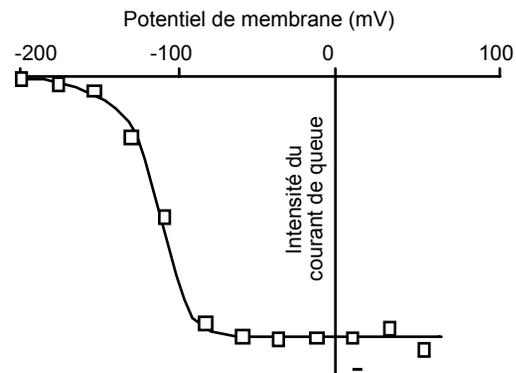


Figure A-5: Exemple du protocole d'activation adapté à un canal activé par dépolarisation .
(A) Représentation usuelle. Une série de pulses balaye les voltages des plus négatifs aux plus positifs à partir d'un potentiel hyperpolarisé (pour lequel les canaux sont fermés). (B) Extraction de 4 pulses de voltage et exemples d'enregistrements théoriques. Ronds: courant à l'équilibre à la fin du pulse. Carrés: Courants de queue ("Tail"). (C) Courbe courant -voltage construite à partir des courants à l'équilibre à la fin du pulse (ronds). (D) Variation de l'intensité des courants de queue avec le potentiel imposé au cours du pulse (carrés) donnant un aperçu de la probabilité d'ouverture du canal en fonction du voltage.

constante. Le dessin de l'amplitude du courant de queue en fonction du voltage de pulse dépolarisant donne une idée de la régulation du canal par le voltage (figure A-5D).

Le protocole de désactivation consiste en sauts hyperpolarisants à partir d'un potentiel pour lequel les canaux sont ouverts (par exemple 0 mV). Il permet l'étude des cinétiques de fermeture.

Les protocoles électriques que j'ai utilisés pour effectuer les acquisitions sont rappelés en même temps que je présente les courants enregistrés.

c- Le rampe de voltage: construire rapidement la courbe IV d'un canal

Dans le cas de canaux ioniques non régulés par le potentiel de membrane, ou dans le cas de canaux s'adaptant très rapidement au voltage (cinétiques rapides), comme c'est le cas du canal de type rapide, il est possible d'avoir une idée de la courbe IV caractéristique en effectuant un protocole de rampe. Il consiste en un balayage d'une grande gamme de voltage de façon régulière et suffisamment lente pour que l'on puisse considérer la population de canaux comme à l'équilibre en chaque point de la rampe de voltage. Cela a été un protocole particulièrement utilisé dans l'article n°1.

Annexe B- Matériels et méthodes

1- Culture de plantules et de cellules en suspension d'*Arabidopsis thaliana*

Les graines d'*Arabidopsis thaliana* de l'écotype columbia sont stérilisées à l'hypochlorite 12 % pendant 5 minutes et rincées plusieurs fois. Les plantules destinées à être utilisées dans les expériences de patch-clamp sont obtenues à partir d'un semis à raison de 40 graines séparées dans des boîtes de cultures carrées sur du milieu ABIS (figure A-6A) solidifié par 0,7 % bactoagar (40 mL). Dans le cas des efflux à partir de parties aériennes, 400 à 500 graines sont semées en deux lignes dans les mêmes conditions nutritives. Ces boîtes sont conservées au froid entre 7 et 10 jours pour une bonne stratification puis placées verticalement dans des caissons à 21°C et avec une photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité. Les plantules poussent alors le long de la surface du milieu.

Dans le cas de culture en milieu liquide, après une stérilisation semblable, une centaine de graines est placée dans un Erlen de 250 mL contenant 100 mL de milieu ABIS liquide. Les Erlen sont placés selon les cas à l'obscurité ou à la lumière continue à une agitation de 150 rpm et à une température de 21°C.

La culture cellulaire d'*Arabidopsis thaliana* (écotype columbia) en milieu liquide est entretenue dans des Erlen de 250 mL en agitation (150 rpm) à 23°C en condition de lumière continue dans un volume de 100 mL de milieu JPL (Axelos *et al.*, 1992; Jouanneau *et al.*, 1967) modifié (figure A-6B). Elles sont repiquées à 30-35% (v/v) tous les 3-4 jours.

2- Mesure de concentrations anioniques et efflux

a- Dosage du nitrate en utilisant la nitrate réductase

La technique de dosage du nitrate par réduction enzymatique permet un dosage colorimétrique simple et rapide (Barthes *et al.*, 1995).

A 15 µL de solution à doser on ajoute 100 µL d'une solution contenant de la nitrate réductase (*Aspergillus* / Boringer) et ses cofacteurs (EDTA 0,84 mM - K₂HPO₄+KH₂PO₄ (pH 7,4) 83,7 mM - NADPH 0,28 mM - Nitrate Réductase 0,15 U/mL). Le tout est incubé durant 30 minutes à 37°C et le nitrate est alors réduit en nitrite. La réaction est arrêtée avec 10 µL d'une solution 1,5 M ZnSO₄. Le dosage colorimétrique du nitrite est effectué par l'ajout de 200 µL de solution DC (Sulfamide 0,5 % - HCl 0,75 N - N-naphtyl-éthylène-diamine-dichlorohydrate 0,01 %). Au bout de 5 minutes, la coloration rose proportionnelle à la concentration de nitrite peut être lue à une DO de 550 nm (pour la réaction, voir figure A-7). On réalise une courbe de référence en mesurant la DO pour des concentrations de nitrate connues, à laquelle on se réfère pour le dosage de chaque échantillon.

Ces réactions sont effectuées dans des plaques Elisa qui peuvent être ensuite passées dans un spectrophotomètre. Pour les efflux de nitrate, les résultats sont généralement rapportés au poids de matière fraîche.

Figure A-6: Composition des milieux de culture pour plantules et cellules en suspension d'Arabidopsis thaliana.

(A) Composition du milieu ABIS

K ₂ HPO ₄ +KH ₂ PO ₄	2,5 mM
KNO ₃	5 mM
MgSO ₄	2 mM
Ca(NO ₃) ₂	1 mM
FeEDTA	50 µM
H ₃ BO ₃	100 µM
KI	5 µM
MnSO ₄	100 µM
ZnSO ₄	30 µM
Na ₂ MoO ₄	1 µM
CuSO ₄	0,1 µM
CoCl ₂	0,1 µM
Mes	4 mM
pH ajusté à 6,1 avec du BTP 0,5 M	
Saccharose	1 %
<i>Facultatif:</i>	
Bactoagar	0,7 %.

(B) Composition du milieu JPL

KNO ₃	19,4 mM
CaCl ₂	900 µM
NaH ₂ PO ₄	30 µM
Na ₂ HPO ₄	60 µM
KH ₂ PO ₄	370 µM
MgSO ₄	450 µM
H ₃ BO ₃	30 µM
KI	1,5 µM
MnSO ₄	39,6 µM
ZnSO ₄	11 µM
Na ₂ MoO ₄	0,3 µM
CuSO ₄	0,03 µM
CoCl ₂	0,03 µM
FeSO ₄	5 µM
Na ₂ EDTA	5 µM
acide nicotinic	4,1 µM
pyridoxine	2,4 µM
thiamine	1,2 µM
Myo-inositol	555 µM
Glycine	26,6 µM
Hydrolysate de caséine	0,1 %
Saccharose	43,8 mM
1-ANA	1 µM

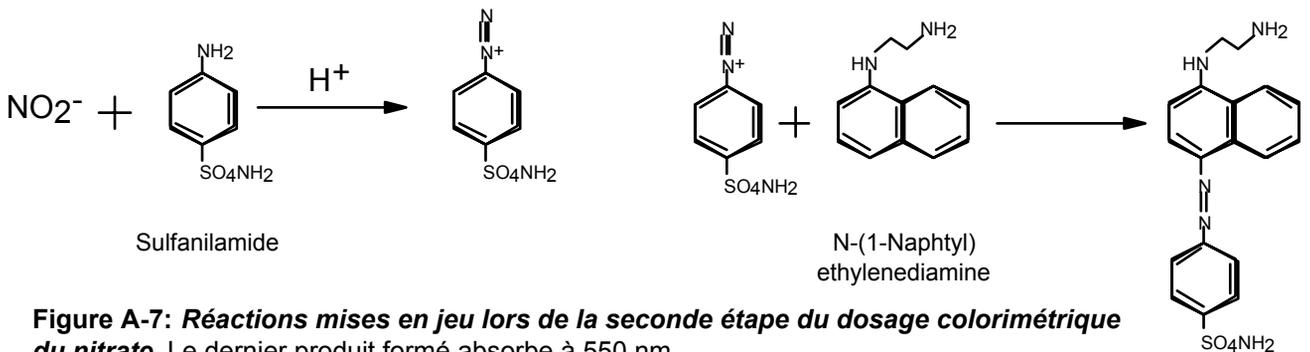


Figure A-7: Réactions mises en jeu lors de la seconde étape du dosage colorimétrique du nitrate. Le dernier produit formé absorbe à 550 nm.

b- Dosage rapide de plusieurs anions: l'électrophorèse microcapillaire

La technique d'électrophorèse capillaire est une technique séparative permettant un dosage précis des anions dans des échantillons de faible volume.

La solution à doser est injectée à l'extrémité d'un capillaire de grande taille (60 cm) mais de faible diamètre (60 µm) en utilisant la force de gravité pour effectuer un "siphonage" (figure A-8A). Les paramètres de hauteur et de durée sont constants et permettent d'injecter un volume toujours identique de solution.

Une tension de 20000 Volts est ensuite imposée à travers le capillaire, provoquant la migration des charges selon leur signe dans un sens ou dans l'autre (figure A-8B). Les anions migrent à travers un tampon spécial composé de chromate (4,6 mM), absorbant la lumière à 254 nm, et d'OFM (Osmotique Flow Inverser) qui est un tensio actif cationique. La force de migration des ions due à leur charge, est contrecarrée par la présence dans le capillaire d'un flux en sens opposé nommé flux électroosmotique (FEO, figure A-8C), dû aux charges négatives tapissant la paroi interne du capillaire de verre. L'OFM, fortement positif, permet de neutraliser ces charges et d'inverser ainsi le sens du flux électroosmotique, ce qui accélère de façon considérable la vitesse de migration des anions sans modifier la qualité de la séparation.

La mesure proprement dite s'effectue à l'autre extrémité du capillaire (figure A-8D). On enregistre la diminution d'absorption du chromate lors du passage des anions devant la fenêtre de lecture. Le temps de rétention et l'ordre de passage de chacun des ions sont bien caractérisés. Une gamme étalon permet de transformer les surfaces des pics en concentrations.

c- Efflux d'anions à partir des parties aériennes d'Arabidopsis thaliana

La totalité des plantules de 5 boîtes est récoltée et seules les parties aériennes sont conservées (400 à 500 plantules par boîte, soit 0,3 à 0,5 grammes de matière fraîche). Elles sont abrasées pendant 30 minutes dans 50 ml de milieu ABIS-S+M (milieu ABIS (figure A-6A) sans saccharose et avec du mannitol pour obtenir une osmolarité de 200 mOsm) liquide contenant 11,75 gr de carborandum (granulométrie 37 µm) sous agitation (300 rpm). Puis les plantules sont rincées et divisées en 5 lots de tailles approximativement semblables et mises à équilibrer pendant 24 heures dans de petits béciers contenant 10 ml de milieu ABIS-S+M en agitation douce (150 rpm).

Vingt-quatre heures après abrasion, les parties aériennes sont rincées avec le milieu d'efflux (Mes 10 mM - Ca(gluconate)₂ 0,5 mM - +ou- mannitol selon l'osmolarité désirée) dont l'osmolarité est ajustée à 200 mOsm puis mises à effluer en agitation (150 rpm) dans 10 ml de milieu d'efflux dont l'osmolarité a été ajustée soit à 200 mOsm (choc isoosmotique) soit à 50 mOsm (choc hypoosmotique). A intervalles réguliers, 0,5 ml du milieu est prélevé pour le dosage des ions.

Le dosage proprement dit est effectué soit à l'aide d'une électrode sélective, et dans ce cas, il ne concerne que le nitrate, soit par la technique d'électrophorèse capillaire qui permet d'avoir accès à plusieurs anions, en particulier le sulfate, le nitrate, le chlorure et le phosphate. Les efflux sont évalués à travers la concentration des différents anions dans le milieu. Ils sont pondérés par les poids de matière fraîche des échantillons et corrigés des volumes prélevés nécessaires aux dosages. Ils sont

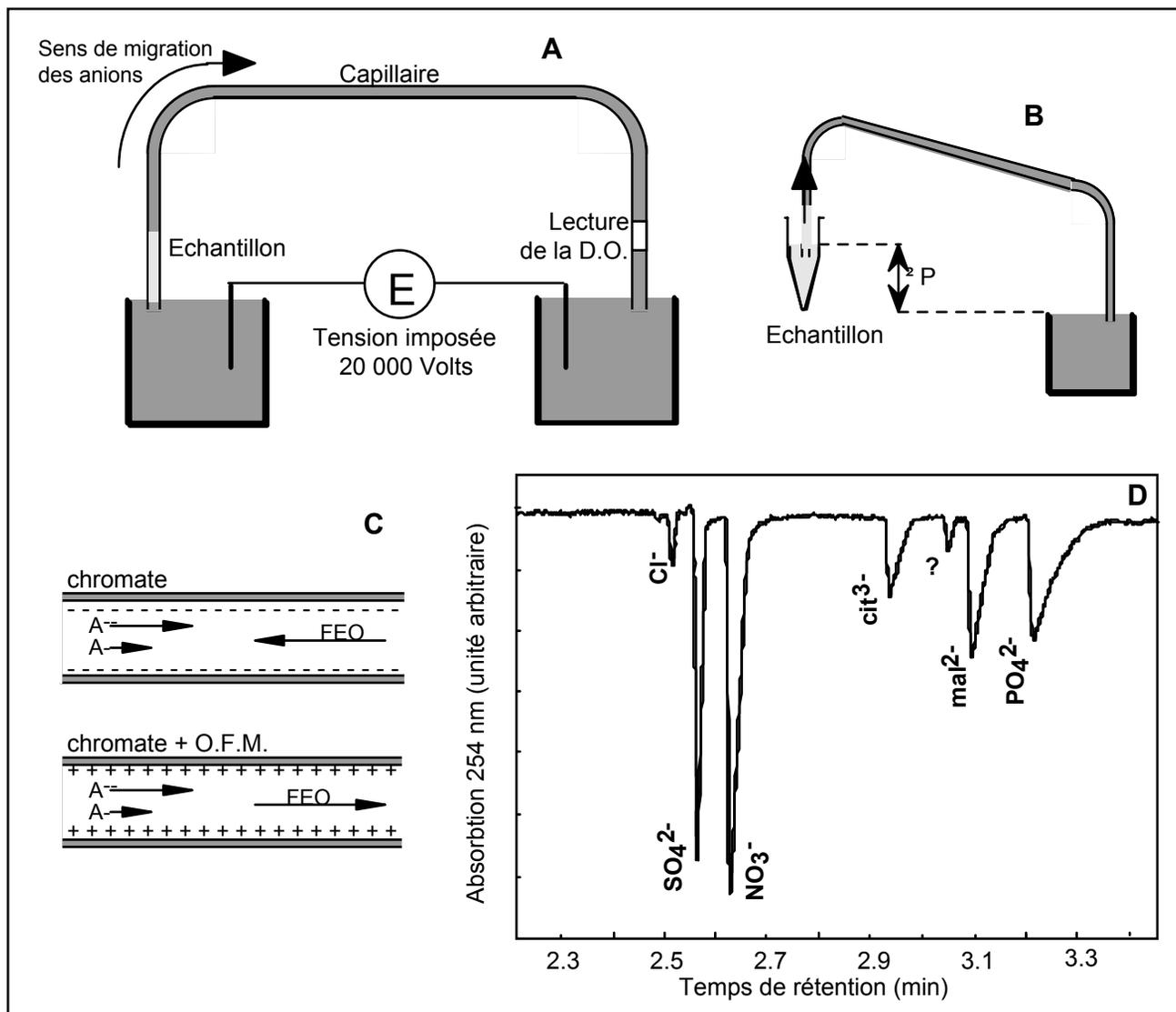


Figure A-8: Présentation de la technique d'électrophorèse capillaire. (A) Principe: une tension de 20000 V permet de faire migrer les anions dans une solution de chromate le long d'un capillaire. (B) Technique de remplissage du capillaire avec la solution à doser. Une différence de pression (ΔP) par "siphonage" provoque la montée de la solution dans le capillaire. (C) Le flux électroosmotique (FEO), s'opposant à la force électrique "tractant" les anions, est inversé en présence d'OFM (Osmotique Flow Inverser) ajouté au chromate et inversant les charges négatives de la paroi de verre. (D) Exemple d'enregistrement de la DO à 254 nm à l'extrémité du capillaire (cellule de lecture) en fonction du temps. Le passage des anions produit une baisse de l'absorption du chromate. L'exemple représenté ici correspond à un dosage des anions dans un extrait de plantules.

donc exprimés en mM d'anions dans le milieu d'efflux pour 1 gramme de matière fraîche.

d- Efflux d'anions à partir de cellule en culture d' Arabidopsis thaliana

Des cellules d'*Arabidopsis thaliana* de 3 à 4 jours sont récoltées et mises à "équilibrer" durant 3 à 4 heures en agitation (160 à 170 rpm) dans le milieu d'équilibration (CaCl₂ 0,5 mM - MES 1 mM) dont on a ajusté la pression osmotique avec du mannitol à celle du milieu ayant contenu précédemment les cellules (originaires du JPL). On dilue ou concentre la suspension de manière à obtenir une densité cellulaire proche de 100 mg.ml⁻¹. Les cellules sont ensuite réparties dans des piluliers à raison de 6 mL (soit 600 mg de cellules) par pilulier. Une expérience contient de 20 à 40 piluliers selon l'espace désiré entre les prélèvements ce qui permet, chaque condition étant doublée, d'obtenir des efflux dans 10 à 20 conditions (les résultats seront présentés moyennés). Après deux heures, le milieu d'équilibration est éliminé par aspiration et les cellules sont resuspendues dans un milieu d'efflux, qui sauf exception que nous mentionnerons, est toujours le même (CaCl₂ 0,5 mM - MES+Tris (pH 6) 50 mM). Si un pré-traitement est nécessaire (utilisation d'inhibiteurs, charge acide ...), il est réalisé 10 minutes avant l'ajout de l'effecteur.

Lorsque les efflux sont dosés par la technique de la nitrate réductase, 15 µL du milieu d'efflux sont prélevés aux temps désirés et directement déposés dans les puits d'une plaque Elisa. Pour un dosage par électrophorèse microcapillaire, 1 ml de milieu d'efflux est prélevé en fin d'expérience (c'est à dire au bout de 45 minutes d'efflux).

3- Electrophysiologie sur *Arabidopsis thaliana*

a- Préparation des protoplastes à partir de l'hypocotyle et des cellules en culture d'Arabidopsis thaliana

Une quarantaine de plantules (une boîte), âgées de 8 jours, est récoltée et les hypocotyles sont sectionnés au collet et à la base du nœud cotylédonaire. La préparation des protoplastes est effectuée en deux étapes. Dans un premier temps, une digestion enzymatique ménagée en conditions hyperosmotiques (CaCl₂ 2 mM - MgCl₂ 2 mM - MES/KOH (pH 5,5) 10 mM - Cellulysine (Calbiochem) 17 mg/mL - Cellulase RS 17 mg/mL - Pectolyase Y23 0,4 mg/mL - Serum Albumine Bovine 3,5 mg/mL - mannitol jusqu'à 600 mOsm) pendant 15 minutes sous agitation (70 rpm) permet de décoller la membrane plasmique des parois et digérer partiellement ces dernières. Puis, après deux rinçages successifs de 5 minutes (CaCl₂ 2 mM - MgCl₂ 2 mM - MES/KOH (pH 5,5) 10 mM - mannitol jusqu'à 600 mOsm), un choc hypoosmotique (MgCl₂ 2 mM - Kcitrate 10 mM - MES/Tris (pH 5,5) 2 mM - mannitol jusqu'à 280 mOsm) de 10 minutes permet, par gonflement, de libérer les protoplastes. La suspension est alors filtrée sur toile à bluter (vide de maille: 300 µm) afin d'éliminer les plus gros débris. Elle est ensuite répartie entre les différentes "chambres de patch" dont le fond a été préalablement enduit de poly-lysine pour assurer une bonne adhésion des protoplastes. Ceux-ci sont mis à décanter à 4°C pendant 3 à 8 heures.

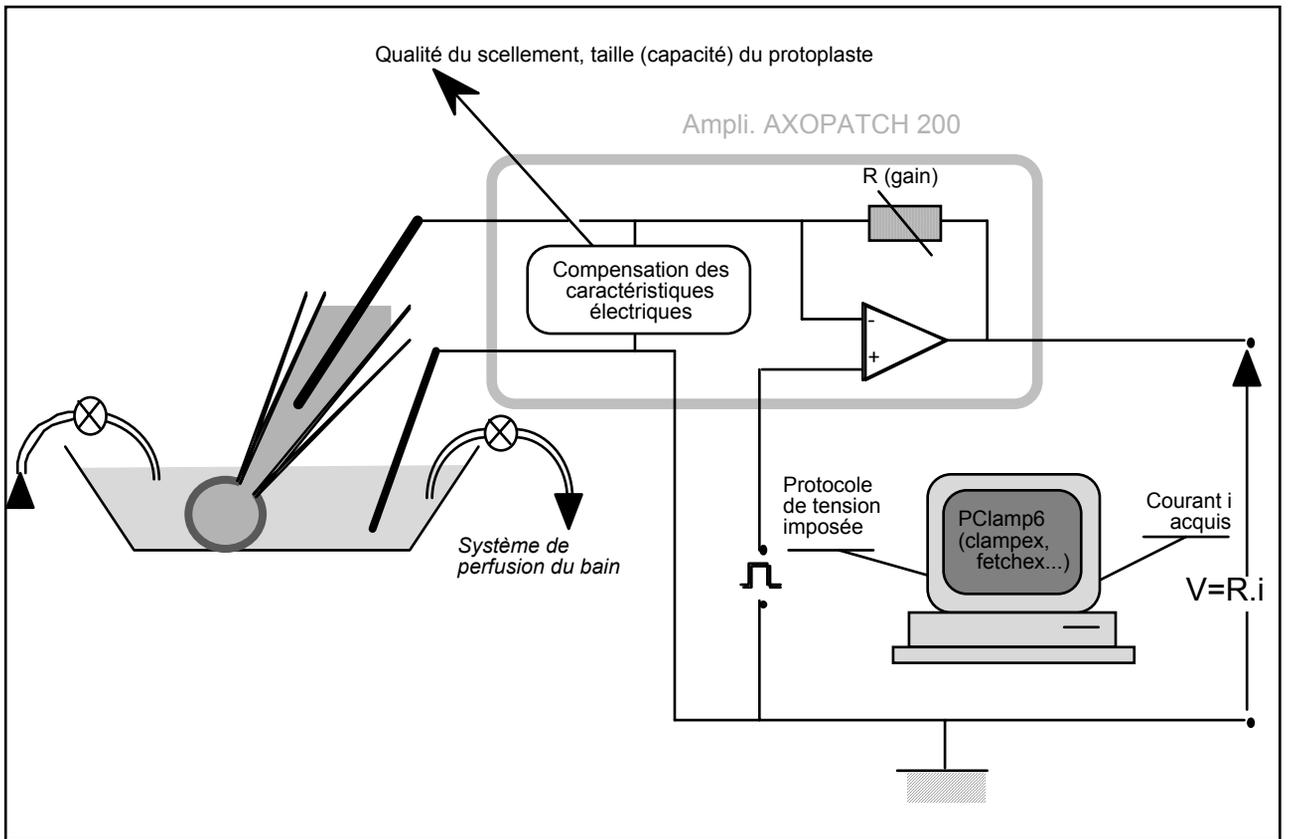


Figure A-9: Schéma du système de mesure utilisé en patch-clamp.

Les protoplastes provenant de l'épiderme de l'hypocotyle sont facilement reconnaissables à leur grande taille ($\approx 40 \mu\text{m}$ de diamètre) et à l'absence de chloroplastes. Ils sont fortement vacuolisés et présentent souvent des travées cytoplasmiques.

Les protoplastes de cellules en culture sont obtenus de manière comparable à ceux d'hypocotyle. Les cellules sont culottées par centrifugation douce (2 minutes à 2000 rpm) ce qui permet le changements de solutions avec la même séquence et les mêmes conditions que précédemment.

b- Application de la technique du patch-clamp aux protoplastes d'*Arabidopsis thaliana*

Les micropipettes utilisées en patch-clamp sont obtenues par l'étirement en plusieurs étapes de capillaires de verre (Kimax-51, 1,5-1,8X100 mm, Kimble Products) sur une étireuse verticale (L/M-3P-A, List Medical). Les paramètres de chauffage et d'étirement sont imposés de manière à créer des ouvertures d'un diamètre de l'ordre du micromètre. Le verre est enduit à proximité de la pointe avec un gel de silicone ("Sylgard"), afin de réduire la capacité électrique de la pipette. L'extrémité est polie par chauffage sur une microforge ce qui la rend moins anguleuse et facilite l'adhésion du verre sur la membrane.

La technique du patch-clamp consiste à effectuer le scellement d'une micropipette sur un protoplaste grâce à un micromanipulateur contrôlé sous microscope. La qualité du scellement est évaluée à travers la résistance du système grâce à un test électrique. Elle est améliorée par succions légères et répétées qui permettent d'augmenter l'adhésion de la membrane plasmique sur le verre. Lorsque la résistance électrique approche le gigaohm ("Gigaseal"), on se trouve en configuration "cellule attachée" qui permet de faire des enregistrements de canaux unitaires (figure A-2B). Le passage en configuration cellule-entière se fait généralement par un brusque saut de potentiel accompagné d'une brève succion. Le disque de membrane à l'extrémité de la pipette est alors brisé et le contenu cytoplasmique est dilué en quelques minutes dans la solution de pipette de volume fortement supérieur (figure A-3). Dans ces conditions, les compositions des milieux externe et interne sont imposées et le courant enregistré est porté par la population totale des canaux de la membrane du protoplaste. On peut passer en configuration "outside-out" pour réduire la taille de la membrane à quelques micromètres carrés en éloignant la pipette du protoplaste, ce qui permet de mesurer sur ce petit morceau de membrane ("patch") des courants portés par seulement quelques canaux (figure A-2E).

Le voltage-clamp consiste à imposer une tension et enregistrer le courant qui en résulte. En patch-clamp, la même paire d'électrodes assure les deux fonctions grâce à un circuit amplificateur inverseur (figure A-9). L'amplificateur (Axopatch 200A, Axon instrument) est piloté par un ordinateur équipé du logiciel Pclamp6 (Axon Instrument), qui permet de créer et d'utiliser des protocoles de potentiels. Ceux-ci seront décrits un peu plus loin et sont adaptés aux types de canaux étudiés. Les courants enregistrés en patch-clamp seront exprimés par la suite soit en valeur brute (pA), soit sont ramenés à la capacité du protoplaste (densité de courant, pA/pF), sachant que 1 cm^2 de surface de membrane a une capacité de 10^6 pF (Hille, 1992).

4- Pool d'ARNm et banques d'expression

a- Choix du matériel biologique

Des graines d'*Arabidopsis thaliana* ont été stérilisées à l'hypochlorite 12,5 % durant 5 minutes puis rincées, stratifiées pendant 3 jours et mises en culture dans différentes conditions:

- en pot dans la serre pendant 18 jours
- milieu ABIS (figure A-6A) liquide, 150 rpm - lumière continue pendant 11 jours
- milieu ABIS liquide, 150 rpm - obscurité pendant 11 jours
- milieu minimum liquide, 150 rpm - lumière continue pendant 11 jours
- milieu ABIS liquide + 1 μ M AIA au 9^e jour, 150 rpm - lumière continue pendant 11 jours
- milieu ABIS liquide + 1 μ M ABA au 9^e jour, 150 rpm - lumière continue pendant 11 jours
- milieu ABIS liquide + 1 mM H₂O₂ au 9^e jour, 150 rpm - lumière continue pendant 11 jours
- milieu ABIS liquide + 500 mM mannitol au 9^e jour, 150 rpm - lumière continue pendant 11 jours

Milieu minimum (sans nitrate ni sulfate): glutamine 4 mM - MgAcetate 2 mM - KH₂PO₄ + K₂HPO₄ 2,5 mM - KOH 2,5 mM - Mes 1 mM - CaOH 1 mM - FeEDTA 50 μ M - saccharose 10 g/L - malate (pH 6,1)

b- Extraction des ARN poly-adenylés

Les plantules sont pesées, séchées et les ARN totaux sont extraits. Pour cela, les plantules sont broyées dans l'azote liquide et le broyat (500 mg) est bien suspendu dans 5 ml de TRIzol LS Reagent (GibcoBRL). 1 ml de chloroforme est ajouté, le mélange est passé au vortex (15 sec) et incubé à température ambiante (2-3 min). Une centrifugation (14000 rpm, 15 min) permet l'obtention de deux phases. Les ARNs dans la phase aqueuse sont précipités à l'isopropanol (2,5 ml, 10 min, 25 °C). Une nouvelle centrifugation (14000 rpm, 10 min) permet d'obtenir un culot qui est rincé à l'éthanol 70 % (1 mL) puis séché à l'air libre. Le culot est ensuite resuspendu dans de l'eau DEPC (100 μ L, 55 °C, 10 min) et lavé au phénol (100 μ L, 5 min). Une centrifugation (14000 rpm, 4 min) permet de récupérer 100 μ L de phase aqueuse qui est lavée au Chloroforme/IAA (100 μ L). Après une nouvelle centrifugation (14000 rpm, 4 min), les ARNs de la phase aqueuse sont précipités par addition de 0,1 volume d'une solution DEPC d'acétate de sodium 3 M et deux volumes d'éthanol absolu. Le mélange est conservé au froid (-80 °C) pendant 30 minutes et les ARNs sont culottés (14000 rpm, 15 min).

Les ARN polyA sont extraits en utilisant le Kit Dynabeads (Dyna). Le principe en est l'utilisation de bille ferrique sur lesquelles sont liés covalamment des oligonucléotides polyT. Dans des conditions de stringences faibles les ARN polyA s'y fixent et peuvent être retenus sur les billes elles-mêmes retenues par un aimant. Le surnageant contenant les ARN non polyA peut être éliminé et les billes rincées. Les ARN polyA sont décrochés par une solution de forte stringence.

c- Vers la constitution de la banque d'expression en système hétérologue

Nous avons utilisé pour construire une banque d'expression en système hétérologue à partir des ARN polyA d'*Arabidopsis thaliana*, le kit *SMART cDNA*

Library Construction Kit (Clontech). Dans un premier temps, une réverse transcription en utilisant un oligonucléotide (1) formé par une série de dT et un site de restriction pour l'enzyme Sfi1B permet d'obtenir des hétéromères ARN/ADN. L'enzyme de transcription réverse que nous avons utilisée est la M-MuLV Reverse Transcriptase (BioLabs). Elle a la capacité d'ajouter des CTP à l'extrémité du brin d'ADN complémentaire. L'oligonucléotide (2) peut s'y fixer pour servir d'amorce. La seconde étape est une PCR en utilisant d'une part l'oligonucléotide déjà utilisé (1) lors de la réverse transcription et un oligonucléotide (3) dérivé de l'oligonucléotide (2).

Ce système permet d'enrichir la banque en ADNc pleine longueur et est réputé pour ne pas s'appauvrir en ADNc de grande taille. Les séquences de la banque se présentent alors comme des ADNc contenant une ou plusieurs séquences ouvertes de lecture encadrées par les sites Sfi1A et B.

- (1) 5'- ATTCTAGAGGCGGAGG/CGGCCGACATG-d(T)₃₀-N-N' -3'
avec N = A, G ou C et N' = A, G, C ou T
Le site de restriction Sfi1B est en gras et le site de coupure indiquée (/)
- (2) 5'- AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTA/TGGCCGGG -3'
Le site de restriction Sfi1A est en gras et le site de coupure indiquée (/)
- (3) 5'- AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT -3'

5- Electrophysiologie sur ovocyte de Xénope (*Xenopus leavis*)

a- Entretien des Xénopes

Les grenouilles femelles de l'espèce *Xenopus leavis* sont conservées dans des bacs de 15 litres (2-5 grenouilles par bac). L'eau en est renouvelée tous les 4 ou 5 jours avec de l'eau ayant reposé une semaine (et qui a perdu une partie de son chlore). A cette occasion, les xénopes sont nourris avec du cœur de volaille cru (1/2 cœur pour 5 grenouilles).

b- Prélèvement, traitement et injection des ovocytes

Les ovocytes sont obtenus chirurgicalement: le xénope est anesthésié par abaissement progressive de la température à 4 °C. La peau du bas de l'abdomen est incisée, puis la paroi musculaire sous-jacente donnant ainsi accès aux organes de la cavité abdominale. Deux lobes d'un des ovaires sont sectionnés et prélevés. Les deux tissus incisés de la plaie sont refermés par 2 à 4 points de suture chacun.

Les lobes des ovaires sont recueillis dans du milieu OR2 (MgCl₂ 1 mM - NaCl 82.5 mM - KCl 2 mM - Hepes 5 mM - NaOH (pH 7,5)) et les ovocytes sont séparés avec de fines pinces en petits paquets d'une dizaine. La première étape consiste en une digestion enzymatique d'une heure dans un milieu OR2 contenant de la collagénase A (2 U/ml) à 25°C sous faible agitation. Malgré ce traitement, les ovocytes ne sont pas encore séparés. Après 4 rinçages d'OR2 contenant de 1 mg/ml de sérum albumine bovine (SAB), la dissociation se fait dans le tampon K hypertonique (K₂HPO₄ 100 mM - SAB 1 % - HCl (pH 6,5)) en faible agitation pendant 1 heure; elle est facilitée par le passage des "grappes" d'ovocytes toutes les 15 minutes dans une pipette pasteur dont on a coupé l'extrémité de manière à réaliser une ouverture de 3 à 5 millimètres. Enfin, les ovocytes séparés sont bien rincés dans du milieu de Barth's (NaCl 88 mM -

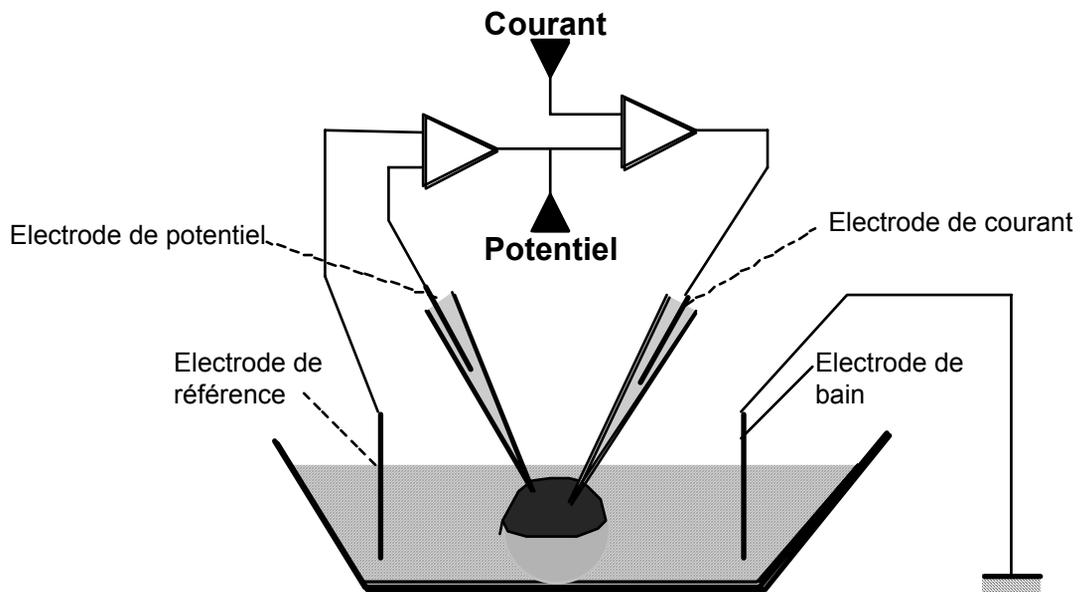


Figure A-10: Schéma du dispositif de voltage clamp sur ovocyte de xénope. Il permet d'imposer une tension à la membrane et d'enregistrer un courant.

CaCl₂ 0,41 mM - NaHCO₃ 2,4 mM - Ca(NO₃)₂ 0,33 mM - MgSO₄ 0,82 mM - KCl 1 mM - gentamycine 1 mg/l - Hepes 10 mM - NaOH(pH 7,4)). Ils sont triés en fonction de leur taille, de leurs couleurs et de leurs imperfections. Seuls les ovocytes intacts des stades terminaux (V et VI) sont conservés à 19 °C sans agitation avant d'être utilisés le lendemain pour les injections.

Pour l'injection, des pipettes de verre sont étirées de manière à obtenir des diamètres d'ouverture à l'extrémité de l'ordre de 10 µm. Elles sont montées sur un système de micro injection à piston de type Drummon fixé à un micromanipulateur et contiennent dans leur majeure partie de l'huile minérale. L'extrémité est emplie par aspiration de quelques micro litres de la solution aqueuse (H₂O, ARNm, ARNc, K₂SO₄ ...) à injecter. Les ovocytes sédimentent au fond d'une boîte de Pétri contenant de l'OR2. En utilisant une loupe binoculaire, il est aisé d'appliquer la pointe de la pipette sur le pôle végétatif (= le plus clair) et d'augmenter la pression jusqu'au percement de la membrane. Le volume injecté est de l'ordre de 50 nL soit 10 % du volume de l'ovocyte.

c- Transcription in vitro d'ARNc

5 µg du plasmide sont linéarisés par Not1 (à la fin de la séquence à transcrire), lavés par 2 étapes de phénol/chloroforme et précipités à l'acétate de sodium (0,1 volume à 3 M, pH 5,2) et éthanol 95 % (2,5 volume). La transcription est effectuée durant 1h30 à 37 °C dans 100 µL dont 20 µL de tampon pour la polymérase T3 5X (Proméga), 1 mM ATP, 1 mM CTP, 1 mM UTP, 0,2 mM GTP, 5 mM DTT, 0,6 mM m⁷G(5')ppp(5')G, 100 u RNAsin (Proméga) et 100 u polymérase T3 (Proméga). 50 unités de la polymérase sont ensuite rajoutés pour une nouvelle incubation d'1 heure. L'ADN du plasmide est dégradé (30 min à 37 °C) par l'ajout de 4 u DNase RQ1 (Proméga) avec 100 u de RNAsine. Le produit de la transcription (ARN complémentaire) est purifié par deux étapes d'éthanol/chloroforme et une étape de phénol seul puis précipité à l'acétate de sodium (0,1 volume à 3 M, pH 5,2) et éthanol 95 % (2,5 volume). Il est repris dans 15 µL contenant de la RNAsine (2u/µL) et dosé au spectrophotomètres (260 nm). La concentration doit être de l'ordre de 1 µg/µL.

d- Voltage-clamp à deux électrodes

Des pipettes de verre sont étirées sur une étireuse verticale (PA-81, Narishige) à partir des tubes de verre utilisés pour le patch-clamp. Les paramètres d'étirement sont fixés de manière à obtenir des résistances lors des expériences de l'ordre de 10 mOhms. Elles sont remplies avec du KCl 3 M.

L'ovocyte est maintenu au fond d'une chambre de plexiglas contenant de l'OR2 (MgCl₂ 1 mM - NaCl 82,5 mM - KCl 2 mM - Hepes 5 mM - NaOH(pH 7,5)) additionné d'1 mM CaCl₂. Grâce à une loupe binoculaire il est possible d'appliquer les deux électrodes sur l'ovocyte et de les faire pénétrer dans le cytoplasme. Le potentiel de membrane est aux environs de -50 mV sur des ovocytes "sauvages" et doit être identique avec les deux électrodes. L'ovocyte est rincée avec l'OR2 + 1 mM CaCl₂ durant quelques minutes.

En mode voltage-clamp, une des électrode sert à mesurer le voltage et l'autre à injecter du courant de manière à obtenir le potentiel désiré par le protocole (figure A-

Tableau A-1: les différentes espèces et souches de levure.

Espèce	Souche	Phénotypes	Génotype/marqueur
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	w303-1B	Sauvage	<i>ura3-1 trp1-1 leu2-3 ade2-1 his3-11,15</i>
	CN3	Mutant dans le protéolipide PMP3 Membrane plasmique hyperpolarisée (Navarre <i>et al.</i> , 2000)	<i>Idem + ²pmp3::TRP1</i>

<i>Hansenula polymorpha</i>	NCYC 495	Sauvage	<i>Leu⁻</i>

<i>Pichia pastoris</i>	GS115	Sauvage	<i>His⁻</i>
	(Invitrogen) GS115n	Même souche exprimant la nitrate reductase <i>NIA2</i> d' <i>Arabidopsis</i> (Su <i>et al.</i> , 1996)	

Tableau A-2: Les différents plasmides de levure utilisés. 'Ma' Marqueur, 'Pr' Promoteur, 'OR' origine de répllication.

Nom	Espèce	Description succincte	Référence
pRS315	<i>S. cerevisiae</i>	Ma: Leu2 - OR: ARSH4 centromérique (utilisé comme contrôle malgré l'OR différente)	fourni par F. Parcy
pRS1024	<i>S. cerevisiae</i>	Ma: Leu2 - Pr: PMA - OR: 2μ	Gaxiola <i>et al.</i> , 1997
pRG120	<i>S. cerevisiae</i>	Idem avec le TmCLC0	Gaxiola <i>et al.</i> , 1997
pRG175	<i>S. cerevisiae</i>	Idem avec le AtCLCa	Gaxiola <i>et al.</i> , 1997
pRG176	<i>S. cerevisiae</i>	Idem avec le AtCLCc	Gaxiola <i>et al.</i> , 1997
pRG178	<i>S. cerevisiae</i>	Idem avec le AtCLCd	Gaxiola <i>et al.</i> , 1997
pDR195	<i>S. cerevisiae</i>	Ma: Ura3 - Pr: PMA - OR: 2μ	
pDR195a	<i>S. cerevisiae</i>	Idem avec HsCLC1-WT (fragment PCR au site BamH1)	
pDR195b	<i>S. cerevisiae</i>	Idem avec HsCLC1-230A (fragment PCR au site BamH1)	
pDR195c	<i>S. cerevisiae</i>	Idem avec HsCLC1-230E (fragment PCR au site BamH1)	
pDR195d	<i>S. cerevisiae</i>	Idem avec HsCLC1-233A (fragment PCR au site BamH1)	
pHIPX7A	<i>Hansenula p.</i>	pHIPX7 + OR: ARS (fragment pCR de pOW1) www.biol.rug.nl/em/tools.htm	
pHIPX7Aa	<i>Hansenula p.</i>	Idem avec HsCLC1-WT (fragment PCR au site BamH1)	
pHIPX7Ab	<i>Hansenula p.</i>	Idem avec HsCLC1-230A (fragment PCR au site BamH1)	
pHIPX7Ac	<i>Hansenula p.</i>	Idem avec HsCLC1-230E (fragment PCR au site BamH1)	
pHIPX7Ad	<i>Hansenula p.</i>	Idem avec HsCLC1-233A (fragment PCR au site BamH1)	

10). L'amplificateur (GeneClamp 500, Axon Instrument) est contrôlé par un PC équipé du logiciel Pclamp 5 (Axon Instrument). Le seul protocole de voltage que j'ai utilisé est constitué de pulses de 2680 ms de 70 mV à -190 mV avec un pas de 20 mV et sont réalisés tous les 8 secondes. Entre chaque pulse, la membrane est maintenue à un potentiel de -30 mV.

6- Les systèmes "levure"

a- La levure *Saccharomyces cerevisiae*

Culture

La levure de bière *Saccharomyces cerevisiae* est maintenue à 30 °C sur boîte YPD (Yeast extract 1 % - Bacto-peptone 2 % - Glucose 2 % - +ou- Bactoagar 1,5 %) ou YNB (Bacto yeast nitrogen base without amino acids 0,17 % - NH₂SO₄ 0,5 % - D-glucose 2 % - Mes 20 mM - pH ajusté à 6 avec du NaOH - +ou- bactoagar 1,5 %) contenant les marqueurs d'auxotrophie adaptés à la souche et aux vecteurs (généralement: histidine 20 mg/L, leucine 100 mg/L, adénine 10 mg/L, tryptophane 50 mg/L ou uracile 20 mg/L). Les souches de levure utilisées durant la thèse sont succinctement décrites dans le tableau A-1.

Transformation

La souche à transformer est mise en culture dans du YPD pendant une nuit à 30°C. Le lendemain, la culture est relancée en diluant cette culture primaire dans 50 mL de YPD de manière à obtenir une DO à 600 nm de 0,4. Après de 2 à 4 heures, les levures sont culottées (2500 rpm, 10 min) et resuspendues dans 40 mL de milieu 1XTE (Tris 10 mM - EDTA 1 mM). Les levures sont de nouveau culottées (2500 rpm, 10 min), resuspendues dans 2 ml de 1XLiAc/0,5XTE (Tris 5 mM - EDTA 0,5 mM - LiAcétate 100 mM) et incubées 10 min à température ambiante. 100 µL de levure sont alors mélangés à 100 µL d'ADN de sperme de saumon préalablement dénaturé (5' à 95 °C) et 1 µg de vecteur à transformer. Ce mélange est ensuite bien mixé à 700 µL de 1XliAc/40%PEG-3350/1XTE (Tris 10 mM - EDTA 1 mM - PEG-3350 40 % - LiAcétate 100 mM) et incubé pendant 30 minutes à 30 °C. On y ajoute alors 88 µL de DMSO avant d'effectuer un choc thermique à 72°C pendant 7 minutes. Les levures sont ensuite culottées et lavées dans 1 mL de 1XTE puis étalées sur milieu sélectif. Les plasmides utilisés durant la thèse sont succinctement décrits dans le tableau A-2.

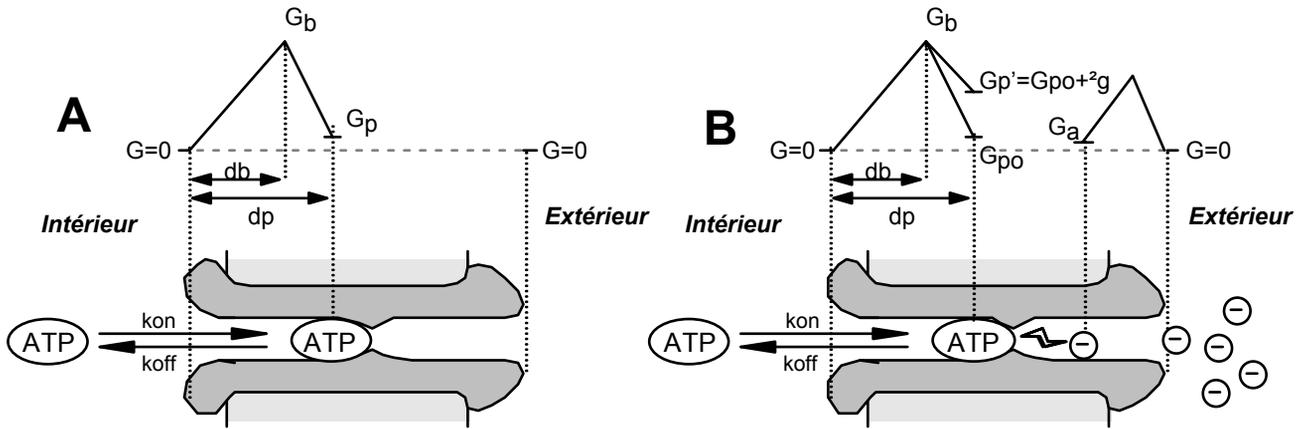
b- Les levures *Hansenula polymorpha* et *Pichia pastoris*

Les souches GS115 (Invitrogen) et GS115h (Su *et al.*, 1997) de levure *Pichia pastoris* sont cultivées dans du milieu YPD identique à celui de *S. cerevisiae*. Les expériences de croissance ont été effectuées dans un milieu PpYNB (Bacto yeast nitrogen base without amino acids 0,17 % - NH₂SO₄ 35 mM - glycérol 1 % - +ou- méthanol 1 % - NaMolybdène 0,075 mM - histidine 20 mg/L) additionné ou non de quantités variables de KCl, KNO₃ ou KClO₃ (0,3 à 100 ou 300 mM selon les sels). La souche GS115h contient le gène de la nitrate réductase NIA2 d'*Arabidopsis* dont la

transcription est sous le contrôle d'un promoteur inductible par le méthanol (Su *et al.*, 1997).

Hansenula polymorpha (souche NCYC 495) est cultivée à 37 °C soit en milieu non sélectif riche, HpYPD (Yeast extract 1 % - bacto-peptone 1 % - D-glucose 1 % - +ou- Bactoagar 1,5 %) soit en milieu sélectif HpYNB (Bacto yeast nitrogen base without amino acids 0,17 % - KNO₃ 50 mM - D-glucose 1 % - +ou- leucine 56 mg/l - +ou- Bactoagar 1,5 %). Sa transformation se fait par électroporation. Les levures sont rendues compétentes comme l'ont décrit Faber et ses collègues (Faber *et al.*, 1994): un erlen de 200 ml de YPD estensemencé avec 2 ml d'une culture au plateau et est placé à 37°C en agitation (150 rpm) jusqu'à ce que la DO à 663 nm soit de 1.2-1.5 (cela prend environ 8 heures). Les levures sont alors centrifugées (3000 rpm, 10 min, température ambiante) puis resuspendues dans un tampon DTT (DTT 25 mM - K₂HPO₄ 50 mM - KOH (pH 7,5)) pendant 15 minutes à 37 °C. Par la suite, elles sont maintenues le plus proche possible de 0°C. Elles sont d'abord lavées deux fois (dans 200 ml puis dans 100 ml) dans le tampon d'électroporation STM (Sucrose 270 mM - MgCl₂ 1 mM - Tris/HCl (pH 7,5) 10 mM) puis centrifugées une dernière fois pour être re-suspendues dans 1 ml de STM. Des fractions alicotées de 50 µL sont alors congelées dans l'azote liquide et conservées à -80 °C.

La transformation se fait par électroporation. L'ADN et les cellules décongelées sont mêlés à 4°C et le mélange est placé dans une cuve d'électroporation préalablement refroidie (1 mm). Les paramètres d'électroporation sont fixés à 7.5 kV/cm, 40 µF, 132 mOhm, ce qui assure un pulse de l'ordre de 2,5 ms. Les cellules sont reprises dans 1 ml de milieu HpYPD et incubées 1 heure à 37°C sans agitation. Elles sont ensuite centrifugées et rincées 1 fois avec du milieu sélectif HpYND liquide. Un volume connu est alors étalé sur boîte de Pétri de milieu sélectif. L'efficacité de transformation est observée au bout de 3 ou 4 jours.



Niveaux d'énergie:

G_b	25
G_{po}	1,1
$2g$	15
G_a	-1

Distances:

db	0,51
dp	0,7

Coefficient de Hill:

h	0,4
-----	-----

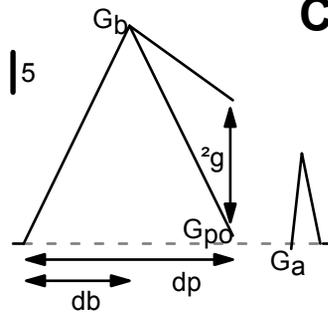
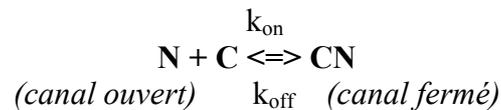


Figure A-11: Modèle d'obstruction du pore par les nucléotides. (A) Obstruction simple et topologie du pore. (B) Intégration du phénomène de répulsion par les anions externes. (C) Application numérique. Les valeurs ont été obtenues de façon empirique. Les distances sont exprimées en fraction de 1 et les niveaux d'énergie en unité 'RT' (avec $1 RT = 2,44 \text{ kJ/mol}$)

Annexe C- Complément à l'article n°2: un modèle informatique simple rend compte de l'obstruction par les nucléotides du pore du canal rapide

1- Principe

Le canal anionique rapide (C) est obstrué (pour donner un complexe CN) par une molécule de nucléotide (N) recrutée d'une manière dépendante du voltage à partir de la face cytosolique de la membrane. L'équation enzymatique et l'équation différentielle correspondante, s'écrivent donc:



$$dC/dt = -dCN/dt = k_{off}.CN - N.k_{on}.C \text{ avec } C+CN = Cst$$

La résolution de cette équation nous donne la fonction $C(t) = f(C_o, CN_o, k_{on}, k_{off}, t)$ qui décrit la quantité de canaux ouverts au cours du temps en fonction des constantes et des conditions initiales:

$$C(t) = [k_{off}.(C_o+CN_o)/(N.k_{on}+k_{off})] + [(N.k_{on}.C_o-k_{off}.CN_o)/(N.k_{on}+k_{off})].\exp[-(N.k_{on}+k_{off}).t]$$

avec C_o et CN_o les quantités de canaux ouverts et fermés à $t=0$. (On a donc $C + CN = C_o + CN_o = Cst$)

On peut donc considérer qu'il existe un site de fixation des nucléotides à une certaine profondeur dans la membrane au niveau du pore du canal. C'est un cas relativement facile à modéliser avec un système de barrières et de puits (Hille, 1992): on considère le chemin parcouru dans la membrane par le nucléotide comme une alternance d'énergies hautes (noté G_b) -ou barrières qui sont des zones de déséquilibres- et d'énergies basses (noté G_p) -ou puits qui sont quand à elles des zones d'équilibre et donc des sites de fixation du nucléotides (figure A-11A). Ce formalisme permet de calculer des constantes d'association k_{on} (1) et de dissociation k_{off} (2) qui s'expriment en fonction des constantes cinétiques de base K_{on} (3) et K_{off} (4), lorsque aucun potentiel n'est imposé à la membrane (à $V_m=0$):

$$k_{on} = K_{on} \cdot \exp(d_b.d_p.z_n.F.E / RT) \quad (1)$$

$$k_{off} = K_{off} \cdot \exp(d_b.(1-d_p).F.E / RT) \quad (2)$$

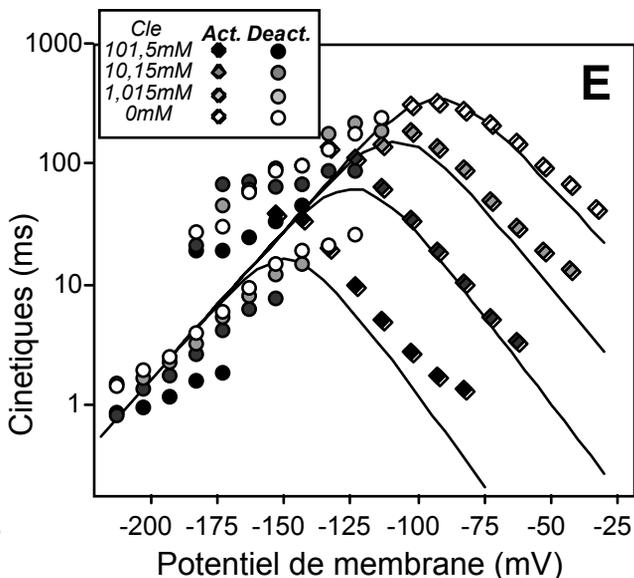
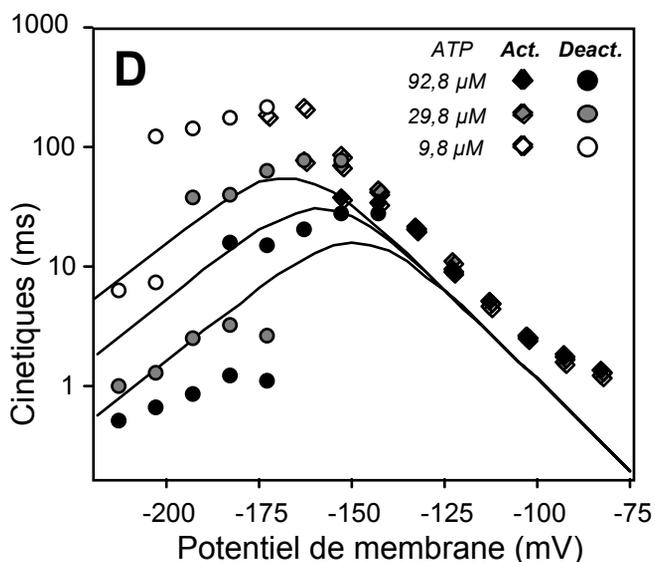
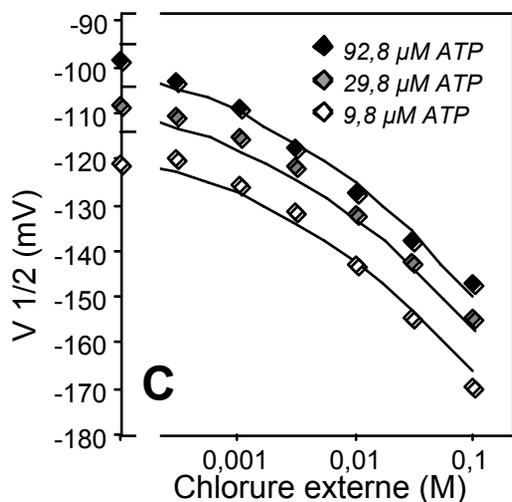
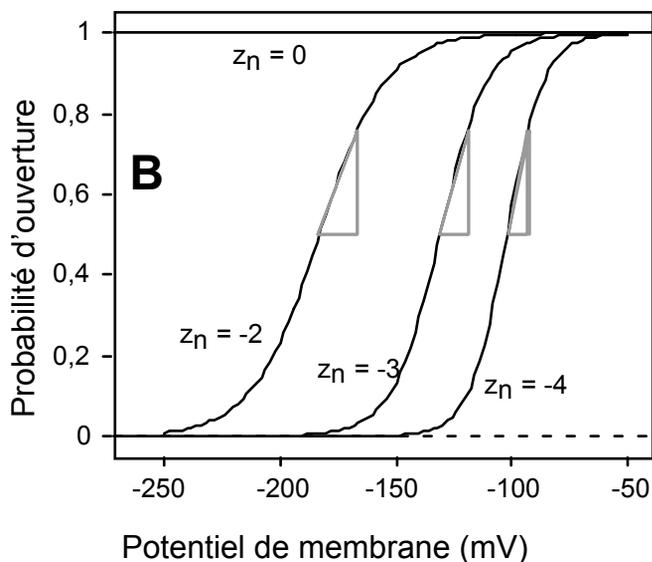
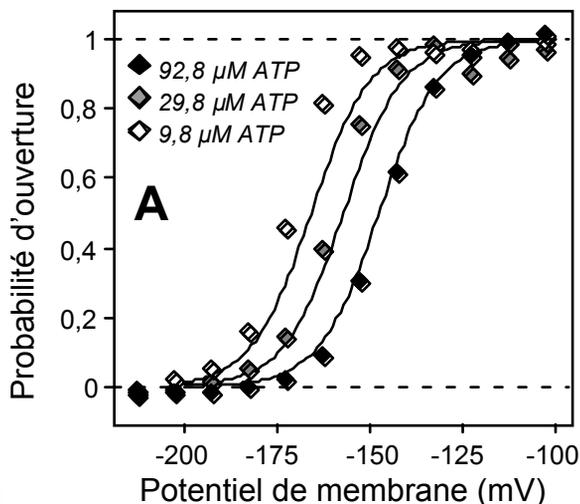
$$K_{on} = (k.T/h) \cdot \exp[-G_b] \quad (3)$$

$$K_{off} = (k.T/h) \cdot \exp[-(G_b-G_p)] \quad (4)$$

Les symboles k , T et h ont leur signification usuelle. Les autres symboles correspondent à la topologie du pore du canal (voir texte et schéma).

Figure A-12: Prédiction du modèle d'obstruction du canal par les nucléotides. Les résultats expérimentaux présentés ici proviennent majoritairement de l'article n°2 (s'y référer pour les conditions expérimentales). Les courbes sont calculées à partir du modèle proposé.

(A) Variation de la probabilité d'ouverture en fonction de la concentration en ATP libre. (B) Le modèle intègre bien la diminution de la charge du senseur lors de la diminution de la valence des nucléotides. (C) Effet de la concentration en chlorure externe pour 3 concentrations en ATP libre. (D) Les cinétiques de désactivation sont plus lentes si on diminue la concentration en ATP libre interne. Ce n'est pas le cas des cinétiques d'activation. (E) Les cinétiques d'activation sont plus lentes si on diminue la concentration en chlorure externe alors que les cinétiques de désactivation sont relativement peu affectées.



Les cinétiques du système (qu'elles soient d'activation ou de désactivation) ont alors comme formule:

$$T = 1/(k_{\text{off}} + [\text{ATP}] \cdot k_{\text{on}})$$

Nous avons modélisé l'effet dépendant de la dose des anions externes en introduisant dans le modèle un second site accessible à partir de la face externe de la membrane (figure A-11B) et qui possède ses propres caractéristiques énergétiques. Ceci permet de calculer $k(A)_{\text{on}}$ et $k(A)_{\text{off}}$, les constantes d'association et de dissociation d'une molécule d'anion avec le site en fonction des paramètres topologiques du pore et du voltage. Parce que cela semble être un phénomène très lié à la perméation et que la perméation est extrêmement rapide, nous avons considéré l'occupation comme à l'équilibre à chaque voltage. Il est donc facile de calculer la probabilité d'occupation P_{oc} du site à n'importe quel voltage. Elle s'exprime selon la formule Michaelienne:

$$P_{\text{oc}} = k(A)_{\text{off}} / ([\text{Cle}] - k(A)_{\text{on}}) = [\text{Cle}]^h / ([\text{Cle}]^h + \exp(G_a - d_a \cdot z_A \cdot F \cdot E_m / kT))$$

La synergie entre les deux sites est traduite par une valeur de puit pour les nucléotides dépendant de l'occupation (variant entre 0 et 1) des anions sur la face externe:

$$G_p = G_{p0} + \Delta g \cdot \text{occupation}$$

Si le site anion est très occupé, par exemple à un voltage favorable et à forte concentration en anions externes, le puit est peu profond et les nucléotides ont du mal à l'occuper car la valeur de k_{off} est majorée. A noter que selon les formules k_{on} n'est pas affectée par la profondeur du puits. Au contraire, si le site est peu occupé, le puits est très "profond" et les nucléotides l'occupent aisément.

2- Application numérique: il existe un jeu de valeurs permettant d'effectuer une approximation et de reproduire une grande partie des résultats...

A partir de ce modèle, il est possible de rechercher de façon empirique des valeurs permettant la meilleure approximation possible des observations expérimentales. L'encart C de la figure A-10 récapitule les caractéristiques topographiques du pore du canal. Nous avons donc essayé de retrouver une partie des résultats que nous avons décrits expérimentalement.

La premier point positif du modèle est qu'il permet de retrouver l'effet dépendant de la dose d'ATP: augmenter la concentration en nucléotide interne (dans ce cas un nucléotide quadrivalent), provoque un déplacement de la fermeture dépendante du voltage (figure A-12A) sans affecter la charge apparente du senseur. De plus, nous retrouvons une augmentation de la constante cinétique de fermeture avec la diminution de la concentration en nucléotide interne. Comme observé expérimentalement, la cinétique d'activation n'est pas affectée par les nucléotides (figure A-12D).

On observe une corrélation entre la charge portée par la particule bloquante z_n et la charge apparente du senseur de voltage (figure A-12B). Le modèle ne permet pas d'avoir accès à cette valeur mais cela se traduit par des courbes d'ouverture en fonction du voltage dont la pente au point d'inflexion est plus faible pour des particules bloquantes moins chargées: l'activité du canal est tout simplement moins dépendante du voltage. En théorie, avec des nucléotides non chargés ($z_n=0$), on devrait observer une abolition de la régulation par le voltage. Le modèle permet aussi de retrouver la disparition de la dépendance vis à vis du voltage en absence de nucléotide (non montré).

L'effet des concentrations en anions externes peut être lui aussi globalement retrouvé. Par exemple, diminuer la concentration en chlorure externe ferme le canal: expérimentalement cela se traduit par une diminution du $V_{1/2}$ (figure A-12C). De plus, les cinétiques d'activation sont dépendantes de la concentration en chlorure externe, mais celle-ci n'affecte pas les constantes cinétiques de fermeture (figure A-12E).

c- ...mais certains résultats ne sont pas explicables par le modèle

Si le modèle rend bien compte d'un certain nombre de données expérimentales, il est clair que la régulation par le voltage du canal est en fait plus complexe que ce que nous présentons dans l'article n°2 (Se référer à la discussion de l'article pour les limites du modèle). Les différents arguments sont d'une part des cinétiques bi-exponentielles et une diminution de la z_g dépendante des concentrations anioniques externes. Ce sont deux variations qui ne peuvent pas être "modélisées" dans le modèle simple que nous venons de décrire. Nous avons des hypothèses pour expliquer chacun de ces points mais elles ne permettent pas de rendre compte de façon synthétique de l'ensemble des caractéristiques du canal.

BIBLIOGRAPHIE



Bibliographie

- Abe T. (1981) Chloride Ion Efflux during an Action Potential in the Main Pulvinus of *Mimosa pudica*. *Bot Mag Tokyo* 94:379-383
- Ache P., Becker D., Ivashikina N., Dietrich P., Roelfsema M. R. et Hedrich R. (2000) GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K(+)-selective, K(+)-sensing ion channel. *2000* 486:93-98
- Agnel M., Vermaat T. et Culouscou J.-M. (1999) identification of three novel members of the calcium-dependent chloride channel (CaCC) family expressed in the digestive tract and trachea. *FEBS Lett* 455:295-301
- Aguilar-Bryan L., Nichols C. G., Wechsler S. W., Clement J. P., Boyd A. E., Gonzales G., Herrerasosa H., Nguy K. et Nelson D. A. (1995) Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 268:423-426
- Ahmad M. et Cashmore A. R. (1993) HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 366:162-166
- Allen G., Kwak J., Chu S., Llopis J., Tsien R., Harper J. et Schroeder J. (1999a) Cameleon calcium indicator reports cytoplasmic calcium dynamics in Arabidopsis guard cells. *Plant J* 19:735-747
- Allen G. J., Chu S. P., Harrington C. L., Schumacher K., Hoffmann T., Tang Y. Y., Grill E. et Schroeder J. I. (2001) A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* 411:1053-1057
- Allen G. J., Chu S. P., Schumacher K., Schimazaki C. T., Vafeados D., Kemper A., Hawke S. D., Tallman G., Tsien R. Y., Harper J. F., Chory J. et Schroeder J. I. (2000) Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in Arabidopsis det3 mutant. *Science* 289:2338-2342
- Allen G. J., Kuchitsu K., Chu S., Murata Y. et Schroeder J. I. (1999b) Arabidopsis abi1-1 and abi2-1 Phosphatase Mutations Reduce Abscisic Acid-Induced Cytoplasmic Calcium Rises in Guard Cells. *Plant Cell* 11:1985-1798
- Anderson J. A., Huprikar S. S., Kochian L. V., Lucas W. J. et Gaber R. F. (1992) Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3736-3740
- Anderson M., Berger H., Rich D., Gregory R., Smith A. et Welsh M. (1991a) Nucleotide triphosphate are required to open the CFTR chloride channel. *Cell* 67:775-784
- Anderson M., Gregory R., Thompson S., Souza D., Paul S., Mulligan R., Smith A. et Welsh M. (1991b) Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 253:202-207
- Avila J., Gonzalez C., Brito N. et Siverio J. M. (1998) Clustering of the YNA1 gene encoding a Zn(II)2Cys6 transcriptional factor in the yeast *Hansenula polymorpha* with the nitrate assimilation genes YNT1, YNI1 and YNR1, and its involvement in their transcriptional activation. *Biochem J* 335:647-652
- Avila J., Perez M. D., Brito N., Gonzalez C. et Siverio J. M. (1995) Cloning and disruption of the YNR1 gene encoding the nitrate reductase apoenzyme of the yeast *Hansenula polymorpha*. *FEBS Lett* 366:137-142
- Axelos M., Curie C., Mazzolini L., Bardet C. et Lescure B. (1992) A protocol for transient gene expression in *Arabidopsis thaliana* protoplasts isolate from cell suspension cultures. *Plant Physiol Biochem* 30:123-128
- Barbara J.-G., Stoeckel H. et Takeda K. (1994) Hyperpolarization-activated inward chloride current in protoplasts from suspension-cultured carrot cells. *Protoplasma* 180:136-144
- Barbier-Brygoo H., Vinauger M., Colcombet J., Ephritikhine G., Frachisse J.-M. et Maurel C. (2000) Anion channels in higher plants: functional characteristic, molecular structure and physiological role. *Biochim Biophys Acta* 1465:199-218
- Barthes L., Bousser A., Hoarau J. et Deléens E. (1995) Reassessment of the relationship between nitrogen supply and xylem exudation in detopped maize seedlings. *Plant Physiol Biochem* 33:173-183
- Bauer B. E., Wolfger H. et Kuchler K. (1999) Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim Biophys Acta* 1461:217-236
- Bauer C. K., Steinmeyer K., Schwarz J. R. et Jentsch T. J. (1991) Completely functional double-barreled chloride channel expressed from a single *Torpedo* cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:11052-11056
- Bertl A., Anderson J. A., Slayman C. L. et Gaber R. F. (1995) Use of *Saccharomyces cerevisiae* for patch-clamp analysis of heterologous membrane proteins: characterization of Kat1, an inward-rectifying K⁺ channel from *Arabidopsis thaliana*, and comparison with endogenous yeast channels and carriers. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:2701-5

- Bethmann B., Thaler M., Simonis W. et Schönknecht G. (1995) Electrochemical potential gradients of H⁺, K⁺, Ca²⁺ and Cl⁻ across the tonoplast of the green alga *Eremosphaera viridis*. *Plant Physiol* 109:1317-1326
- Biela A., Grote K., Otto B., Hoth S., Hedrich R. et Kaldenhoff R. (1999) The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. *Plant J* 18:565-570
- Binet M.-N., Wendehenne D., Bourque S., Lebrun-Garcia A., Ouaked F., Chiltz A., Schäffner T. et Pugin A. (1997) Les protéines des membranes végétales: Clonage par expression de gènes de protéines membranaires de plantes dans les cellules COS. *Ecole de Biologie Végétale*:165-171
- Boller T. (1987) Hydrolytic enzymes in plant disease resistance. In *Plant-Microbe Interactions, Molecular et Genetic Perspectives*: New York, Macmillan.
- Boorer K. J., Forde B. G., Leigh R. A. et Miller A. J. (1992) Functional expression of a plant plasma membrane transporter in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett* 302:166-168
- Brito N., Avila J., Perez M. D., Gonzalez C. et Siverio J. M. (1996) The genes YN11 and YN1, encoding nitrite reductase and nitrate reductase respectively in the yeast *Hansenula polymorpha*, are clustered and coordinately regulated. *Biochem J* 317:89-95
- Bröer A., Wagner C., Lang F. et Bröer S. (2000) Neutral amino acid transporter ASCT2 displays substrate-induced Na⁺ exchange and a substrate-gated anion conductance. *Biochem J* 346:705-710
- Buchanan B. B., Gruissem W. et Jones L. J. (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*: Rockville, Maryland, American Society of Plant Physiologists.
- Buettner R., Papoutsoglou G., Scemes E., Spray D. C. et Dermietzel R. (2000) Evidence for secretory pathway localization of a voltage-dependent anion channel isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3201-3206
- Cazalé A.-C., Rouet-Mayer M.-A., Barbier-Brygoo H., Mathieu Y. et Laurière C. (1998) Oxidative burst and hypoosmotic stress in tobacco cell suspensions. *Plant Physiol* 116:659-669
- Cazalé A. C. (1999) Réponses de cellule de Tabac en suspension à un stress hypoosmotique: oxygène activé et protéines kinases. *Thèse de l'Université de Paris VI Pierre et Marie Curie*
- Cazalé A. C., Droillard M.-J., Wilson C., Heberle-Bors E., Barbier-Brygoo H. et Laurière C. (1999) MAP kinase activation by hypoosmotic stress of tobacco cell suspensions: towards the oxidative burst response? *Plant J* 19:297-307
- Cerana R. et Colombo R. (1992) K⁺ and Cl⁻ conductance of *Arabidopsis thaliana* plasma membrane at depolarized voltages. *Bot Acta* 105:273-277
- Cheng S. H., Gregory R. J., Marshall J., Pau S., Souza D. W., White G. A., O'riordan C. R. et Smith A. E. (1991) Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 63:827-834
- Cho M. H. et Spalding E. P. (1996) An anion channel in *Arabidopsis* hypocotyls activated by blue light. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:8134-8138
- Clough S. J., Fengler K. A., Yu I. C., Lippok B., Smith R. K. J. et Bent A. F. (2000) The *Arabidopsis* dnd1 "defense, no death" gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:9323-9328
- Collinge D. B., Kragh K. M., Mikkelsen J. D., Nielsen K. K., Rasmussen U. et Vad K. (1993) Plant chitinases. *Plant J* 3:31-40
- Cosgrove D. (1981) Rapid Suppression of Growth by Blue Light. *Plant Physiol* 67:584-590
- Cosgrove D. J. (1997) Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell* 9:1031-1041
- Cosgrove D. J. et Hedrich R. (1991) Stretch-activated chloride, potassium, and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* 186:143-153
- Craw W. J. (1976) II Negative Feedback Regulation of Transport in Cells. The Maintenance of Turgor, Volume and Nutrient Supply. *transport in Plants II / Part A / Cells*
- Crawford N. M. (1995) Nitrate : nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* 7:859-868
- Cutler S., Ghassemian M., Bonetta D., Cooney S. et Mccourt P. (1996) A protein farnesyltransferase involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Science* 273:1239-1241
- Czempinski K., Zimmermann S., Ehrhardt T. et Müller-Röber B. (1997) New structure and function in plant K⁺ channels : KCO1, an outward rectifier with a steep Ca²⁺ dependency. *EMBO J* 16:2565-2575
- Delhaize E. et Ryan P. R. (1995) Aluminium toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol* 107:315-321
- Delhaize E., Ryan P. R. et Randall P. J. (1993) Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol* 103:695-702

- Dietrich P. et Hedrich R. (1994) Interconversion of fast and slow gating modes of GCAC1, a Guard Cell Anion Channel. *Planta* 195:301-304
- Dietrich P. et Hedrich R. (1998) Anions permeate and gate GCAC1, a voltage-dependent guard cell anion channel. *Plant J* 15:479-487
- Dieudonné S., Forero M. E. et Llano I. (1997) Two different conductances contribute to the anionic currents recorded in *Coffea arabica* protoplasts. *J Memb Biol* 159:83-94
- Dixon D. P., Cummins L., Cole D. J. et Edwards R. (1998) Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Curr Opin Plant Biol* 1:258-266
- Dworakowska B. et Dolowy K. (2000) Ion channels-related diseases. *Acta Biochim Pol* 47:685-703
- Edwards R., Dixon D. P. et Walbot V. (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci* 5:193-198
- Elkeles A., Breiman A. et Zizi M. (1997) Functional Differences among Wheat Voltage-dependent Anion Channel (VDAC) Isoforms Expressed in Yeast. *J Biol Chem* 272:6252-6260
- Elkeles A., Devos K. M., Graur D. et Zizi M. (1995) Multiple cDNAs of wheat voltage-dependent anion channels (VDAC): isolation, differential expression, mapping and evolution. *Plant Mol Biol* 29:109-124
- Elzenga J. T. M., Prins H. B. A. et Vanvolkenburgh E. (1995) Light-induced membrane potential changes of epidermal and mesophyll cells in growing leaves of *Pisum sativum* arg. *Planta* 197:127-134
- Elzenga J. T. M. et Van Volkenburgh E. (1997a) Characterisation of a light-controlled anion channel in the plasma membrane of mesophyll cells of pea. *Plant Physiol* 113:1419-1426
- Elzenga J. T. M. et Van Volkenburgh E. (1997b) Kinetics of Ca²⁺- and ATP-dependant, voltage-controlled anion conductance in the plasma membrane of mesophyll cells of *Pisum sativum*. *Planta* 201:415-423
- Endicott J. A. et Ling V. (1988) The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu Rev Biochem* 58:137-171
- Faber K. N., Haima P., Harder W., Veenhuis M. et Ab G. (1994) Highly-efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha*. *Curr Genet* 25:305-310
- Fahlke C., Yu H. T., Beck C. L., Rhodes T. H. et George A. L. (1997) Pore-forming segments in voltage-gated chloride channels. *Nature* 390:529-532
- Fairman W. A. et Amara S. G. (1999) Functional diversity of excitatory amino acid transporters: ion channel and transport modes. *Am J Physiol* 277:F481-F486
- Fairman W. A., Vandenberg R. J., Arriza J. L., Kavanaugh M. P. et Amara S. G. (1995) An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 375:599-603
- Falke L. C., Edwards K. L., Pickard B. G. et Misler S. (1988) A stretch-activated anion channel in tobacco protoplasts. *FEBS Lett* 237:141-144
- Felix G., Duran J. D., Volko S. et Boller T. (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J* 18:265-276
- Felle H., Peters W. et Palme K. (1991) The electrical response of maize to auxins. *Biochim Biophys Acta* 1064:199-204
- Felle H. H. (1994) The H⁺/Cl⁻ symporter in root-hair cells of *Sinapis alba*. *Plant Physiol* 106:1131-1136
- Felle H. H., Hanstein S., Steinmeyer R. et Hedrich R. (2000) Dynamics of ionic activities in the apoplast of the sub-stomatal cavity of intact *Vicia faba* leaves during stomatal closure evoked by ABA and darkness. *Plant J* 24:297-304
- Forde B. G. (2000) Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1465:219-235
- Forestier C., Bouteau F., Leonhardt N. et Vavasseur A. (1998a) Mesure des courants anioniques de cellules de garde intactes d'*Arabidopsis thaliana* L. et d'autres espèces. *C R Acad Sci Paris* 1998:365-371
- Forestier C., Bouteau F., Leonhardt N. et Vavasseur A. (1998b) Pharmacological properties of slow anion currents in intact guard cells of *Arabidopsis*. Application of the discontinuous single-electrode voltage-clamp to different species. *Pflügers Arch-Eur J Physiol* 436:920-927
- Foskett J. K. (1998) CLC and CFTR chloride channel gating. *Annu Rev Physiol* 60:689-717
- Frachisse J. M., Desbiez M. O., Champagnat P. et Thellier M. (1985) Transmission of a traumatic signal via a wave of electric depolarization, and induction of correlation between the cotyledonary buds in *Bidens pilosus*. *Physiol Plant* 64:48-52
- Fricke W., Leigh R. A. et Tomos A. D. (1994) Concentrations of inorganic and organic solutes in extracts from individual epidermal, mesophyll and bundle-sheath cells of barley leaves. *Planta* 192:310-316

- Fuller C. M., Ismailov I. I., Keeton D. A. et Benos D. J. (1994) Phosphorylation and activation of a bovine tracheal anion channel by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 269:26642-26650
- Gaedeke N., Klein M., Kolukisaoglu U., Forestier C., Müller A., Ansoerge M., Becker D., Mamnun Y., Kuchler K., Schulz B., Mueller-Roeber B. et Martinoia E. (2001) The Arabidopsis thaliana ABC transporter AtMRP5 controls root development and stomata movement. *EMBO J* 20:1875-1887
- Galiotta L. J. V., Haggie P. M. et Verkman A. S. (2001) Green fluorescent protein-based halide indicators with improved chloride and iodide affinities. *FEBS Lett* 499:220-224
- Garill A., Tyerman S. D., Findlay G. P. et Ryan P. R. (1996) Effects of NPPB and niflumic acid on outward K⁺ and Cl⁻ currents across the plasma membrane of wheat root protoplasts. *Aust J Plant Physiol* 23:527-534
- Gatto C., Lutsenko S. et Kaplan J. H. (1997) Chemical Modification with Dihydro-4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonate Reveals the Distance between K₄₈₀ and K₅₀₁ in the ATP-binding Domain of the Na,K-ATPase. *Arch Biochem Biophys* 340:90-100
- Gaxiola R. A., Yuan D. S., Klausner R. D. et Fink G. R. (1998) The yeast CLC chloride channel functions in cation homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:4046-4050
- Gaymard F. et Cerutti M. (1997) Les protéines des membranes végétales: utilisation du système Baculovirus/cellules d'insecte pour la production de protéines membranaires végétales. *Ecole de Biologie Végétale*:137-145
- Gaymard F., Cerutti M., Horeau C., Lemaillet G., Urbach S., Ravallec M., Devauchelle G., Sentenac H. et Thibaud J. B. (1996) The baculovirus/insect cell system as an alternative to *Xenopus* oocytes - First characterization of the AKT1 K⁺ channel from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 271:22863-22870
- Gaymard F., Pilot G., Lacombe B., Bouchez D., Bruneau D., Boucherez J., Michaux-Ferrière N., Thibaud J.-B. et Sentenac H. (1998) Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. *Cell* 94:647-655
- Geelen D., Lurin C., Bouchez D., Frachisse J. M., Lelievre F., Courtial B., Barbier-Brygoo H. et Maurel C. (2000) Disruption of putative anion channel gene AtCLC-a in *Arabidopsis* suggests a role in the regulation of nitrate content. *Plant J* 21:259-269
- Gendreau E., Traas J., Desnos T., Grandjean O., Caboche M. et Höfte H. (1997) Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 114:295-305
- Gerbeau P., Guglu J., Ripoche P. et Maurel C. (1999) Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *Plant J* 18:577-587
- Gomez-Gomez L., Bauer Z. et Boller T. (2001) Both the extracellular Leucine-Rich Repeat Domain and the Kinase Activity of FLS2 Are Required for Flagellin Binding and Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13:1155-1163
- Gomez-Gomez L. et Boller T. (2000) FLS2: an LRR Receptor-like Kinase Involved in the Perception of the Bacterial Elicitor Flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell* 5:1003-1011
- Gomez-Gomez L., Felix G. et Boller T. (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 18:277-284
- Grabov A. et Blatt M. R. (1998) Membrane voltage initiates Ca²⁺ waves and potentiates Ca²⁺ increases with abscisic acid in stomatal guard cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:4778-4783
- Grabov A., Leung J., Giraudat J. et Blatt M. (1997) Alteration of anion channel kinetics in wild-type and abi1-1 transgenic *Nicotiana benthamiana* guard cells by abscisic acid. *Plant J* 12:203-213
- Greene J. R., Brown N. H., Didomenico B. J., Kaplan J. et Eide D. J. (1993) The GEF1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an integral membrane protein; mutations in which have effects on respiration and iron-limited growth. *Mol Gen Genet* 241:542-553
- Greger R. (1990) Chloride channel blockers. *Methods in Enzymology* 191:793-809
- Guibert B., Dermietzel R. et Siemen D. (1998) Large conductance channel in plasma membranes of astrocytic cells is functionally related to mitochondrial VDAC-channels. *Int J Biochem Cell Biol* 30:379-391
- Gunthorpe M. J. et Lummis S. C. R. (2001) Conversion of the Ion Selectivity of the 5-HT_{3A} Receptor from Cationic to Anionic Reveals a Conserved Feature of the Ligand-gated Ion Channel Superfamily. *J Biol Chem* 276:10977-10983
- Hamill O. P., Marty A., Neher E., Sakmann B. et Sigworth F. J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391:85-100
- Hamilton D. W. A., Hills A., Köhler B. et Blatt M. R. (2000) Ca²⁺ channels at the plasma membrane of guard cells are activated by hyperpolarisation and abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:4967-4972
- Harris T. J. et Emtage J. S. (1986) Expression of heterologous genes in *E. coli*. *Microbiol Sci* 3:28-31

- Hartje S., Zimmermann S., Klonus D. et Mueller-Roeber B. (2000) Functional characterisation of LKT1, a K⁺ uptake channel from tomato root hairs, and comparison with the closely related potato inwardly rectifying K⁺ channel SKT1 after expression in *Xenopus* oocytes. *Planta* 210:723-731
- Hechenberger M., Schwappach B., Fischer W. N., Frommer W. B., Jentsch T. J. et Steinmeyer K. (1996) A family of putative chloride channels from *Arabidopsis* and functional complementation of a yeast strain with a CLC gene disruption. *J Biol Chem* 271:33632-33638
- Hedrich R. (1994) Voltage-dependent chloride channels in plant cells: identification, characterization, and regulation of a guard cell anion channel. *Curr Top Membr* 42:1-33
- Hedrich R. et Becker D. (1994a) Green circuits - The potential of plant specific ion channels. *Plant Mol Biol* 26:1637-1650
- Hedrich R., Busch H. et Raschke K. (1990) Ca²⁺ and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *EMBO J* 9:3889-3892
- Hedrich R. et Kurkdjian A. (1988) Characterization of an anion-permeable channel from sugar beet vacuoles: effect of inhibitors. *EMBO J* 7:3661-3666
- Hedrich R. et Marten I. (1993) Malate-induced feedback regulation of plasma membrane anion channels could provide a CO₂ sensor to guard cells. *EMBO J* 12:897-901
- Hedrich R., Marten I., Lohse G., Dietrich P., Winter H., Lohaus G. et Heldt H.-W. (1994b) Malate-sensitive anion channels enable guard cells to sense changes in the ambient CO₂ concentration. *Plant J* 6:741-748
- Hiatt J. (1967) Relationship of cell sap pH to organic acid change during ion uptake. *Plant Physiol* 42:294-298
- Higgins C. F. (2001) ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview. *Res Microbiol* 152:205-210
- Hille B. (1992) Ionic channels of excitable membranes: Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates.
- Hope A. B. et Walker N. A. (1975) Action potentials in charophyte cells. *The physiology of giant alga cells Cambridge University Press, Cambridge*:111-119
- Horn R. et Marty A. (1988) Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol* 94:145-159
- Inagaki N., Gonoï T., Iv J. P. C., Namba N., Inazawa J., Gonzales G., Aguilar-Bryan L., Seino S. et Bryan J. (1995) Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 270:1166-1170
- Jabs T., Tschöpe M., Colling C., Hahlbrock K. et Scheel D. (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4800-4805
- Jaśninski M., Stukkens Y., Degand H., Purnelle B., Marchand-Brynaert J. et Boutry M. (2001) A Plant Plasma Membrane ATP Binding Cassette-Type Transporter Is Involved in Antifungal Terpenoid Secretion. *Plant Cell* 13:1095-1107
- Jayaraman S., Haggie P. M., Wachter R. M., Remington S. J. et Verkman A. S. (2000) Mechanism and Cellular Applications of a Green Fluorescent Protein-based Halide Sensor. *J Biol Chem* 275:6047-6050
- Jentsch T. J. (1996) Chloride channels: a molecular perspective. *Curr Op Neurobiol* 6:303-310
- Jentsch T. J., Friedrich T., Schriever A. et Yamada H. (1999) The CLC chloride channel family. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 437:783-795
- Jentsch T. J., Steinmeyer K. et Schwarz G. (1990) Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature* 348:510-514
- Johannes E., Crofts A. et Sanders D. (1998) Control of Cl⁻ efflux in chara corallina by cytosolic pH, free Ca²⁺, and phosphorylation indicates a role of plasma membrane anion channels in cytosolic pH regulation. *Plant Physiol* 118:173-181
- Jouanneau et Péaud-Lenoël (1967) Croissance et synthèse des protéines de suspensions cellulaires de Tabac sensibles à la kinétine. *Physiol Plant* 20:834-860
- Karley A. J., Leigh R. A. et Sanders D. (2000) Differential ion Accumulation and ion Fluxes in the Mesophyll and Epidermis of barley. *Plant Physiol* 122:835-844
- Kato-Noguchi H. (2000) Abscisic acid and hypoxic induction of anoxia tolerance in roots of lettuce seedlings. *J Exp Bot* 51:1939-1944
- Keller B. U., Hedrich R. et Raschke K. (1989) Voltage-dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *Nature* 341:450-453
- Keller P. C. et Van Volkenburgh E. (1996) The electrical response of Avena coleoptile cortex to auxins: evidence in vivo for activation of a Cl⁻ conductance. *Planta* 198:404-412

- Kiegle E., Gilliham M., Haseloff J. et Tester M. (2000) Hyperpolarisation-activated calcium currents found only in cells from the elongation zone of *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant J* 21:225-231
- Kim E. J., Kwak J. M., Uozumi N. et Schroeder J. I. (1998) AtKUP1: an Arabidopsis gene encoding high-affinity potassium transport activity. *Plant Cell* 10:51-62
- Klein M., Martinoia E., Hoffmann-Thoma G. et Weissenböck G. (2000) A membrane-potential dependent ABC-like transporter mediates the vacuolar uptake of rye flavone glucuronides: regulation of glucuronide uptake by glutathione and its conjugates. *Plant J* 21:289-304
- Köhler B. et Raschke K. (2000) The delivery of Salts to the Xylem. Three types of Anion Conductance in the Plasmalemma of the Xylem Parenchyma of Roots of barley. *Plant Physiol* 122:243-254
- Kolb H.-A., Marten I. et Hedrich R. (1995) Hodgkin-Huxley analysis of a GCAC1 anion channel in the plasma membrane of guard cells. *J Memb Biol* 146:273-282
- Kollmeier M., Dietrich P., Bauer C. S., Horst W. J. et Hedrich R. (2001) Aluminium Activates a Citrate-Permeable Anion Channel in the Aluminium-Sensitive Zone of the Maize Root Apex. A Comparison Between an Aluminium-Sensitive and an Aluminium-Resistant Cultivar. *Plant Physiol* 126:397-410
- Kourie J. I. (1994) Transient Cl⁻ and K⁺ currents during action potentials in *Chara inflata*. *Plant Physiol* 106:651-660
- Krapivinsky G. B., Ackerman M. J., Gordon E. A., Krapivinsky L. D. et Clapham D. E. (1994) Molecular characterization of a swelling-induced chloride conductance regulatory protein, pICln. *Cell* 76:439-448
- Krieg P. A. et Melton D. A. (1984) Functional messenger RNAs are produced by SP6 *in vitro* transcription of cloned cDNAs. *Nucl Ac Res* 12:7057-7069
- Kurkdjian A. et Guern J. (1989) Intracellular pH: Measurement And Importance in Cell Activity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40:271-303
- Kushnir S., Babiychuk E., Storozhenko S., Davey M. W., Papenbrock J., Rycke R. D., Engler G., Stephan U. W., Lange H., G Kispal, Lill R. et Montagu M. V. (2001) A Mutation of the Mitochondrial ABC Transporter *Sta1* Leads to Dwarfism and Chlorosis in the Arabidopsis Mutant *starik*. *Plant Cell* 13:89-100
- Lacombe B., Becker D., Hedrich R., Desalle R., Hollmann M., Kwak J. M., Schroeder J. I., Le Novère N., Nam H. G., Spalding E. P., Tester M., Turano F. J., Chiu J. et Coruzzi G. (2001) The identity of plant glutamate receptors. *Science* 292:1486-1487
- Lacombe B., Pilot G., Michard E., Gaymard F., Sentenac H. et Thibaud J. B. (2000) A shaker-like K(+) channel with weak rectification is expressed in both source and sink phloem tissues of Arabidopsis. *Plant cell* 12:837-851
- Lacomme C. et Roby D. (1999) Identification of new early markers of the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 459:149-153
- Lam H. M., Chiu J., Hsieh M. H., Meisel L., Oliveira I. C., Shiu M. et Coruzzi G. (1998) Glutamate-receptor genes in plants. *Nature* 396:125-126
- Landry D. W., Akabas M. H., Redhead C., Edelman A., Cragoe E. J. et Al-Awqati Q. (1989) Purification and reconstitution of chloride channels from kidney and trachea. *Science* 244:1469-1472
- Landry D. W., Sullivan S., Nicolaidis M., Redhead C., Edelman A., Field M., Al-Awqati Q. et Edwards J. (1993) Molecular cloning and characterization of p64, a chloride channel protein from kidney microsomes. *J Biol Chem* 268:14948-14955
- Lee R. B., Ratcliffe R. G. et Southon T. E. (1990) ³¹P NMR measurements of the cytoplasmic and vacuolar Pi content of mature maize roots: relationships with phosphorus status and phosphate fluxes. *J Exp Bot* 41:1063-1078
- Leng Q., Mercier R. W., Yao W. et Berkowitz G. A. (1999) Cloning and First Functional Characterization of a Plant Cyclic Nucleotide-Gated Cation Channel. *Plant Physiol* 121:753-761
- Leonhardt N., Bazin J., Richard P., Marin E., Vavasseur V. et Forestier C. (2001) Antibodies to the CFTR modulate the turgor pressure of guard cell protoplasts via slow anion channels. *FEBS Lett* 496:15-18
- Leonhardt N., Marin E., Vavasseur A. et Forestier C. (1997) Evidence for the existence of a sulfonylurea-receptor-like protein in plants: modulation of somatal movements and guard cell potassium channels by sulfonylureas and potassium channel openers. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:14156-14161
- Leonhardt N., Vavasseur V. et Forestier C. (1999) ATP binding cassette modulators control abscisic acid regulated slow anion channels in guard cells. *Plant Cell* 11:1141-1152
- Leung J., Bouvier-Durand M., Morris P.-C., Guerrrier D., Chedford F. et Giraudat J. (1994) Arabidopsis ABA response gene *ABI1*: Features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* 264:1448-1451

- Leung J., Merlot S. et Giraudat J.** (1997) The Arabidopsis ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell* 9:759-771
- Lewis B. D., Karlin-Neumann G., Davis R. W. et Spalding E. P.** (1997) Ca²⁺-activated anion channels and membrane depolarizations induced by blue light and cold in Arabidopsis seedlings. *Plant Physiol* 114:1327-1334
- Leyman B., Geelen D., Quintero F. J. et Blatt M. R.** (1999) A tobacco syntaxin with a role in hormonal control of guard cell ion channels. *Science* 283:537-540
- Li J., Wang X. Q., Watson M. B. et Assmann S. M.** (2000) Regulation of Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure and Anion Channels by guard Cell AAPK Kinase. *Science* 287:300-303
- Linsdell P. et Hanrahan J. W.** (1996) Disulphonic stilbene block of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels expressed in a mammalian cell line and its regulation by a critical pore residue. *J Physiol* 496:687-693
- Liser G. L., Gentzsch M., Kloser A. K., Balzi E., Wolf D. H., Goffeau A. et Riordan J. R.** (2001) Expression and degradation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* 390:195-205
- Lohse G. et Hedrich R.** (1995) Anions modify the response of guard-cell anion channels to auxin. *Planta* 197:546-552
- Lu Y.-P., Li Z.-S., Drozdowicz Y. M., Hörtensteiner S., Martinoia E. et Rea P. A.** (1998) AtMRP2, an *Arabidopsis* ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with AtMRP1. *Plant Cell* 10:267-282
- Lu Y.-P., Li Z.-S. et Rea P. A.** (1997) *AtMRP1* gene of *Arabidopsis* encodes a glutathione S-conjugate pump: Isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8243-8248
- Lurin C.** (1998) Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de canaux anioniques de type CLC chez les plantes: Thèse de l'Université Paris VI Pierre et Marie Curie.
- Lurin C., Geelen D., Barbier-Brygoo H., Guern J. et Maurel C.** (1996) Cloning and functional expression of a plant voltage-dependent chloride channel. *Plant Cell* 8:701-711
- Lurin C., Guclu J., Chenielet C., Carde J. P., Barbier-Brygoo H. et Maurel C.** (2000) CLC-Nt1, a putative chloride channel protein of tobacco, co-localizes with mitochondrial membrane markers. *Biochem J* 348:291-295
- Ma J. F.** (2000) Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. *Plant Cell Physiol* 41:383-390
- Maathuis F. J. M., May S. T., Graham N. S., Bowen H. C., Jelitto T. C., Trimmer P., Bennett M. J., Sanders D. et White P. J.** (1998) Cell marking in *Arabidopsis thaliana* and its application to patch-clamp studies. *Plant J* 15:843-851
- Madrid R., Gómez M. J., Ramos J. et Rodríguez-Navarro A.** (1998) Ectopic Potassium Uptake in *trk1 trk2* Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Correlates with a Highly Hyperpolarized Membrane Potential. *J Biol Chem* 273:14838-14844
- Marten I., Busch H., Raschke K. et Hedrich R.** (1993) Modulation and block of the plasma membrane anion channel of guard cells by stilbene derivatives. *Eur Biophys J* 21:403-408
- Marten I., Gaymard F., Lemaillet F., Thibaud J. B., Sentenac H. et Hedrich R.** (1996) Functional expression of the plant K⁺ channel KAT1 in insect cells. *FEBS Lett* 380:229-232
- Marten I., Lohse G. et Hedrich R.** (1991) Plant growth hormones control voltage-dependent activity of anion channels in plasma membrane of guard cells. *Nature* 353:758-762
- Marten I., Zeilinger C., Redhead C., Landry D. W., Al-Awqati Q. et Hedrich R.** (1992) Identification of a voltage-dependent anion channel in the plasma membrane of guard cells by high-affinity ligands. *EMBO J* 11:3569-3575
- Martinoia E., Grill E., Tommasini R., Kreuz K. et Amrhein N.** (1993) An ATP-dependent glutathione S-conjugate "export" pompe in the vacuolar membrane of plants. *Nature* 364:247-249
- Martinoia E., Klein M., Geisler M., Bovet L., Forestier C., Kolukisaoglu U., Muller-Rober B. et Schulz B.** (2002) Multifunctionality of plant ABC transporters--more than just detoxifiers. *Planta* 214:345-355
- Mathieu Y., Lapous D., Thomins S., Laurière C. et Guern J.** (1996) Cytoplasmic acidification as an early phosphorylation dependent response of tobacco cells to elicitors. *Planta* 199:416-424
- Maurel C., Reizer J., Schroeder J. I. et Chrispeels M. J.** (1993) The vacuolar membrane protein γ -TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 12:2241-2247

- Mayer M. L., Westbrook G. L. et Guthrie P. B. (1984) Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309:261-263
- Meindl T., Boller T. et Felix G. (2000) The Bacterial Elicitor Flagellin Activates Its Receptor in Tomato Cells According to the Address-Message Concept. *Plant Cell* 12:1783-1794
- Meyer K., Leube M. P. et Grill E. (1994) A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 264:1452-1454
- Miller A. J. et Zhou J. J. (2000) *Xenopus* oocytes as an expression system for plant transporters. *Biochim Biophys Acta* 1465:343-358
- Mindell J. A., Maduke M., Miller C. et Grigorieff N. (2001) Projection structure of a Cl⁻-type chloride channel at 6.5 Å resolution. *Nature* 409:219-223
- Miyawaki A., Llopis J., Heim R., Mccaffery J. M., Adams J. A., Ikura M. et Tsien R. Y. (1997) Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388:882-887
- Moorman J. R., Palmer C. J., John J. E., Durieux M. E. et Jones L. R. (1992) Phospholemman expression induces a hyperpolarization-activated chloride current in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 267:14551-14554
- Morsomme P. et Boutry M. (2000) The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure function and régulation. *Biochim Biophys Acta* 1465:1-16
- Müller-Röber B., Ellenberg J., Provart N., Willmitzer L., Busch H., Becker D., Dietrich P., Hoth S. et Hedrich R. (1995) Cloning and electrophysiological analysis of KST1, an inward rectifying K⁺ channel expressed in potato guard cells. *EMBO J* 14:2409-2416
- Navarre C. et Goffeau A. (2000) Membrane hyperpolarization and salt sensitivity induced by deletion of PMP3, a highly conserved small protein of yeast plasma membrane. *EMBO J* 19:2515-2524
- Noh B. et Spalding E. P. (1998) Anion Channels and the Stimulation of Anthocyanin Accumulation by Blue Light in *Arabidopsis* Seedlings. *Plant Physiol* 116:503-509
- Nühse T. S., Peck S. C., Hirt H. et Boller T. (2000) Microbial Elicitors Induce Activation and Dual Phosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* MAPK 6. *J Biol Chem* 275:7521-7526
- Nürnberg T., Nennstiel D., Jabs T., Sacks W. R., Hahlbrock K. et Scheel D. (1994) High affinity binding of fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* 78:449-460
- Okubo K., Kang D., Hamasaki N. et Jennings M. L. (1994) Red Blood band 3 - Lysine 539 and lysine 851 react with the same H₂DIDS. *J Biol Chem* 269:1918-1926
- Osawa H. et Matsumoto H. (2001) possible Involvement of Protein Phosphorylation in Aluminium-Responsive Malate Efflux from Wheat Root Apex. *Plant Physiol* 126:411-420
- Parks B., Cho M. et Spalding E. (1998) Two genetically separable phases of growth inhibition induced by blue light in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol* 118:609-615
- Paulmichl M., Gschwentner M., Wöll E., Schmarda A., Ritter M., Kanin G., Ellemunter H., Waitz W. et Deetjen P. (1993) Insight into the structure-function relation of chloride channels. *Cell Physiol Biochem* 3:374-387
- Paulmichl M., Li Y., Wickman K., Ackermann M., Peralta E. et Clapham D. E. (1992) New mammalian chloride channel identified by expression cloning. *Nature* 356:238-241
- Pei Z.-M., Ghassemian M., Kwak C. M., Mccourt P. et Schroeder J. I. (1998) Role of farnesyltransferase in ABA regulation of guard cell anion channels and plant water loss. *Science* 282:287-290
- Pei Z.-M., Kuchitsu K., Ward J. M., Schwarz M. et Schroeder J. I. (1997) Differential abscisic acid regulation of guard cell anion channels in *Arabidopsis* wild-type and *abi1* and *abi2* mutants. *Plant Cell* 9:409-423
- Pei Z.-M., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klusener B., Allen G. J., Grill E. et Schroeder J. I. (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxyde mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406:731-734
- Perez M. D., Gonzalez C., Avila J., Brito N. et Siverio J. M. (1997) The YNT1 gene encoding the nitrate transporter in the yeast *Hansenula polymorpha* is clustered with genes YNI1 and YNR1 encoding nitrite reductase and nitrate reductase, and its disruption causes inability to grow in nitrate. *Biochem J* 321:397-403.
- Philippar K., Fuchs I., Luthen H., Hoth S., Bauer C. S., Haga K., Thiel G., Ljung K., Sandberg G., Bottger M., Becker D. et Hedrich R. (1999) Auxin-induced K(+) channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:12186-12191
- Pineros M. A. et Kochian L. V. (2001) A Patch-Clamp Study on the Physiology of Aluminium Toxicity and Aluminium Tolerance in Maize. Identification and Characterization of Al³⁺-Induced Anion Channels. *Plant Physiol* 125:292-305

- Pugin A., Frachisse J.-M., Tavernier E., Bligny R., Gout E., Douce R. et Guern J.** (1997) Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells : involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Plant Cell* 9:2077-2091
- Pusch M., Ludewig U., Rehfeldt A. et Jentsch T. J.** (1995) Gating of the voltage-dependent chloride channel CLC-0 by the permeant anion. *Nature* 373:527-531
- Raschke K., Hedrich R., Reckmann U. et Schroeder J. I.** (1988) Exploring biophysical and biochemical components of the osmotic motor that drives stomatal movements. *Bot Acta* 101:283-294
- Raschke K. et Schnabl H.** (1978) Availability of chloride affects the balance between potassium chloride and potassium malate in guard cells of *Vicia faba* L. *Plant Physiol* 62:84-87
- Rea P. A., Li Z. S., Lu Y. P., Drozdowicz Y. M. et Martinoia E.** (1998) From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:727-760
- Riordan J. R., Rommend J. M., Karem B., Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Z., Zielenski J., Lok S., Plavsic N., Chou J. L., Drumm M. L., Iannuzzi M. C., Collins F. S. et Tsui L.** (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245:1066-1073
- Roberts S. K., Fischer M. et Sanders D.** (2000) P6.3 - Patch clamp analysis of ion transport across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Exp Bot (supplement)* 51:35
- Robinson J. S., Graham T. R. et Emr S. D.** (1991) A putative zinc finger protein, *Saccharomyces cerevisiae* Vps18p, affects late Golgi functions required for vacuolar protein sorting and efficient alpha-factor prohormone maturation. *Mol Cell Biol* 11:5813-5824
- Rodriguez-Navarro A. et Ramos J.** (1984) Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 159:940-945
- Roelfsema M. R. G., Steinmeyer R., Staal M. et Hedrich R.** (2001) Single guard cell recordings in intact plants: light-induced hyperpolarization of the plasma membrane. *Plant J* 26:1-14
- Röhl T., Motzkus M. et Soll J.** (1999) The outer envelope protein OEP24 from pea chloroplasts can functionally replace the mitochondrial VDAC in yeast. *FEBS Lett* 460:491-494
- Roos W.** (2000) Ion mapping in plant cells - methods and applications in signal transduction research. *Planta* 210:347-370
- Rouet-Mayer M.-A., Mathieu Y., Cazalé A. C., Guern J. et Laurière C.** (1997) Extracellular alkalisation and oxidative burst induced by fungal pectin lyase in tobacco cells are not due to the perception of oligogalacturonide fragments. *Plant Physiol Biochem* 35:321-330
- Ryan P. R., Delhaize E. et Randall P. J.** (1995) Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. *Planta* 196:103-110
- Ryan P. R., Skerrett M., Findlay G. P., Delhaize E. et Tyerman S. D.** (1997) Aluminum activates an anion channel in the apical cells of wheat roots. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6547-6552
- Sanders D., Brownlee C. et Harper J. F.** (1999) Communicating with Calcium. *Plant Cell* 11:691-706
- Santoni V., Gerbeau P., Javot H. et Maurel C.** (2000) The high diversity of aquaporins reveals novel facets of plant membrane functions. *Curr Opin Plant Biol* 3:476-481
- Schachtman D. P., Schroeder J. I., Lucas W. J., Anderson J. A. et Gaber R. F.** (1992) Expression of an inward-rectifying potassium channel by the *Arabidopsis KAT1* cDNA. *Science* 258:1654-1658
- Schauf C. L. et Wilson K. J.** (1987) Properties of single K⁺ and Cl⁻ channels in *Asclepias tuberosa* protoplasts. *Plant Physiol* 85:413-418
- Scheel D.** (1998) Resistance response physiology and signal transduction. *Curr Opin Plant Biol* 1:305-310
- Schmidt C., Schelle I., Liao Y. J. et Schroeder J. I.** (1995) Strong regulation of slow anion channels and abscisic acid signaling in guard cells by phosphorylation and dephosphorylation events. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9535-9539
- Schmidt C. et Schroeder J. I.** (1994) Anion selectivity of slow anion channels in the plasma membrane of guard cells. *Plant Physiol* 106:383-391
- Schmidt-Rose T. et Jentsch T. J.** (1997) Transmembrane topology of CLC chloride channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7633-7638
- Schroeder J. I., Allen G. J., Hugouvieux V., Kwak J. M. et Waner D.** (2001) Guard Cell Signal Transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52:627-658
- Schroeder J. I. et Hagiwara S.** (1989) Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature* 338:427-430
- Schroeder J. I. et Keller B. U.** (1992) Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87

- Schroeder J. I., Schmidt C. et Scheaffer J.** (1993) Identification of high-affinity slow anion channel blockers and evidence for stomatal regulation by slow anion channels in guard cells. *Plant Cell* 5:1831-1841
- Schulz-Lessdorf B. et Hedrich R.** (1995) Protons and calcium modulate SV-type channels in the vacuolar-lysosomal compartment-channel interaction with calmodulin inhibitors. *Planta* 197:655-671
- Schulz-Lessdorf B., Lohse G. et Hedrich R.** (1996) GCAC1 recognizes the pH gradient across the plasma membrane: a pH-sensitive and ATP-dependent anion channel links guard cell membrane potential to acid and energy metabolism. *Plant J* 10:993-1004
- Schumacher K., Vafeados D., McCarthy M., Sze H., Wilkins T. et Chory J.** (1999) The Arabidopsis det3 mutant reveals a central role for the vacuolar H(+)-ATPase in plant growth and development. *Genes Dev* 13:3259-3270
- Schwappach B., Stobrawa S., Hechenberger M., Steinmeyer K. et Jentsch T. J.** (1998) Golgi localization and functionally important domains in the NH₂ and COOH terminus of the yeast CLC putative chloride channel Gef1p. *J Biol Chem* 273:15110-15118
- Schwartz A., Ilan N., Schwartz M., Scheaffer J., Assmann S. M. et Schroeder J. I.** (1995) Anion-channel blockers inhibit S-type anion channels and abscisic acid responses in guard cells. *Plant Physiol* 109:651-658
- Schwarz M. et Schroeder J. I.** (1998) Abscisic acid maintains S-type anion channel activity in ATP-depleted *Vicia faba* guard cells. *FEBS Lett* 428:177-182
- Seigneurin-Berny D., Rolland N., Garin J. et Joyard J.** (1999) Technical Advance: Differential extraction of hydrophobic proteins from chloroplast envelope membranes: a subcellular-specific proteomic approach to identify rare intrinsic membrane proteins. *Plant J* 19:217-228
- Sentenac H., Bonneaud N., Minet M., Lacroute F., Salmon J.-M., Gaymard F. et Grignon C.** (1992) Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science* 256:663-665
- Sidler M., Hassa P., Hasan S., Ringli C. et Dudler R.** (1998) Involvement of an ABC transporter in a developmental pathway regulating hypocotyl cell elongation in the light. *Plant Cell* 10:1623-1636
- Sigel E.** (1990) Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. *J Membr Biol* 117:201-221
- Skerrett M. et Tyerman S. D.** (1994) A channel that allows inwardly directed fluxes of anions in protoplasts derived from wheat roots. *Planta* 192:295-305
- Slayman C. L., Long W. S. et Gradmann D.** (1976) Action potentials in *Neurospora crassa* a mycelial fungus. *Biochim Biophys Acta* 462:732-744
- Smith F. W., Rae A. L. et Hawkesford M. J.** (2000) Molecular mechanisms of phosphate and sulfate transport in plants. *Biochim Biophys Acta* 1465:236-245
- Smith P. J.** (1995) Non-invasive ion probes-tools for measuring transebrane ion flux. *Nature* 378:645-646
- Smith S. J. et Miller A. J.** (1995) Cytosolic nitrate homeostasis in barley root cells. Measurements with triple bared ion-selective microelectrode. *10th Intern Workshop on Plant Membrane Biology*:R35
- Soreq H. et Seidman S.** (1992) *Xenopus* oocyte microinjection: from gene to protein. *Methods Enzymol* 207:225-265
- Spalding E. P. et Cosgrove D. I.** (1992a) Mechanism of blue-light induced plasma-membrane depolarization in etiolated cucumber hypocotyls. *Planta* 188:199-205
- Spalding E. P. et Cosgrove D. J.** (1988) Large plasma-membrane depolarization precedes rapid blue-light-induced growth inhibition in cucumber. *Planta* 178:407-410
- Spalding E. P., Slayman C. L., Goldsmith M. H. M., Gradmann D. et Bertl A.** (1992b) Ion channels in Arabidopsis plasma membrane: transport characteristics and involvement in light-induced voltage changes. *Plant Physiol* 99:96-102
- Stankovic B. et Davies E.** (1996) Both action potential and variation potentials induce proteinase inhibitor gene expression in tomato. *FEBS Lett* 390:275-279
- Stühmer W.** (1992) Electrophysiological recording from *Xenopus* oocytes. *Methods Enzymol* 207:319-339
- Su W., Huber S. C. et Crawford N. M.** (1996) Identification in vitro of a post-translational regulatory site in the hinge 1 region of Arabidopsis nitrate reductase. *Plant cell* 8:519-527
- Su W., Mertens J. A., Kanamaru K., Hcampbell W. et Crawford N. M.** (1997) Analysis of wild-type and mutant plant nitrate reductase expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Plant physiol* 115:1135-1143
- Sukharev S. I., Blount P., Martinac B., Blattner F. R. et Kung C.** (1994) A large-conductance mechanosensitive channel in *E. coli* encoded by *mscL* alone. *Nature* 368:265-268

- Tempel B. L., Papazian D. M., Schwarz T. L., Jan Y. N. et Jan L. Y. (1987) Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science* 237:770-775
- Teodoro A. E., Zingarelli L. et Lado P. (1998) Early changes of Cl⁻ efflux and H⁺ extrusion induced by osmotic stress in *Arabidopsis thaliana* cells. *Phys plant* 102:29-37
- Thain J. F. et Wildon D. C., 1993, Electrical signaling in plants, in Shultz, J. et Raskin, I., eds., Plant Signals in Interaction with Other Organisms, American Society of Plant Physiologists.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796-815
- Thomine S. (1997) Contribution à l'étude des canaux anioniques de l'hypocotyle chez *Arabidopsis thaliana*: approche pharmacologique et caractérisation électrophysiologique: Thèse de l'Université de Paris XI Orsay.
- Thomine S., Guern J. et Barbier-Brygoo H. (1997a) Voltage-dependent anion channel of *Arabidopsis* hypocotyls: nucleotide regulation and pharmacological properties. *J Membr Biol* 159:71-82
- Thomine S., Lelièvre F., Boufflet M., Guern J. et Barbier-Brygoo H. (1997b) Anion-channel blockers interfere with auxin responses in dark-grown hypocotyls. *Plant Physiol* 115:533-542
- Thomine S., Zimmermann S., Guern J. et Barbier-Brygoo H. (1995) ATP-dependent regulation of an anion channel at the plasma membrane of protoplasts from epidermal cells of *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Cell* 7:2091-2100
- Ting I. P. (1981) Towards a model for malate accumulation in plant tissues. *Plant Sci Lett* 21:215-221
- Trebacz K., Simonis W. et Schönknecht G. (1994) Cytoplasmic Ca²⁺, K⁺, Cl⁻ and NO₃⁻ activities in the liverwort *Conocephalum conicum* L. at rest and during action potentials. *Plant Physiol* 106:1073-1084
- Truong H. N., Meyer C. et Daniel-Vedele F. (1991) Characteristics of *Nicotiana tabacum* nitrate reductase protein produced in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 278:393-397
- Tsay Y. F., Schroeder J. I., Feldmann K. A. et Crawford N. M. (1993) The herbicide sensitivity gene CHL1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* 72:705-713
- Tulk B. M., Schlesinger P. H., Kapadia S. A. et Edwards J. C. (2000) CLIC-1 Functions as a Chloride Channel When Expressed and Purified from Bacteria. *J Biol Chem* 275:26986-26993
- Tusnady G. E. et Simon I. (1998) Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J Mol Biol* 283:489-506
- Valverde M. A., Diaz M., Sepulveda F. V., Gill D. R., Hyde S. C. et Higgins C. F. (1992) Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein. *Nature* 355:830-833
- Van der leij M., Smith S. J. et Miller A. J. (1998) Remobilisation of vacuolar stored nitrate in barley root cells. *Planta* 205:64-72
- Vernet T. (1997) Les protéines des membranes végétales: l'expression des protéines membranaires dans la levure. *Ecole de Biologie Végétale*: 147-155
- Vian A., Henry-Vian C., Schantz R., Ledoigt G., Frachisse J. M., Desbiez M. O. et Julien J. L. (1996) Is membrane potential involved in calmodulin gene expression after external stimulation in plant? *FEBS Lett* 380:93-96
- Vinauger-Douard M. (2001) Caractérisation moléculaire et fonctionnelle des canaux anioniques de la famille CLC chez *Arabidopsis thaliana*: Thèse de l'Université de Paris XI Orsay.
- Walker J. E., Saraste M., Runswick M. J. et Gay N. J. (1982) Distantly related sequences in a and b-subunits of ATP synthases, myosin, kinase and other ATP-requiring enzymes and a common binding fold. *EMBO J* 1:945-951
- Wang X. et Iino M. (1997) Blue light-induced shrinking of protoplasts from maize coleoptiles and its relationship to coleoptile growth. *Plant Physiol* 114:1009-1020
- Wang X. et Iino M. (1998) Interaction of cryptochrome 1, phytochrome, and ion fluxes in blue-light-induced shrinking of *Arabidopsis* hypocotyl protoplasts. *Plant Physiol* 117:1265-1279
- Wang X. Q., Ullah H., Jones A. M. et Assmann S. M. (2001) G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science* 292:2022-2023
- Ward J. (2001) Identification of novel families of membrane proteins from the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics* 17:560-563
- Ward J. M., Pei Z.-M. et Schroeder J. I. (1995) Roles of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants. *Plant Cell* 7:833-844
- Weber W.-M. (1999) Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochim Biophys Acta* 1421:213-233

- Wegner L. H. et Raschke K.** (1994) Ion channels in the xylem parenchyma of barley roots. *Plant Physiol* 105:799-813
- Wildon D. C., Thain J. F., Minchin P. E. H., Gubb I. R., Reilly A. J., Skipper Y. D., Doherty H. M., O'donnell P. J. et Bowles D. J.** (1992) Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. *Nature* 360:62-65
- Willamson R. E. et Ashley C. C.** (1982) Free Ca²⁺ and cytoplasmic streaming in the alga *Chara*. *Nature* 296:647-651
- Wu J. V., Joo N. S., Krouse M. E. et Wine J. J.** (2001) Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gating Requires Cytosolic Electrolytes. *J Biol Chem* 276:6473-6478
- Yang Y., Shah J. et Klessig D. F.** (1997) Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev* 1997:1621-1639
- Yasui M., Hazama A., Kwon T.-H., Nielsen S. et Guggino W. B.** (1999) Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin. *Nature* 402:184-187
- Yu W. H. et Forte M.** (1996) Is there VDAC in cell compartments other than the mitochondria? *J Bioenerg Biomenbr* 28:93-100
- Zawadski T., Davies E., Dziubinska H. et Trebacz K.** (1991) Characteristics of action potential in *Helianthis annuus*. *Physiol Plant* 83:601-604
- Zerangue N. et Kavanaugh M. P.** (1996) AST-1 is a neutral amino acid exchanger with chloride channel activity. *J Biol Chem* 271:27991-27994
- Zhang W.-H., Ryan P. R. et Tyerman S. D.** (2001) Malate-Permeable Channels and Cation Channels Activated Aluminium in the Apical Cells of wheat Roots. *Plant Physiol* 125:1459-1472
- Zhao R. et Reithmeier R. A.** (2001) Expression and characterization of the anion transporter homologue YNL275w in *Saccharomyces cerevisiae*. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C33-C45
- Zhu J. K., Liu J. et Xiong L.** (1998) Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*. Evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell* 10:1181-1191
- Zimmermann S., Frachisse J.-M., Thomine S., Barbier-Brygoo H. et Guern J.** (1998a) Elicitor induced chloride influx and anion channels in tobacco cell suspensions. *Plant Physiol Biochem* 36:665-674
- Zimmermann S., Talke I., Ehrhardt T., Nast G. et Muller-Rober B.** (1998b) Characterization of SKT1, an inwardly rectifying potassium channel from potato, by heterologous expression in insect cells. *Plant Physiol* 116:879-890
- Zimmermann S., Thomine S., Guern J. et Barbier-Brygoo H.** (1994) An anion current at the plasma membrane of tobacco protoplasts shows ATP-dependent voltage regulation and is modulated by auxin. *Plant J* 6:707-716

RESUME

La fonction des canaux anioniques présents sur la membrane plasmique des cellules végétales n'est comprise que dans un nombre restreint de cas correspondant à des activités particulières dans des cellules spécialisées: la régulation osmotique (cellules de garde des stomates) et la tolérance aux stress (cellules épidermiques de racine). Le laboratoire dans lequel j'ai effectué ma thèse s'intéresse plus particulièrement à l'hypocotyle d'*Arabidopsis thaliana*, organe ayant des types cellulaires moins clairement spécialisés. Mon travail de thèse comprend deux volets, d'une part j'ai contribué à la caractérisation de deux canaux anioniques de la membrane plasmique et j'ai recherché leur implication dans certaines réponses cellulaires, d'autre part j'ai développé des cribles fonctionnels afin d'identifier les gènes codant pour ces canaux.

Le premier canal que j'ai contribué à caractériser dans les cellules épidermiques de l'hypocotyle, est un canal à cinétiques rapides perméant à différents anions. Parmi ceux-ci, le sulfate a un rôle activateur du canal. J'ai de plus décrit le mécanisme biophysique de la régulation par le voltage du canal rapide: le pore du canal est obstrué par une molécule de nucléotide aux potentiels hyperpolarisés. Les anions externes sont capables de chasser le nucléotide hors du pore par un phénomène répulsif. Cette double régulation module l'activité du canal dans une gamme de potentiels physiologiques. Enfin, j'ai participé à l'identification d'un second canal à cinétiques lentes sur les mêmes cellules. Ce canal est faiblement régulé par le potentiel de membrane et présente une perméabilité très en faveur du nitrate. Il est régulé par phosphorylation.

Pour rechercher la fonction physiologique de ces deux canaux, j'ai choisi de caractériser les efflux d'anions dans le système des cellules d'*Arabidopsis* en suspension, qui sont aussi équipées de ces canaux. Au repos, aucun efflux d'anions n'est mesuré: les canaux sont fermés. Peu de signaux sont capables de les activer, parmi lesquels un choc hypoosmotique et certains éliciteurs de type fongique et bactérien. La caractérisation de ces efflux, grâce aux outils pharmacologiques et à la sélectivité ionique, n'a pas permis d'impliquer clairement un des canaux anioniques décrits en patch-clamp.

Sur la base des propriétés des canaux décrites en patch-clamp, j'ai aussi développé deux cribles fonctionnels en système hétérologue pour tenter d'identifier les ADNe correspondants. Le premier, basé sur la sélectivité des canaux pour les anions toxiques, est réalisé en levure. Mes contrôles positifs n'ont pas permis de définir de conditions pour un crible positif mais ont ouvert des possibilités de cribles négatifs. Le second, fondé sur l'effet activateur du sulfate sur le canal rapide, est effectué en ovocyte de xénope et est en cours de validation.

ABSTRACT

The function of plasma membrane anion channels in plant cells is well understood only in a few cases of specialized cells: osmotic regulation (for stomatal guard cells) and stress responses (for root epidermal cells). The laboratory where I prepared my thesis is involved in studies of *Arabidopsis thaliana* hypocotyl, an organ with less specialized cells. My PhD work is divided into two parts: first I was involved in the characterization of two anion channels at the plasma membrane of hypocotyl epidermal cells and I have looked for their involvement in a particular function, and second I have developed functional screens to identify anion channel genes.

The first anion channel that I contributed to characterize is a channel with rapid kinetics, permeable to several anions. Among them, sulfate exerts an activating effect. Moreover, I have described the biophysical mechanism of the channel gating by voltage: the channel pore is blocked by a nucleotide molecule at very negative potentials. Extracellular anions are able to exert a repulsion on the nucleotide. This dual regulation modulates channel activity in the range of physiological voltages. I have also contributed to the characterisation of a second anion channel with slow kinetics, present on the same cells. This channel is weakly voltage-dependent, shows a high nitrate permeability, and is regulated by phosphorylation.

To look for the physiological function of these channels, I have chosen to characterize anion effluxes from *Arabidopsis* suspension cells, which also possess these two types of channels. In resting conditions, no efflux was observed: channels are closed. Only few signals, hypoosmotic shock and bacterial and fungal elicitors, are able to trigger an efflux. Considering the pharmacological and selectivity profiles of these effluxes, we have not been able to clearly involve any of the rapid-type or the slow-type anion channels.

On the basis of anion channel properties described using the patch-clamp technique, I have developed two functional screens using heterologous systems to identify channel cDNAs. The first one, based on channel selectivity for toxic anions, is developed in yeast. Positive controls did not allow us to define conditions for a positive screen but might provide conditions for a negative screen. The second one, based on the activating effect of sulfate on the rapid anion channel, is currently being investigated in *Xenopus* oocytes.