Collège Doctoral du Languedoc-Roussillon

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur

Délivré par le

Centre international d'études supérieures en sciences agronomiques

Montpellier

Préparée au sein de l'école doctorale SIBAGHE

Et de l'unité de recherche UMR-BPMP

Spécialité : **Biologie Intégrative des Plantes**

Présentée par **Elsa RONZIER**

Régulation post-traductionnelle des canaux potassiques par les CPKs (Protéines Kinases Dépendantes du Calcium) chez *Arabidopsis thaliana* : un rôle dans la réponse adaptative aux stress environnementaux?

Soutenue le 27/11/2013 devant le jury composé de

Mme Sylvie Coursol, CR INRA, IJPB	Examinateur
M Frédéric Gaymard, DR INRA, BPMP	Examinateur
Mme Nathalie Leonhardt, DR CEA, Cadarache	Invité
M Jean-Baptiste Thibaud, DR CNRS, BPMP	Co-directeur de thèse
M Sébastien Thomine, DR CNRS, ISV	Rapporteur
M Alain Vavasseur, DR CEA,Cadarache	Rapporteur
M Tou Cheu Xiong, CR INRA, BPMP	Co-directeur de thèse

Montpellier SupAgro

Abréviations

ABA : Abscissic Acid

ADN : Acide Désoxyribonucléoique

AKT1 : Arabidopsis K^+ Transport système #1

AKT2 : Arabidopsis K^+ Transport système #2

ARNc : Acide Ribonucléique Complémentaire

AtKC1 : Arabidopsis thaliana K^+ Channel #1

AtNHX1: Arabidopsis vacuolar Na^+/H^+ antiporter#1

ATP : Adénosine-5'-triphosphate

AQP : Aquaporines

BAPTA : 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid

BET : Bromure d'éthidium

BRET : Bioluminescence Resonance Energy Transfer

BSA : Bovine Serum Albumin

CaM (Calmoduline) : Calcium-dependent modulator protein

CAMTA : Calmodulin-binding transcription activator

cCaMK : Ca^{2+}-Calmodulin-Dependent Protein Kinase

CBL : Calcineurin B-like

CCD : Charge Coupled Device

CDPK : Ca^{2+}-Dependent Protein Kinase

CFP : Cyan Fluorescence Protein

CIPK : CBL-Interacting Protein Kinases

CML : CAM like proteins

CNBD : Cyclic Nucleotide Binding Domain

Co-IP : Co-Immunoprécipitation

CPKs-CA : Calcium Protein Kinase- Constitutive Active

CPKs-FL : Calcium Protein Kinase- Full length

CPKs-KM : Calcium Protein Kinase- Kinase mutant

CSP : Control Subtrate Peptide

dNTP : Désoxyribonucléotides Tri-phosphate

DO : Densité Optique

ECL : Enhanced Chemiluminescence

EDTA : Ethylène Diamine Tétraacétique

FLIM : Fluorescence Life-time Imaging microscopy

FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer

GCAC : Guard Cell Anion Channel

GORK : Guard cell Outward Rectifying K+ channel

GST : Glutathione S-Transferase

GUS : β-glucoronidase

His : Histidine

HR : Hygrométrie relative

ICCD: Intensified Charge Coupled Device

IPD : Image Photon Detector

IPTG : Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

KAT1 : K^+ Arabidopsis Thaliana Channel système #1

KAT2 : K^+ Arabidopsis Thaliana Channel système #2

Kincless : K^+ inward current less

LB : Lysogeny Broth

LUC : Luciférase

MES : (N-morpholino) ethanesulfonic acid

MS : Murashige et Skoog

NAA : Naphthalene-1-acetic acid

NOS : Oxyde Nitrique Synthase

NR : Nitrate réductase

OST1 : Open Stomata 1

PBS : Phosphate-Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PEG : Polyethylene Glycol

PP2C : Protéine Phosphatase type 2C

PT : Protéine Totale

SDS-PAGE : Soduim Dodécyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SKOR : Stelar K^+ Outward Rectifier

SPIK : Shaker Pollen Inward K^+ channel

TAE : Tris Acetate EDTA

TBS : Tris buffer Saline

TEVC : Two-Electrode Voltage Clamp

Tm : Temperature melting

TPK1 : Two Pore K^+ channel 1

UA : Unité Arbitraire

WT : Wild Type

X-Gluc : 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Glucuronic acid

YFP : Yellow Fluorescence Protein

Liste des figures

Figure I.1 : Phylogénie des systèmes de transport du potassium chez Arabidopsis thaliana p 3

Figure I.2 : Structure d'une sous-unité Shaker de plante p 4

Figure I.3 : Phylogénie des 9 sous-unités Shaker chez Arabidopsis thaliana p 5

Figure I.4 : Profil d'expression des Shaker chez Arabidopsis thaliana p 7

Figure I.5 : Structure quaternaire d'un canal Shaker homotétramérique ou hétérotétramérique p 8

Figure I.6 : Arbre phylogénique des 34 CPKs retrouvées chez Arabidopsis thaliana p 11

Figure I.7 : Structure et mécanisme d'activation des CPKs p 12

Figure II.1 : Clonage par la technique Gateway (gateway® Recombination Cloning Technology) p 21

Figure II.2 : Cassette Gateway des différents plasmides utilisés au cours de ma thèse p 23

Figure II.3 : Phosphorylation in vitro avec les puces à peptides (Proteomic Solutions) p 32

Figure II.4 : Principe du voltage clamp à deux électrodes (TEVC) sur des ovocytes de xénope p 34

Figure II.5 : Mesure de la conductance stomatique à l'aide d'un poromètre p 38

Figure II.6 : Dispositif expérimental pour réaliser de l'imagerie sur plante entière p 39

Figure III.1 : Effets des CPKs sur l'activité des canaux Shaker KAT1, KAT2 et GORK co-exprimés dans l'ovocyte de xénope. p 42

Figure III.2 : Structures des différentes formes des CPKs obtenues aux cours de ma thèse. p 44

Figure III.3 : Vérification de la taille et de la qualité des protéines recombinantes produites p 46

Figure III.4 : Mesure de l'ATP consommé par les CPKs durant la phosphorylation in vitro p 47

Figure III.5 : Plan des puces à peptide utilisées au cours de ma thèse p 49

Figure III.6 : Autoradiographies des puces à peptides après phosphorylation in vitro p 50

Figure III.7 : Quantification relative de la phosphorylation des peptides contrôles par les CPKs p 51

Figure III.8 : Exemples d'analyse de la phosphorylation de peptides présents sur les puces p 52

Figure III.9 : Construction des lignées « promoteur CPKs-Luciférase » p 52

Figure III.10 : Exemple de signal bioluminescent de la Luciférase sur des plantes transgéniques pCPKs-Luciférase p 53

Figure III.11 : Imagerie calcique in planta en utilisant la sonde G5A p 55

Figure IV.1 : Analyse in sillico de l'expression de chaque CPK dans les feuilles d'Arabidopsis thaliana p 57

Figure IV.2: Enregistrement de courants ioniques dans des ovocytes en TEVC p 59

Figure IV.3 : Pourcentage d'activité de KAT2 et AKT2 en présence de différentes CPKs p 60

Figure IV.4 : Enregistrement et extrapolation de courants de désactivation des canaux KAT2 en réponse aux potentiels p 62

Figure IV.5 : Activité kinase de CPK13 en fonction du pH et du Ca^{2+} p 64

Figure IV.6 : Analyse des puces à peptide réalisées avec CPK13 recombinante p 65

Figure IV.7 : Représentation schématique d'un canal potassique de type Shaker présentant les sites de phosphorylation des canaux KAT2 et AKT2 par la protéine kinase CPK13 p 67

Figure IV.8 : Pourcentage d'inhibition des canaux KAT2 natifs ou mutés testés en TEVC en présence de CPK13 p 69

Figure IV.9 : Co-localisaton de KAT2 et CPK13 dans des protoplastes de mésophile d'A. thialana p 70

Figure IV.10 : Co-localisation de KAT2 et CPK13 dans des cellules épidermiques de tabac Nicotiana benthamania p 70

Figure IV.11 : Principe du FRET (Fluorescence resonance energy transfer) p 71

Figure IV.12 : Mesure du temps de vie de la fluorescence de la CFP par la technique de FLIM p 72

Figure IV.13 : Coloration GUS avec les lignées pKAT2::GUS et pCPK13::GUS p73

Figure IV.14 : Evaluation du taux de transcrits de CPK13 pour les lignées WT, ox #4 et ox #3 par PCR quantitative p 75

Figure IV.15 : Cinétique d'ouvertures stomatiques induites par la lumière et la fusicoccine p 75

Figure IV.16 : Conductances stomatiques en fonction de la photopériode p 77

Figure IV.17 : Application d'un stress lumineux et impact sur la croissance des plantes p 78

Figure IV.18 : Niveau du taux de transcrits de CPK13 en fonction de stress environmentaux p 80

Figure IV.19 : Cinétique de fermeture stomatique en réponse à un stress froid p 81

Figure IV.20 : Visualisation de l'activité du promoteur de CPK13 lors d'un stress froid p 81

Figure V.1 : Mesure de l'activité kinase de CPK6 en fonction de la concentration en Ca^{2+} par phosphorylation in vitro p 85

Figure V.2 : Mesure de l'activité kinase de CPK6 par phosphorylation in vitro en utilisant de la radioactivité p 86

Figure V.3 : Mesure de l'activité du promoteur de CPK6 en réponse à un stress salin à l'aide de la lignée pCPK6-Luciférase p 88

Figure V.4 : Colorations GUS avec les lignées pCPK6::GUS et pKAT2::GUS p 90

Figure V.5 : Courbe de décroissance de la fluorescence de la CFP p 91

Figure V.6 : Enregistrement de courants ioniques dans des ovocytes en TEVC p 92

Figure V.7 : Analyses électrophysiologiques des effets de CPK6 sur l'activité des canaux KAT2. p 93

Figure V.8 : Phosphorylation des puces à peptide réalisées avec CPK6 avec ou sans Ca^{2}+ p 96

Figure VI.1 : Analyses des paramètres électrophysiologiques des canaux KAT2 en présence de CPK6 en réponse au BAPTA p 102

Figure VI.2 : Analyses comparatives des peptides de KAT2 phosphorylés par CPK13 et CPK6 p 104

Figure VI.3 : Courants enregistrés en TEVC sur des ovocytes co-exprimant KAT2 et les deux CPKs p 104

Figure VI. 4 : Expression de CPK6 et CPK13 dans les deux lignées sur-expresseurs ox-CPK6 et ox-CPK13 p 105

Liste des Tableaux

Tableau III.1 : Différentes formes de CPKs obtenues au cours de ma thèse p 43

Tableau III.2 : CPKs recombinantes obtenues après production à partir un système bactérien p 45

Tableau III.3 : Phosphorylation des 6 peptides contrôles présents sur la puce par les CPKs p 50

Tableaux IV.1 : Paramètres électrophysiologiques des canaux KAT2 en présence de CPK13 p 62

Tableau IV.2 : Présentation des 11 mutants de KAT2 utilisés en TEVC p 68

Tableau V.1 : Mesure du temps de vie de la fluorescence de la CFP par la technique de FRET-FLIM p 91

Tableau V.2 : Paramètres électrophysiologiques des canaux KAT2 en présence de CPK13 ou CPK6 p 94

Tableau VI.1 : Paramètres électrophysiologiques des canaux KAT2 en présence de CPK6 en réponse au BAPTA p 103

Sommaire

I. Etude bibliographique 1
I.1 Le potassium dans la plante, son transport, sa distribution et ses rôles physiologiques. 1
I.1.1 Les éléments constitutifs de la plante. 1
I.1.2 Les rôles du potassium 1
I.1.3 Le transport, la distribution du potassium 2
I.1.4 Les systèmes de transport du potassium 2
I.2 Les canaux Shakers 3
I.2.1 La structure des canaux Shaker 4
I.2.2 Classification des canaux Shaker chez Arabidopsis thaliana 5
I.2.3 Diversité fonctionnelle et régulation 7
(ii) Régulation des sous-unités Shaker 8
I.2 La signalisation calcique chez les plantes 9
I.2.1 Ca^{2+} : second messager 9
I.2.2 Les senseurs de Ca^{2+} 10
I.4 Rôles des canaux potassiques Shaker dans les stomates 14
I.4.1 Mécanisme général d'ouverture et de fermeture stomatique 15
I.4.2 Implication des canaux Shaker dans la physiologie du stomate 15
I.5 Rôles des canaux potassiques Shaker dans les tissus vasculaires et les hydathodes 16
I.6. Objectifs de ma thèse 17
II. Matériel et méthodes 19
II.1 Matériel Végétal 19
II.1.1 Stérilisation des graines et culture de plantules en milieu gélosé 19
II.1.2 Culture des plantes en serre 19
II.1.3. Culture des plantes en chambre de culture 19
- Application d'un stress lumière en chambre de culture 19
II.2 Clonage avec le système Gateway® 20
II.2.1 PCR d'assemblage 20
II.2.3 Transformation des bactéries DH5α par choc thermique 21
II.2.4 Criblage par PCR 22
II.2.5 Extraction des plasmides et séquençage 22
II.2.6 Réaction LR- Recombinaison homologue entre les sites attL et attR (LR) 22

II.2.7 Mutagénèse dirigée 23

II.3 Transformation des plantes et obtention de lignées transgéniques 24

II.3.1 Transformation transitoire chez Arabidopsis thaliana 24

(ii) Transformation de protoplastes 25

(iii) Transformation transitoire chez Nicotiana benthamiana 25

III.3.2 Transformation stable chez Arabidopsis thaliana 25

(i) Transformation des Agrobactéries par electroporation 25

(ii) Préparation des solutions d'agrobactéries 26

(iii) Transformation des fleurs 26

(iv) Sélection des lignées homozygotes 26

II.4 Production de protéines recombinantes 27

II.4.1 Construction des souches productrices 27

II.4.2 Production de la protéine 27

II.4.3 Purification de la protéine 28

II.4.4 Dosage des protéines recombinantes 29

II.4.5 Vérification de la qualité des protéines produites 29

(i) Gel SDS-Page 29

II.4.6 Identification des sites phosphorylables avec des Puces à peptide 30

II.4.7 Design des puces à peptides 31

II.4.8 Phosphorylation des puces à peptide 31

II.4.9 Analyse des puces à peptides 32

II.5 Voltage-Clamp à deux éléctrodes 33

II.5.1 Transcription in vitro des ARNc 33

(i) Linéarisation 33

(ii) Transcription in vitro (Kit Ambion) 33

(iii) Obtention des ovocytes de Xénopes et injection des ARNc 33

II.5.2 Enregistrement des courants ioniques sur les ovocytes ("voltage-clamp" à deux microélectrodes intracellulaires ou TEVC) 34

II.6 FLIM (Fluorescence lifetime imaging microscopy) 35

II.6.1 Vecteur et souche bactérienne 35

II.6.2 Transformation de feuilles de tabac et observation au confocal 35

II.6.3 Interaction protéine-protéine par la méthode de FRET-FLIM 36

II.7 Analyse de l'expression in planta des lignées GUS 36
II.7.1 Vecteur et transformation stable par Agrobacterium tumefaciens 36
II.7.2 Coloration GUS 36
II.8 Phénotypage (des lignées sur-exprimantes CPK13) 37
II.8.1 Vecteur et obtention des plantes sur-exprimant CPK13 37
II.8.2 Mesure d'ouverture stomatique 37
II.8.3 Mesure de la conductance stomatique à l'aide d'un poromètre 38
II.9 Imagerie in planta 39
II.9.1 Enregistrement de signaux calciques in planta 39
II.9.2 Mesure de l'activité du promoteur d'un gène à l'aide du gène rapporteur luciférase 40
III. Travaux préparatoires, mise en place de nouveaux outils, choix de cibles moléculaires pour l'étude 41
III.1 Criblage fonctionnel de CPKs capables de modifier l'activité de canaux Shaker 41
III.2 Clonage et génération des mutants CPKs 43
III.3 Production des CPKs recombinantes en système bactérien. 44
III.4 Test des activités kinases in vitro des différentes formes de CPKs recombinantes produites 46
III.5 Phosphorylation in vitro par les CPKs sur des puces à peptides 49
III.6 Etude in planta de l'activité des promoteurs CPKs à l'aide de l'imagerie 52
III.6.1 Constructions de lignées pCPK::LUC 52
III.7 Mise en place d'une sonde génétique pour l'imagerie calcique in planta 53
III.7.1 Principe de la sonde G5A 53
III.7.2 Mesures de variations calcique in planta 54
III.8 Conclusion 56
IV. Inhibition de KAT2 par la protéine CPK13 impactant sur l'ouverture stomatique 57
IV.1 CPK13 inhibe l'activité de KAT2 en ovocyte de xénope 58
IV.2 Caractérisation de l'activité kinase de CPK13 63
IV.3 Phosphorylation in vitro de KAT2 par CPK13 64
des cibles de la CPK13. 64
IV.4 Effet de CPK13 sur l'activité des mutants KAT2 en voltage clamp 68
IV.5 Localisation et interaction de CPK13 et KAT2 in planta. 69
IV.6 Etude de l'activité du promoteur de CPK13 et de KAT2 chez Arabidopsis thaliana 72
IV.7 La surexpression de CPK13 induit un défaut d'ouverture stomatique 74
IV.7.1 Caractérisation des lignées sur-exprimant CPK13 74

IV.7.2 CPK13 induit un défaut dans l'ouverture stomatique 75

IV.7.3 Mesure de conductance stomatique sur plantes entières à l'aide d'un poromètre 76

IV.8 La surexpression de CPK13 induit un défaut dans la croissance de la plante en condition de stress lumineux 78

IV. 9 Conclusions et perspectives 79

V. Rôle de CPK6 dans la tolérance au stress salin chez Arabidopsis thaliana à travers le canal Shaker KAT2 83

V.1 Test de l'activité kinase de CPK6 est fonction de la concentration en Ca^{2+}. 84

V.1.1 Test de l'activité kinase de CPK6 avec le kit de phosphorylation in vitro (Kinase Glo® Luminescent kinase Assays) utilisant de l'ATP froid 84

V.1.2 Test de l'activité kinase de CPK6 en utilisant de l'ATP radioactif. 85

V.2. Activité du promoteur de CPK6 en réponse à un stress salin 86

V.4. Etude de l'interaction, in planta, de CPK6 avec le canal Shaker KAT2. 90

V.5 Effet de CPK6 sur l'activité du canal KAT2 en ovocytes 92

V.6 Etude de la phosphorylation de KAT2 par CPK6 95

V.7 Conclusions et perspectives 98

VI. Conclusion générale et perspectives 100

Références 107

Annexes 117

I. Etude bibliographique

Cette étude bibliographique est divisée en six parties. La première partie indique l'importance du potassium (cation le plus abondant) dans la plante, ses rôles et les différents systèmes de transport de cet ion (§ I.1). Les mieux connus des transporteurs de potassium sont les canaux Shaker, dont les structures, les fonctions, les régulations sont détaillées (§ I.2). La signalisation calcique est impliquée dans la régulation des canaux Shaker via des protéines kinases dépendantes du calcium comme les CBL-CIPKs et les CPKs (§ I.3). La régulation par ces kinases pourrait intervenir dans les stomates et les tissus vasculaires de la plante où les canaux Shaker semblent jouer un rôle important (§ I.4 et § I.5). Enfin, dans le contexte décrit ci-dessus, les objectifs de ce travail sont présentés (§ I.6).

I.1 Le potassium dans la plante, son transport, sa distribution et ses rôles physiologiques.

I.1.1 Les éléments constitutifs de la plante.

Par ordre décroissant d'abondance, les (macro-)éléments constitutifs d'une plante sont l'hydrogène (H), l'oxygène (O), le carbone (C), l'azote (N), le potassium (K), le calcium (Ca), le magnésium (Mg), le phosphore (P) et le soufre (S). Ici, nous nous intéressons au potassium (K) qui est le cation le plus abondant à l'état libre dans une cellule (Clarkson and Hanson, 1980). Sa concentration cytoplasmique peut varier entre 100 et 200 mM, ce qui peut représenter jusqu'à 6 % du poids sec de la plante (Clarkson and Hanson, 1980 ; Leigh and Jones, 1984).

I.1.2 Les rôles du potassium

Le potassium (K^+) est impliqué dans de nombreux processus physiologiques essentiels à la plante. Il participe à l'électro-neutralité du contenu cellulaire, qui est riche en molécules organiques dont la charge globale est négative. Cette électroneutralité, assurée dans toutes les cellules, justifie en particulier la circulation d'un pool important de K^+ dans les sèves xylémienne et phloémienne comme "cation d'accompagnement" des anions minéraux ou organiques qui y sont acheminés (Cf. § I.5).

Du fait de son abondance, le potassium est un osmoticum majeur. Il intervient dans le contrôle de la pression osmotique, et donc dans le contrôle de la turgescence des cellules. A ce titre, il est notamment impliqué dans les mouvements stomatiques (Fischer and Hsiao, 1968 ; Tallman and Zeiger, 1988). Les cellules de garde perdent une quantité significative de K^+ lors de la

fermeture du stomate et l'inverse se produit lors de l'ouverture comme l'ont montré, par exemple, Felle et son équipe en mesurant la concentration apoplasmique de K^+ (Felle et al., 2000). Ces transports de quantités importantes de potassium à travers la membrane des cellules de garde sont rendus possible par l'activité de systèmes de transport parmi lesquels des canaux dépendant du potentiel de membrane de la famille Shaker (Cf. § I.4) (Assmann and Haubrick, 1996 ; Grabov and Blatt, 1998 ; MacRobbie, 1998 ; Dietrich et al., 2001 ; Lebaudy et al. 2008a).

De part les fonctions décrites ci-dessus, le potassium est donc un élément indispensable au développement, à la croissance et à la survie de la plante.

I.1.3 Le transport, la distribution du potassium

Le potassium est prélevé dans le sol depuis la racine, circule dans la plante et est redistribué dans les différents compartiments cellulaires. La plante prélève le potassium dans le sol à l'aide des poils absorbants localisés dans la zone subapicale racinaire. Le potassium passe à travers les cellules de l'épiderme puis à travers celles du cortex pour finalement arriver dans la stèle. Ce cheminement s'opère par deux voies complémentaires, la voie apoplastique (continuum des espaces extracellulaires), les voies symplasmique (à travers les cytoplasmes interconnectés par les plasmodesmes) (Clarkson, 1993 ; Steudle and Peterson, 1998 ; Steudle, 2000). En dehors des régions apicales, la subérisation de l'endoderme (couche cellulaire entre le cortex et la stèle) rend obligatoire (pour K^+ et les autres solutés) le franchissement d'une membrane cellulaire par la voie symplasmique.

Les ions K^+ qui ont atteint la stèle racinaire par cette voie symplasmique, peuvent être sécrétés dans la sève brute grâce à des systèmes de transport du potassium exprimés dans les cellules du parenchyme xylémien (Gaymard et al., 1998). Ces ions K^+ peuvent être ensuite distribués dans toute la plante par la circulation de la sève brute grâce à l'évapotranspiration (circulation de la sève brute durant le jour) et/ou la poussée racinaire (Zimmermann et al., 1994).

I.1.4 Les systèmes de transport du potassium

Il existe, chez Arabidopsis thaliana au moins 35 gènes identifiés comme codant des systèmes de transport du potassium. Les produits de ces gènes sont classés en 5 groupes présentés sur la figure I.1 (Mäser et al., 2001) : (a) les transporteurs KUP/HAK/KT (K^+ Uptake/High Affinity K^+ Transporter/K^+ transporter), (b) les transporteurs Trk/HKT (Transporter K+/ Affinity K^+ Transport), (c) les TPK (Tandem-Pore K+ channel), (d) les Kir-like ou KCO et (e) les canaux potassiques Shaker. Les 5 groupes se distinguent principalement par leurs structures (variation du nombre de domaines transmembranaires, nombre de domaine P).

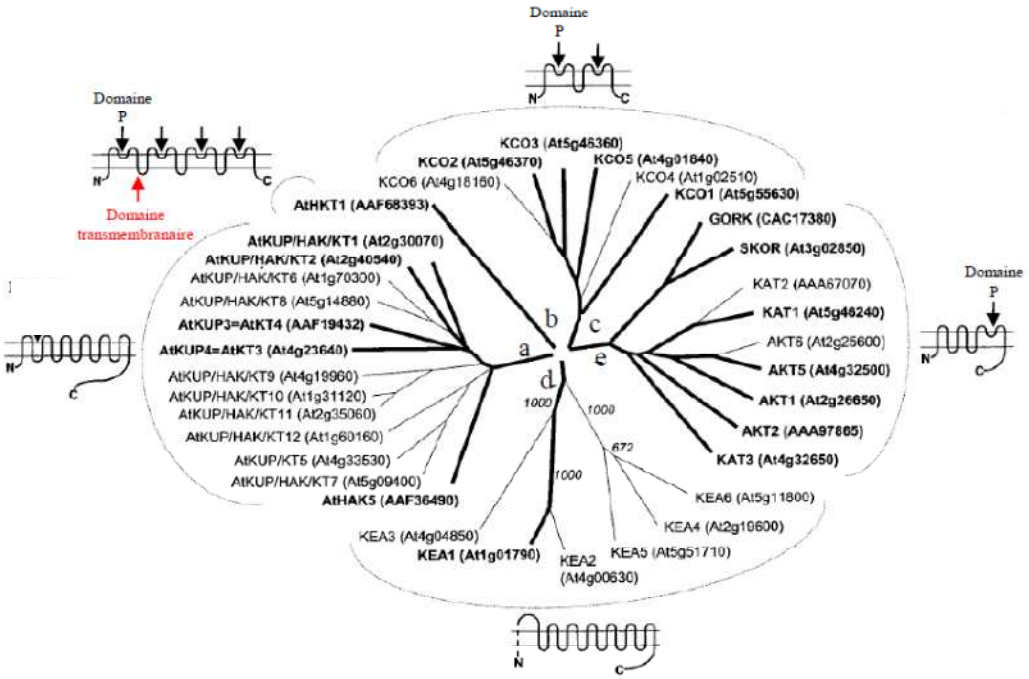


Figure I.1: Phylogénie des systèmes de transport du potassium chez Arabidopsis thaliana.
Les systèmes de transport de potassium chez Arabidopsis thaliana sont répartis en 5 groupes: les transporteurs KUP/HAK/KT (K^+ Uptake/High Affinity K^+ Transporter/K^+ transporter) (a), les transporteurs Trk/HKT (Transporter K+/ Affinity K^+ Transport) (b), les TPK (Tandem-Pore K+ channel) (c), les Kir-like ou KCO (d) et les canaux potassiques Shaker (e). Les topologies protéiques prédites de chaque groupe sont représentées. Ces topologies sont très variables au niveau du nombre de domaines transmembranaires et du nombre de domaine P (de 0 à 4) (D'après Mäser et al. 2001).

Les deux premiers de ces 35 gènes à avoir été clonés sont AKT1 (Arabidopsis K^+ Transport #1) et KAT1 (K^+ (channel) Arabidopsis Thaliana #1) (Anderson et al., 1992) (Sentenac et al., 1992). Les sept autres membres de la famille ont ensuite été clonés en s'aidant de la séquence des deux premiers : AKT2 (Cao et al., 1995 ; Ketchum and Slayman, 1996), KAT2 (Butt et al., 1997), SKOR (Gaymard et al., 1998), GORK (Ache et al., 2000), AKT6 (Lacombe et al., 2000b), AtKC1 (Reintanz et al., 2002), et enfin SPIK (Mouline et al., 2002). La famille des canaux Shaker est à ce jour, la plus documentée des 5 familles de transporteurs de potassium chez les plantes.

I.2 Les canaux Shakers

La caractérisation fonctionnelle des canaux Shaker en système hétérologue (cellules Sf9, ovocyte de xénope, etc.) a permis de montrer que leur activité est régulée par le potentiel membranaire. Ces canaux Shaker sont ainsi qualifiés de "voltage-dépendant" (Schachtman et al., 1992 ; Very et al., 1995 ; Gaymard et al., 1996 ; Dreyer et al., 2001 ; Hosy et al., 2003b ; Very and Sentenac, 2003 ; Cherel, 2004).

I.2.1 La structure des canaux Shaker

Un canal Shaker résulte de l'assemblage de 4 sous-unités. La structure secondaire de chaque sous-unité, présentée en figure I.2, comprend des régions amino-terminale et carboxy-terminale cytoplasmiques et six domaines transmembranaires notés S1 à S6. Le segment S4 porte plusieurs des acides-aminés chargés positivement (K ou R), ce qui lui confère des propriétés de senseur de voltage. Il est capable de se mouvoir au sein de la membrane en réponse aux variations de potentiel membranaire (Bezanilla and Perozo, 2003 ; Gandhi et al., 2003) et ceci facilite le changement conformationnel global du polypeptide Shaker qui conduit à l'ouverture du pore du canal (phénomène de "voltage-gating"). Entre les segments S5 et S6, se trouve un domaine P qui participe à la formation du pore. Par analogie avec la structure de canaux animaux (Yool and Schwarz, 1991 ; Doyle et al., 1998), il est admis que les quatre domaines P des quatre sous-unités formant ces canaux Shaker de plante constituent la région du pore proche de la face extracellulaire de la membrane. Ce domaine P possède une séquence spécifique GYG(D/E) qui contribue au transfert sélectif des ions potassiques à travers ces canaux (Heginbotham et al., 1994). Chez les canaux shaker de plante, la région carboxy-terminale cytoplasmique de chaque sous-unité est très longue et possède plusieurs domaines remarquables tels qu'un domaine de liaison aux nucléotides cycliques (CNBD), un domaine riche en acides aminés hydrophobes et acides contribuant à la tétramérisation du canal (K_{HA}) et pour certains canaux Shaker, un domaine Ankyrine constitué de 5 séquences consécutives (motif de 33 acides aminés) permettant des interactions protéine-protéine (Daram et al., 1997 ; Ehrhardt et al., 1997 ; Zimmermann et al., 2001) .

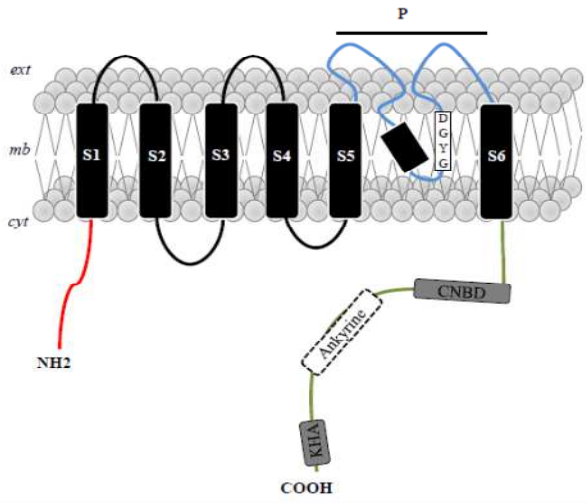


Figure I.2: Structure d'une sous-unité Shaker de plante.
Structure secondaire d'une sous-unité de type Shaker composé d'une région N-terminale cytoplasmique et d'une région C-terminale cytoplasmique. Ces deux régions cytoplasmiques encadrent une région globalement hydrophobe comportant de 6 domaines transmembranaires notés S1 à S6. Le domaine S4 comporte 4 acides-aminés chargés positivement (R et K), ceci fait de ce dernier, un domaine sensible au voltage de la membrane. Entre le domaine S5 et S6, se trouve une région appelée P pour pore puisque cette dernière participe à la formation du pore lors de la structure quaternaire du canal. Dans cette région de trouve une séquence GYG(D/E) qui constitue le filtre de sélectivité du potassium pour les canaux Shaker. La grande région C-terminale cytoplasmique est constitué d'un domaine de liaison des nucléotides cycliques, c'est la région CNBD (cyclic nucleotide binding domain). Pour certains Shaker (AKT1, AKT2 et AKT6), la partie C-ter porte un domaine ankyrine intervenant dans des interactions protéines-protéines. Enfin, un domaine KHA est retrouvé en partie C-terminal, c'est un domaine riche en acides-aminées acides et hydrophobes qui favorisent la clusterisation des canaux.

I.2.2 Classification des canaux Shaker chez Arabidopsis thaliana

A ce jour, les neuf membres qui composent la famille des sous-unités Shaker chez Arabidopsis thaliana sont répartis en cinq sous-groupes (Figure I.3) en fonction de leur homologie structurale et de leurs propriétés fonctionnelles (Lebaudy et al., 2007). Les sous-unités du groupe V (GORK et SKOR chez Arabidopsis thaliana) forment des canaux activés par la dépolarisation membranaire : pour les canaux assemblés à partir de ces sous-unités, la transition de l'état fermé à l'état ouvert est favorisée lorsque le potentiel électrique du cytoplasme devient moins négatif et que le déplacement du segment S4 se fait vers la face cytoplasmique de la membrane. Les canaux de type GORK ou SKOR montrent ainsi un mode de « gating » qui ressemble aux canaux Shaker animaux et, comme ils sont à l'état ouvert pour des potentiels de membrane positifs par rapport au potentiel d'équilibre de K^+, ils catalysent plutôt un efflux de K^+ (canaux "sortants"/"outward channels" ou "à rectification sortante"/"outwardly rectifying channels").

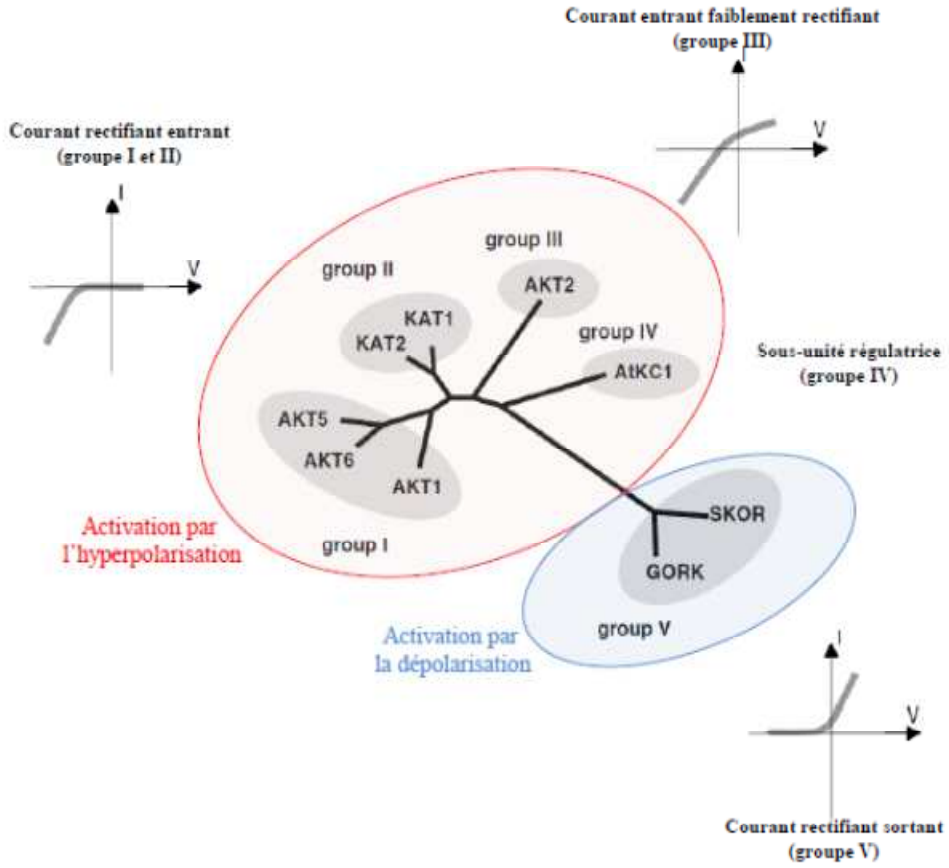


Figure I.3: Phylogénie des 9 sous-unités Shaker chez Arabidopsis thaliana.
Le groupe I est constitué de trois membres (AKT5, AKT6 et AKT1), ce sont des sous-unités à conductances rectifiantes entrantes. KAT1 et KAT2 appartiennent au groupe II, ce sont également des sous-unités à conductances rectifiantes entrantes. La différence entre le groupe I et le groupe II est la présence d'un domaine ankyrine dans la partie C-terminale des membres du groupe I. AKT2 est le seul membre du groupe III, c'est un canal Shaker particulier puisqu'il possède un mécanisme d'ouverture particulier (contrôlé à la fois par le potentiel des membranes et son état de phosphorylation) et montre de ce fait une faible rectification entrante. La groupe IV comporte également un seul membre, AtKC1 qui est une simple sous-unité régulatrice des autres sous-unités Shaker. Enfin, le groupe V est composé de deux membres: SKOR et GORK qui sont des canaux Shaker à rectification entrante. Les sous-unités AKT5, AKT6, AKT1, AKT2, AtKC1, KAT1 et KAT2 sont activées par l'hyperpolarisation de la membrane. Les sous-unités SKOR et GORK sont, elles, activées par la dépolarisation de la membrane (D'après Lebaudy et al. 2007).

Dans la plante (Figure I.4), les canaux GORK et SKOR sont impliqués respectivement dans l'efflux rapide de K^+ lors de la fermeture du stomate, (Ache et al., 2000 ; Hosy et al., 2003) et dans la sécrétion de K^+ dans les vaisseaux du xylème par le parenchyme de la stèle racinaire (Gaymard et al., 1998). Les sous-unités des groupes I à IV, au contraire forment des canaux activés par l'hyperpolarisation membranaire : pour les canaux assemblés à partir de ces sous-unités, la transition de l'état fermé à l'état ouvert est favorisée lorsque le potentiel électrique du cytoplasme devient plus négatif et que le déplacement du segment S4 se fait vers la face extracellulaire de la membrane. De manière étonnante, le même mouvement de S4 (vers le cytoplasme) provoque donc des transitions opposées au plan fonctionnel chez ces deux ensembles de canaux: une transition vers l'état fermé (groupe V) ou l'état ouvert (groupes I à IV). La subdivision en quatre groupes des sous-unités Shaker formant des canaux activés par l'hyperpolarisation est d'abord justifiée par la présence ou non, dans la région carboxy-terminale cytoplasmique de répétition d'un motif "ankyrine". Trois des sept sous-unités en question, dont la première d'entre elles clonée, KAT1 (Anderson et al., 1992 ; Véry et al., 2005), ne possèdent pas ces motifs. Les deux autres ont été appelées KAT2 (Pilot et al., 2001) et AtKC1 (Dreyer et al., 1997 ; Reintanz et al., 2002). Cette dernière n'a pas été appelée KAT3 et se trouve dans un groupe séparé de KAT1 et KAT2 car elle est apparue incapable de former des homotétramères fonctionnels et est désormais considérée comme une sous-unité régulatrice (par hétéromérisation, Cf. § I.2.3) des canaux activés par l'hyperpolarisation (Reintanz et al. 2002 ; Duby et al., 2008 ; Jeanguenin et al., 2011). Les quatre autres sous-unités, porteuses de motifs ankyrine sont subdivisées en deux groupes, celui de AKT1 (Sentenac et al., 1992), SPIK (Mouline et al., 2002) et AKT6 (Lacombe et al., 2000) qui forment des canaux à nette rectification entrante (Gaymard et al., 1996 ; Mouline et al., 2002), tandis que AKT2 (Cao et al., 1995), seul dans son groupe chez Arabidopsis thaliana, forme des canaux à rectification entrante faible (Marten et al., 1999 ; Lacombe et al., 2000) du fait d'un mode de « gating » complexe (Dreyer et al., 2001 ; Michard et al., 2005). En dehors de AKT6, les rôles de ces sous-unités de canaux entrants sont bien documentés (Fig. I.4). Par exemple, AKT1 et AtKC1 sont impliqués dans l'absortion de K^+ au niveau du cortex racinaire (Hirsch et al., 1998 ; Reintanz et al., 2002 ; Duby et al., 2008 ; Jeanguenin et al., 2011), KAT1 et KAT2 dans l'ouverture stomatique (Pilot et al., 2001 ; Lebaudy et al., 2008 ; Cf. § I.4) et AKT2 est impliqué dans l'homéostasie potassique de la sève phloémienne (Deeken et al., 2000 ; Lacombe et al., 2000 ; Deeken et al., 2002 ; Gajdanowicz et al., 2011).

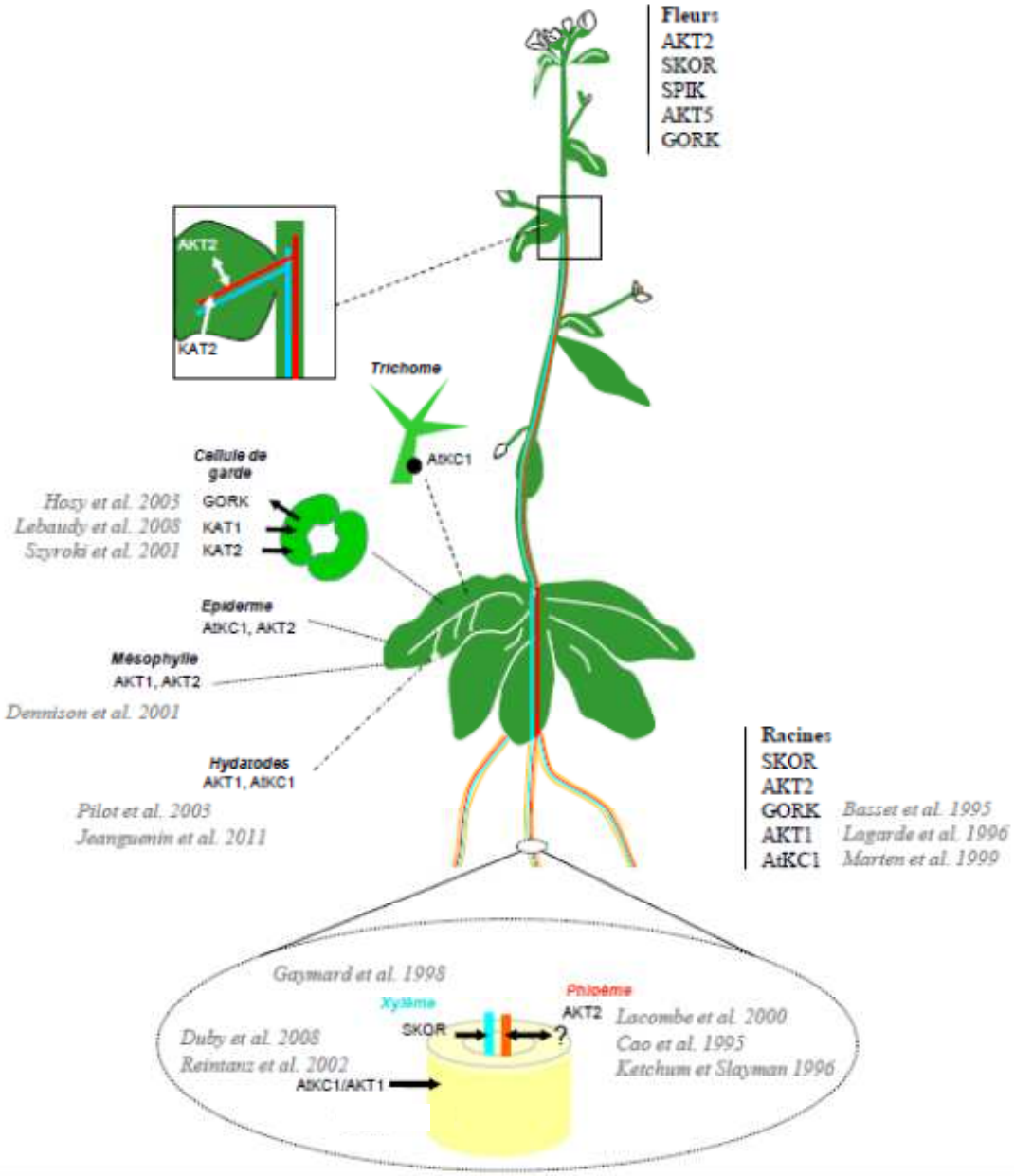


Figure I.4: Profil d'expression des Shaker chez Arabidopsis thaliana.
Le profil d'expression des canaux Shaker est varié en lien avec leurs rôles multiples de ces protéines dans la plante (D'après Lebaudy et al. 2007).

I.2.3 Diversité fonctionnelle et régulation

(i) Hétéro-tétramérisation des sous-unités Shaker

Un canal Shaker peut être formé par 4 sous-unités identiques codées par un même gène, on parle dans ce cas de canal homo-tétramérique (figure I.5A). Si les 4 sous-unités sont codées par des gènes Shaker différents, on parle de canal hétéro-tétramérique. Il a été montré que chez les plantes, les canaux Shaker sont préférentiellement hétéro-tétramériques (figure I.5B) (Lebaudy et al., 2008a). Par exemple, il a été mis en évidence, qu'une sous-unité AtKC1 forme un canal fonctionnel seulement lorsqu'il y a hétéro-tétramérisation avec une autre sous unité telle qu'AKT1 (Geiger et

al., 2009) et est incapable d'interagir avec lui-même et donc de former des canaux homotétramériques (Duby et al., 2008).

Les différentes sous-unités Shaker de type entrantes sont capables de s'hétéro-tétramériser et ceci entraîne une grande diversité fonctionnelle. Les sous-unités AKT2 interagissent avec AtKC1 (Reintanz et al., 2002), mais aussi avec AKT1 (Pilot et al., 2003a), avec KAT2 (Xicluna et al., 2007) et avec KAT1 (Baizabal-Aguirre et al., 1999 ; Obrdlik et al., 2004). Les sous-unités KAT2 sont d'autre part capables de former un canal avec les sous-unités AKT2 (comme vu précédemment) mais interagissent préférentiellement avec KAT1 (Pilot et al., 2001 ; Lebaudy et al. 2010). Les interactions entre les différentes sous-unités sont présentées dans la figure I.5C.

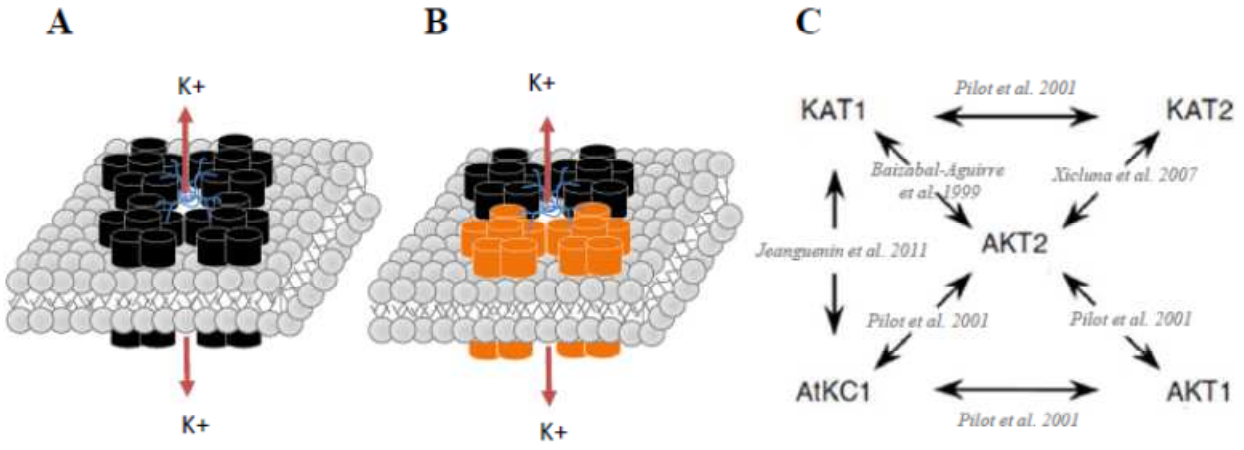


Figure I.5: Structure quaternaire d'un canal Shaker homotétramérique ou hétérotétramérique.
Pour former un canal fonctionnel, 4 sous-unités de type Shaker doivent s'associer. Les 4 domaines P se trouvant au milieu des 4 sous-unités forment un pore laissant passer spécifiquement les ions K^+. Pour former un canal homo-tétramérique fonctionnel, 4 sous-unités de type Shaker identiques doivent s'associer (A). Les canaux Shaker hétéro-tétramériques existent et s'assemblent à partir de sous-unités de types différents (B). Les interactions avérées entre les sous-unités Shaker d'A. thaliana sont résumées dans le panneau C (D'après Lebaudy et al. 2007).

(ii) Régulation des sous-unités Shaker

Le premier facteur régulant l'activité des canaux potassiques Shaker est le potentiel de membrane. D'autres régulations post-traductionnelles ont été montrées. Notamment la régulation par le pH liée à des résidus Histidine comme chez KAT1 (Hoth and Hedrich, 1999), AKT2 ou SKOR (Lacombe et al., 2000a) ou AKT3 (Marten et al. 1999). Une autre voie de régulation post-traductionnelle des canaux Shaker est la phosphorylation notamment en lien avec la signalisation calcique (Cf. § I.2). La signalisation calcique joue ainsi un rôle important dans la régulation de l'activité des Shaker. Deux exemples remarquables de phosphorylation impactant directement le mode de fonctionnement de canaux Shaker sont celui de AKT1, dépendant de sa phosphorylation par CIPK23 (Xu et al., 2006 ; Cf. § I.2.2) et celui de AKT2, dont le mécanisme d'ouverture dépendant du voltage est modulé par une phosphorylation elle-même dépendante du voltage (Michard et al., 2005) par une kinase encore inconnue.

I.2 La signalisation calcique chez les plantes

I.2.1 Ca^{2+} : second messager

La concentration cytoplasmique "basale" du calcium libre est de l'ordre de 0,1 µM, mais cette concentration est largement modulée et peut monter transitoirement jusqu'à plusieurs µM en réponse à une très large gamme de stimuli. Il est admis que la signalisation calcique intracellulaire relaie des "messages" concernant des "contraintes" ou 'stress" dits abiotiques, par exemple nutritionnel (Luan et al., 2009), ou hydrique (Shao et al., 2008 ; Song et al., 2008 ; Asano et al., 2012) et/ou biotiques (Arimura and Maffei, 2010 ; Boudsocq and Sheen, 2013). Le Ca^{2+} est ainsi, avec le pH, les espèces réactives de l'oxygène (ROS), l'oxyde nitrique (NO), etc., un "second messager" qui relaie en intracellulaire les messagers "premiers" ou stimuli, ces différents seconds messagers interagissant d'ailleurs entre eux (Besson-Bard et al., 2008 ; Kader and Lindberg, 2010 ; Mazars et al., 2010). En ce qui concerne la signalisation calcique intracellulaire, si le messager est la concentration de Ca^{2+} libre, par exemple dans le cytoplasme, ie $[Ca^{2+}]_{cyt.}$, le signal est donc, par exemple, une variation de $[Ca^{2+}]_{cyt.}$. Qu'une multiplicité de signaux extracellulaires puissent être relayés dans la cellule par un même signal n'est qu'un paradoxe apparent. En effet, les variations de $[Ca^{2+}]_{cyt.}$ sont modulées en amplitude et en fréquence (Berridge, 1997). Les progrès récents en imagerie calcique in situ ont permis de préciser ces modulations et de forger le terme, qui fait maintenant consensus, de "signature calcique" (McAinsh et Pittman, 2009 ; Dodd et al., 2010 ; Kudla et al., 2010 ; Hashimoto and Kudla, 2011 ; Batistic and Kudla, 2012). Le cytoplasme n'est pas le seul compartiment à être le siège d'une signalisation calcique puisque la vacuole (Peiter, 2011), d'autres organelles (Stael et al., 2012) et le noyau (Mazars et al., 2011), où est documentée une régulation transcriptionelle par le Ca^{2+} (Kim et al., 2009 ; Galon et al., 2010 ; Mazars et al., 2010 ; Ranty et al., 2012), montrent une signalisation calcique. Il est admis que la modulation intracellulaire du signal calcique (le "codage" de la signature calcique) est opéré par des mécanismes de transport rapide de Ca^{2+}, tandis que le décodage de ce signal est opéré par des protéines affines pour le Ca^{2+} (Ca^{2+}-sensing proteins).

Les systèmes de transport membranaires de Ca^{2+} considérés comme susceptibles de participer au codage du signal sont nombreux (Wheeler and Brownlee, 2008 ; Ward et al., 2009 ; Jammes et al., 2011; Spalding and Harper, 2011). Il s'agit généralement de systèmes d'influx contrôlés par un facteur mécanique (mechanosensitive channels : (Monshausen and Gilroy, 2009 ; Kurusu et al., 2013)) électrique (voltage-gated channels, (Peiter, 2011 ; Hamada et al., 2012 ; Suntio and Makinen, 2012)) ou biochimique (ionotropic glutamate receptors, GluRs : (Price et al., 2012), cyclic nucleotide-gated channels, cNGCs, (Ma et al., 2009 ; Ma, 2011) ou de systèmes d'efflux (ATPases pompes à Ca^{2+} ou échangeurs Ca^{2+}/H^{+}, (Bose et al., 2011)). L'identification moléculaire formelle de ces systèmes de transport de Ca^{2+} est loin d'être évidente. Leur rôle dans le contrôle de

la signalisation Ca^{2+} est par contre bien documenté dans deux types cellulaires modèles: le tube pollinique (Konrad et al., 2011 ; Hepler et al., 2012 ; Steinhorst and Kudla, 2013) et la cellule de garde (Kim et al., 2010 ; Roelfsema and Hedrich, 2010 ; Joshi-Saha et al., 2011; Hubbard et al., 2012 ; Sawinski et al., 2013).

Les "Ca^{2+}-sensing proteins" qui sont considérées comme décodant la signature calcique (Hashimoto et Kudla, 2011) sont extrêmement nombreuses, organisées en plusieurs grandes familles : calmodulines (CaM) et "CaM-like proteins" (CMLs : (Perochon et al., 2011)), calcineurin-B-like proteins (CBLs) et "CBL-interacting protein kinases" associées (CIPKs : Luan, 2009 ; Weinl and Kudla, 2009) et Ca^{2+}-dependent protein kinases (CDPKs ou CPKs : Asano et al., 2012 ; Boudsocq et Sheen, 2013). Une synthèse des informations disponibles sur ces différents protéines est donnée ci-dessous (§ I.2.2), en insistant plus particulièrement sur les CDPKs (CPKs) qui ont été l'objet de nos travaux.

I.2.2 Les senseurs de Ca^{2+}

Les variations calciques cytoplasmiques sont rapidement captées par des protéines senseur de Ca^{2+} possédant des motifs EF-hands capable de lier Ca^{2+} de manière spécifique. Ce motif se compose de deux hélices alpha "E" et "F" joins par une séquence peptidique liant un ion Ca^{2+} (Weinman, 1991). Chez A. thaliana, 250 protéines possédant ce motif EF-hands ont été répertoriées (Day et al., 2002). Parmi ces senseurs de Ca^{2+}, nous distinguons les « senseur-relais » et les « senseurs-réponse ». Les senseurs-relais sont capables de lier le Ca^{2+} mais ne possèdent pas d'activité enzymatique. Parmi cette catégorie, nous trouvons la famille des Calmodulines pour "Calcium-dependent modulator protein" (Watterson et al., 1980), Calmoduline-like (CML) et les Calcineurine B-like (CBL). Ces senseurs-relais sont capables de fixer jusqu'à 4 ions Ca^{2+} avec leurs 4 motifs EF-Hands. La fixation de Ca^{2+} induit un changement conformationnel de la protéine et permet de réguler différentes cibles telles que des kinases (CIPK), des phosphatases (PP2A), des facteurs de transcription (CAMTA) et des transporteurs (AtNHX1).

Les « senseur-réponses » possèdent la propriété de lier le Ca^{2+} et sont dotées d'une activité enzymatique. Les familles des CPKs (Calcium-Dependent Protein Kinase), des CRK (CPK- Related Kinase) et les CCaMK en sont les principaux membres. (Harper et al. 1994 ; Cheng et al., 2002) Chez A. thaliana, les CPKs et les complexes CBL/CIPK sont connues pour réguler des systèmes de transport du K^+.

(i) Les CBL/CIPK

Les CBLs sont des protéines senseurs de calcium. Chez A. thaliana, la famille CBL est composée de 10 membres, ces derniers possèdent tous 4 EF-Hands liant le Ca^{2+} (Cheng et al., 2002). Les CBL

sont capables d'interagir de manière spécifique qu'avec des protéines Sérine/Thréonine kinases en réponse à un signal calcique. Ces protéines sont nommées CIPK (CBL-interacting protein kinase), elles sont au nombre de 25 chez Arabidopsis (Kolukisaoglu et al., 2004 ; Luan, 2009 ; Weinl and Kudla, 2009). Leur séquence protéique comprend un domaine kinase, un domaine auto-inhibiteur et un domaine liant les protéines CBL. Chaque CBL peut interagir avec plusieurs CIPK et ces dernières peuvent interagir avec plusieurs CBLs. Les nombreuses cibles de ces complexes CBL-CIPK décrites dans la littérature sont des transporteurs d'ions (Luan, 2009 ; Hashimoto et al., 2012). Le complexe CBL1-CIPK23 participe à la régulation d'AKT1 au niveau des racines. En effet, lorsque la concentration de K^+ est faible, une signalisation calcique se met en place et active la protéine CBL1 (CBL9) qui active à son tour la protéine kinase CIPK23. Le complexe interagit directement avec la région carboxy-terminale du canal AKT1, permettant sa phosphorylation et son activation qui résulte en un influx de K^+ (Li et al., 2006 ; Xu et al., 2006). En 2009, Ho et ses collègues ont mis en évidence que CIPK23 est capable de phosphoryler un transporteur de nitrate : CHL1/NRT1 (Ho et al., 2009). Un autre exemple montre que le complexe CBL4-CIPK6 est capable d'augmenter d'un facteur ≈3 l'activité d'AKT2 en ovocytes en présence de Ca^{2+}. De façon intéressante, en présence de BAPTA, un chélateur de Ca^{2+}, la régulation positive du canal AKT2 par le complexe CBL4-CIPK6 n'a pas lieu. Cette régulation est donc véritablement dépendante du Ca^{2+} (Held et al., 2011).

(ii) Les CPKs

Les CPKs (Ca^{2+}-dependent protein kinase) forment une large famille de 34 membres chez Arabidopsis répartis en 4 sous-groupes en fonction de leur homologie de séquence. L'arbre phylogénétique des CPKs est présenté dans la figure I.6 (Cheng et al., 2002).

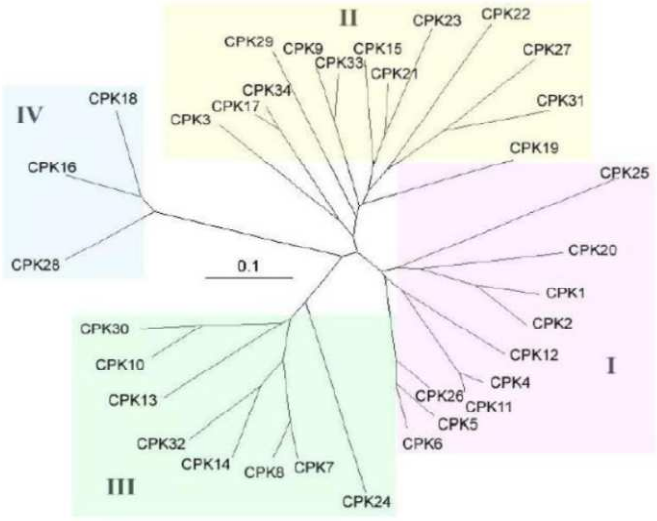


Figure I.6: Arbre phylogénique des 34 CPKs retrouvées chez Arabidopsis thaliana.
Les 34 CPKs sont repartis en 4 sous-groupes en fonction de leurs séquences génomiques. Les divergences entre les différentes CPKs sont proportionnelles à la longueur des branches (10% de divergence = 0.1) (Cheng et al. 2002).

- Structure des CPKs

Ces protéines sont composées d'une partie amino-terminale, d'un domaine Sérine/Thréonine kinase, d'un domaine auto-inhibiteur et d'un domaine CaM/CAD (Calmoduline/CDPK activation domain) comportant au plus 4 EF-Hands (Harmon et al., 2000 ; Harper et al., 2004). La majorité des CPKs comportent 4 EF-Hands. Une minorité de CPKs possèdent 3 EF-Hands : CPK8, CPK10, CPK14, CPK19, CPK23 et CPK32. La protéine CPK13 est la seule à posséder seulement 2 motifs EF-Hands. Enfin, la protéine kinase CPK25 ne possède qu'un seul motif EF-Hand (Cheng et al., 2002). La structure des CPKs et leur mécanisme d'activation par le Ca^{2+} sont présentés respectivement dans la figure I.7A-B. En condition basale (faible concentration de Ca^{2+}), le domaine auto-inhibiteur bloque le domaine kinase de la protéine ne permettant pas ou peu la phosphorylation de substrat. Lorsque la concentration en calcium augmente, les ions Ca^{2+} se lient au domaine CaM permettant un changement conformationnel de la protéine induisant la levée de l'inhibition. Ce mécanisme a été mis en évidence grâce à la réalisation dans un premier temps, de la délétion de la partie CaM induisant la formation d'une protéine constamment inactive même en présence de Ca^{2+}. De plus, dans un second temps, la délation de la partie CaM et du domaine auto-inhibiteur entraîne la formation d'une protéine constitutivement active y compris en absence de Ca^{2+} (Harper et al., 1991 ; Harper et al., 1994). La structure des CPKs et leur mode d'activation a été récemment précisé (Wernimont et al., 2010). La cristallographie met en évidence que les 4 motifs EF-Hands sont répartis deux par deux sur deux grandes hélices : CH1 et CH2. L'hélice CH1 contient le domaine auto-inhibiteur suivi des deux premiers EF-Hands. L'hélice CH2 contient les 2 derniers EF-hands. Il a été démontré, qu'il y a bien un changement conformationnel de la protéine entre l'état inactif et actif de cette dernière. Dans la configuration active, les hélices sont toutes deux cassées en trois petites hélices permettant la libération du domaine kinase et donc son accessibilité.

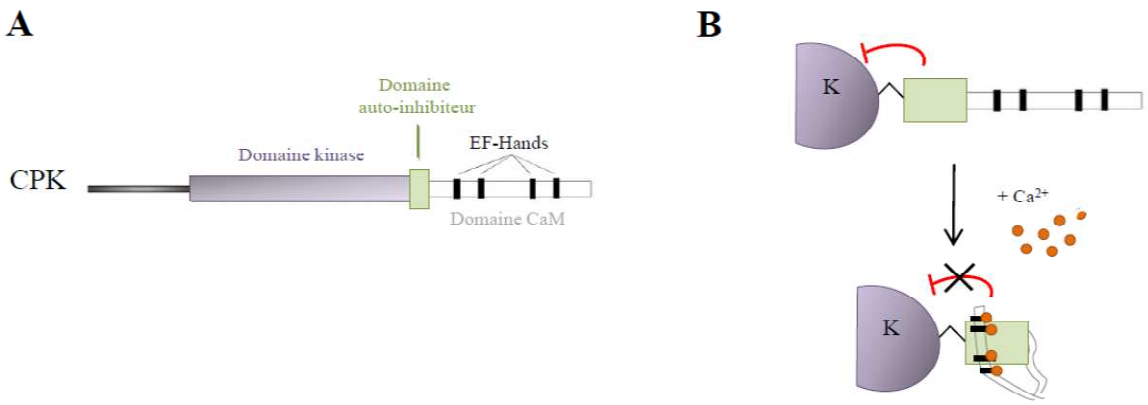


Figure I.7: Structure et mécanisme d'activation des CPKs.
A. Structure des CPKs comprenant un domaine kinase en N-terminal, un domaine kinase, une domaine auto-inhibiteur et un domaine CaM (Calmoduline) en C-terminal comprenant 4 motifs EF-Hands pouvant fixer 4 ions Ca^{2+}. B. Mécanisme d'activation des CPKs. En absence de Ca^{2+}, le domaine auto-inhibiteur maintient l'inactivation du domaine kinase de la protéine (matérialisé en rouge). En présence de Ca^{2+}, 4 ions calcium se lient au domaine CaM ce qui engendre un changement conformationnel de la protéine induisant une levée de l'inhibition du domaine kinase (matérialisé en rouge). La protéine est alors active.

Etonnamment, les CPKs ne sont pas toutes dépendantes de Ca^{2+}. En effet, d'après une étude publiée en 2012, les CPKs sont regroupées en trois groupes selon leur dépendance vis-à-vis du calcium : (i) certaines CPKs sont très sensibles au calcium telles que CPK2, CPK5, CPK4 et CPK11; (ii) d'autres CPKs sont dépendantes au calcium mais sont beaucoup moins sensibles, c'est le cas de CPK3, 9 et 19; (iii) enfin, certaines CPKs sont caractérisées comme insensibles au calcium, comme les CPK7, CPK13 et CPK30 (Boudsocq et al., 2012).

- Régulation de l'activité des CPKs

Les CPKs peuvent faire l'objet de plusieurs modifications post-traductionnelles. Notamment, les CPKs peuvent être myristoylées. En tout cas, plusieurs CPKs possèdent dans leur partie amino-teminale, un résidu Glycine (G) en deuxième position qui rend possible une modification post-traductionnelle dite de myristoylation, résultant de l'attachement sur ce résidu G d'un acide myristique (C14:0) (Benetka et al., 2008). L'attachement de ce dernier permet l'ancrage de la protéine aux membranes. Presque toutes les CPKs sont décrites comme étant myristoylées à l'exception de 6 : CPK4, CPK5, CPK11, CPK12, CPK19 et CPK26 (Cheng et al., 2002). Les CPKs myristoylées sont donc localisées à la membrane plasmique des cellules telles que CPK2, CPK6, CPK9 et CPK13. Des formes mutantes de ces 4 CPKs ont été réalisées par Benetka et ses collègues (Benetka et al., 2008). Ils ont substitué le résidu Glycine en position 2 en résidu Alanine. Ces mutants nommés G2A ne sont pas capables d'être myristoylés. Les protéines CPK2-G2A, CPK6-G2A, CPK9-G2A et CPK13-G2A ne sont plus localisés nettement à la membrane mais sont diffus dans le cytoplasme, voir dans le noyau.

La seconde modification post-traductionnelle que peuvent subir les CPKs, est la phosphorylation. En effet, les CPKs s'auto-phosphorylent avant de pouvoir phosphoryler une autre cible: on parle d'activation des CPKs par autophosphorylation. Le mécanisme de déphosphorylation des CPKs est très peu décrit. Par exemple, chez le haricot, une protéine phosphatase (WbPP) a un effet inhibiteur sur l'autophosphorylation de la protéine kinase CDPK1 (Ganguly and Singh, 1999). Un autre exemple est celui de trois protéines phosphatases appartenant à la famille PP2C (ABl1, ABl2 et PP2CA) qui sont capables d'inhiber l'activité kinase de CPK6 (Brandt et al., 2012). Les CPKs peuvent donc être une cible des phosphatases, ce qui les maintient dans un état inactif.

Les CPKs peuvent être régulées par d'autres facteurs comme des phospholipides. Par exemple, l'activité kinase de CPK1 (pois-chiche) est augmentée de 80% (réaction de phosphorylation in vitro) par l'ajout de phospholipides (lysophosphatidylcholine et phosphatidylinositol) ce qui suggère que ces phospholipides aideraient l'ancrage des protéines à la membrane (Dixit and Jayabaskaran, 2012). Enfin, la protéine CPK1 se lierait aux protéines 14-3-3

et serait stimulée par cette liaison, ceci par une séquence spécifique de liaison aux 14-3-3 qui est retrouvée chez CPK24 et CPK28 (Camomi et al., 1998 ; Cheng et al., 2002 ; Latz et al., 2013a).

L'ensemble de ces données bibliographiques montre que les phosphatases, les phospholipides et les 14-3-3 peuvent être des régulateurs de l'activité des CPKs (Schulz et al., 2013).

- Rôles des CPKs

Les CPKs sont décrites comme étant des régulateurs de voies de signalisation. Elles agissent comme des senseurs de Ca^{2+}. Elles peuvent moduler l'action des hormones telles que les cytokinines ou l'ABA (Mori et al. 2006). Certains processus de croissance et de développement de la plante font intervenir les CPKs à travers la signalisation calcique. Les CPKs sont impliquées dans la croissance du tube pollinique chez le maïs (Estruch et al., 1994). Les CPKs sont également engagées dans les processus d'embryogénèse, de germination des graines (Anil et al., 2000).

Enfin les CPKs sont fortement sollicitées dans la régulation des mouvements stomatiques à travers l'activation ou l'inhibition des canaux potassiques chez la plante. Le canal potassique KAT1 (exprimé dans les stomates) peut être régulé par phosphorylation par une CPK de fève (Li et al., 1998). Les CPKs sont capables d'augmenter l'activité de ce canal en ovocyte de xénope (Berkowitz et al., 2000). Plus tard, il a été montré, toujours en ovocytes, que CDPK3 (CPK6) active l'activité du canal SLAC1, un agent majeur des mouvements stomatiques (Brandt et al., 2012). Le site phosphorylable de SLAC1 permettant l'activation par la kinase a été identifié (Brandt et al., 2012). Enfin, plusieurs lignées Knock-out (KO) pour les CPKs possèdent des défauts dans les mécanismes d'ouverture et de fermeture stomatique (lignées cpk10, cpk4/cpk11et cpk3/cpk6/cpk23 : (Mori et al., 2006 ; Geiger et al., 2010 ; Munemasa et al., 2011 ; Hubbard et al., 2012).

Certaines CPKs pourraient jouer un rôle majeur dans la régulation des mouvements stomatiques en particulier en ciblant les canaux potassiques Shakers (Li et al. 1998). Parmi les 34 CPKs présents chez Arabidopsis, au moins 8 d'entre elles sont exprimées dans la cellule de garde : CPK3, CPK4, CPK6, CPK7, CPK11, CPK13, CPK33 (Leonhardt et al., 2004 ; Mori et al., 2006), et CPK23 (Ma and Wu, 2007).

I.4 Rôles des canaux potassiques Shaker dans les stomates

Les stomates sont des organes microscopiques situés à la surface des parties aériennes des végétaux (principalement au sein de l'épiderme abaxial et adaxial des feuilles) qui sont constitués de deux cellules de garde de forme arquée et ménageant entre elles un pore central. Les stomates contrôlent les échanges gazeux entre la plante et l'atmosphère. Ces pores permettent à la plante à la fois, de capter le CO_2 atmosphérique nécessaire à la photosynthèse et de libérer de la vapeur d'eau afin que la plante puisque contrôler sa température. Cette transpiration foliaire est le principal moteur, le

jour, de la circulation de la sève xylémienne et donc de la distribution de l'eau et des ions minéraux qui s'y trouvent. Afin de contrôler ces échanges gazeux, les mouvements stomatiques sont finement contrôlés.

I.4.1 Mécanisme général d'ouverture et de fermeture stomatique

Le degré d'ouverture et de fermeture des stomates est dépendant de l'état de turgescence des cellules de garde (Raschke, 1975). L'ouverture stomatique peut-être déclenchée par différents signaux comme la lumière (Assmann and Zeiger, 1985 ; Serrano et al., 1988), l'auxine (Lohse and Hedrich, 1992) ou la toxine fongique fusicoccine (Assmann and Schwartz, 1992). En réponse à ces signaux, la pompe à protons ATPase de type P fait sortir les ions H^+ de la cellule et induit une hyperpolarisation de la membrane. Cette dernière active les canaux potassiques Shaker entrants tels que KAT1 et KAT2 (Schroeder et al., 1984 ; Schroeder et al., 1987 ; Schroeder, 1988 ; Schroeder and Fang, 1991) induisant un influx de potassium dans la cellule de garde, accompagné d'un influx (actif) d'anions et d'une production de malate afin de maintenir l'électro-neutralité. Par osmose, ces flux massifs d'ions dans la cellule entraînent une entrée d'eau qui augmente la turgescence des cellules de garde qui se déforment en entraînant une augmentation du diamètre du pore.

A l'inverse, des signaux externes comme l'absence de lumière, l'augmentation de la teneur atmosphérique en CO_2 ou des signaux internes comme l'ABA déclenchent une fermeture (relative) du pore stomatique (Vavasseur and Raghavendra, 2005). Ceci est médié par une inhibition de la pompe H^+/ATPase et une activation de canaux anioniques entraîne une sortie de malate à travers des canaux anioniques perméables au malate (Van Kirk and Raschke, 1978) et une dépolarisation de la membrane qui active des canaux Shaker sortants comme GORK permettant l'efflux de potassium à l'extérieur des cellules de garde (Schroeder et al., 1987 ; Blatt, 1988 ; Hosoi et al., 1988). Par un effet osmotique, ces efflux massifs d'ions entraînent une sortie d'eau qui conduit à une diminution de la turgescence des cellules de garde et donc à la fermeture du stomate.

I.4.2 Implication des canaux Shaker dans la physiologie du stomate

La sous-unité GORK est exprimée dans la tige, les fleurs, les feuilles et les stomates (Ache et al., 2000). Le canal GORK joue notamment un rôle important dans les stomates (Hosy et al. 2003). L'utilisation du mutant gork montre ainsi un défaut dans la fermeture stomatique en réponse à l'acide absicique (ABA) et à l'obscurité. La sous-unité KAT1 est exprimée majoritairement dans les stomates. KAT1 est ainsi impliqué dans les mouvements stomatiques mais n'est pas indispensable (Szyroki et al., 2001). En effet, une lignée KO-kat1 entraine une perte de 50% de la conductance potassique sur des protoplastes de cellules de garde mais cette diminution drastique n'entraîne pas

de défaut dans l'ouverture stomatique (Szyroki et al., 2001). KAT2, quant à lui, est retrouvé dans les tissus vasculaires des feuilles, dans les stomates, dans les pétioles et dans le phloème. Son rôle dans l'ouverture stomatique a clairement été démontré (Butt et al. 1997 ; Pilot et al., 2001). Le mutant ko-kat2 ne présente pas de différences phénotypiques en comparaison à une lignée sauvage (Lebaudy et al., 2008b). En se basant sur le fait que les canaux Shaker sont préférentiellement des hétéro-tétramères, Lebaudy et ses collègues ont créé une lignée appelée Kincless (K^+ inward current less) qui exprime un dominant négatif de la sous-unité KAT2 dans un fond KO-kat2. En patch-clamp, les protoplastes des cellules de garde du Kincless n'ont plus de conductance potassique entrante. Cette lignée Kincless possède également un défaut d'ouverture stomatique en réponse à la lumière. A long terme et dans des conditions de stress lumineux, ce défaut d'ouverture stomatique entraîne, pour la lignée Kincless, un retard de croissance à hauteur de 20% environ par rapport à une lignée sauvage (Lebaudy et al., 2008b). La sous-unité KAT2 est donc impliquée dans l'ouverture stomatique.

I.5 Rôles des canaux potassiques Shaker dans les tissus vasculaires et les hydathodes

Les tissus vasculaires comprennent, en plus des vaisseaux conduisant la sève phloémienne et la sève xylémienne, des cellules périphériques qui opèrent des échanges entre ces sèves et les autres tissus de la plante. Le réseau xylémien conduit aux stomates et hydathodes, exutoires de l'excès de sève. Les stomates, pendant les phases diurnes de photosynthèse permettent la transpiration, mais lorsqu'ils sont fermés (obscurité ou très forte hygrométrie de l'air par exemple), les hydathodes permettent le phénomène de guttation qui contribue au maintien, dans ces conditions, de la circulation de sève brute. Les hydathodes appartiennent à ces tissus vasculaires avec comme fonction particulière de contrôler la composition ionique du liquide de guttation.

Deux gènes Shaker exprimés dans le phloème sont KAT2 et AKT2. On sait que KAT2 et AKT2 sont capables de former des hétéromères (Xicluna et al., 2007) et que les canaux résultant héritent des propriétés fonctionnelles particulières de AKT2 (Geiger et al., 2002). AKT2 est donc censé jouer un rôle majeur dans le phloème (Deeken et al., 2000 ; Lacombe et al., 2000 ; Deeken et al., 2002). En étudiant le phénotype de lignées mutantes sur le locus AKT2, mutants gain ou perte de fonction, et en analysant les données avec un modèle thermodynamique des échanges d'ions et de sucre entre les vaisseaux du phloème et les tissus vasculaires, Gajdanowicz et al. ont montré que AKT2 est impliqué dans l'homéostasie de la charge en sucre de la sève phloémienne (Gajdanowicz et al., 2011).

Plusieurs autres sous-unités Shaker sont exprimées dans ces tissus vasculaires. Le canal SKOR est exprimé dans les tissus vasculaires au niveau des racines. Il permet le transfert du potassium depuis

le symplasme cortical dans la sève xylémique (Gaymard et al., 1998). Un mutant skor-1 a été construit, et il a été retrouvé chez ce dernier une concentration de potassium environ deux fois plus faible dans la sève xylémienne et dans les parties foliaires que chez une plante sauvage (Gaymard et al., 1998). Les sous-unités AKT1 (Lagarde et al., 1996) et AtKC1 (Pilot et al., 2003b) sont exprimées dans les hydathodes. De façon intéressante, en cas de stress salin, l'expression d'AtKC1 est amplifiée dans ces organes. Plus récemment, il a été décrit dans la littérature par Jeanguenin et ses collègues qu'AtKC1 régule l'activité des canaux AKT1, KAT1 et KAT2 et modifie leurs propriétés électrophysiologiques (Jeanguenin et al., 2011). Dans cet article, les auteurs montrent que les canaux Shaker entrants sont co-localisés avec AtKC1 dans les hydathodes et ils émettent l'hypothèse que ceci permet de contrôler la perte de K^+ par l'exsudation sans doute en laissant sortir l'excès d'ions Na^+.

En conclusion, lors de stimuli environnementaux, la plante met en place des réponses physiologiques appropriées. Ces réponses passent, en partie, par la régulation des mouvements stomatiques mais également par les tissus vasculaires y compris les hydathodes et impliquent notamment les canaux potassiques Shaker.

I.6. Objectifs de ma thèse

En conclusion de cette étude bibliographique, nous savons donc qu'en lien avec leurs fonctions dans les différents tissus de la plante, l'activité des canaux Shaker est régulée par différents facteurs : pH, voltage, protéines kinases. Dans ces travaux de recherche, un accent particulier est mis sur le rôle de protéines kinases régulées par le Ca^{2+}, notamment les CPKs, qui sont susceptibles de réguler l'activité de canaux Shaker en réponse à des signalisations de stress médiées par $[Ca^{2+}]_{cyt.}$.

Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse était d'obtenir de nouvelles données sur la régulation de canaux de type Shaker par des CPKs en cherchant à découvrir pour ces partenaires en interaction, un rôle dans l'adaptation de la plante à des stimuli environnementaux.

Les résultats de ma thèse sont présentés en trois chapitres :

(i) Travaux préparatoires, mise en place de nouveaux outils, choix de cibles moléculaires pour l'étude (chapitre III). Dans ce chapitre, sont décrits les résultats préliminaires obtenus dans l'équipe. Les étapes de clonage des sept CPKs étudiées sont également expliquées, ainsi que la production de protéines recombinantes et leur caractérisation biochimique vis-à-vis du Ca^{2+}. Des puces à peptides ont été utilisées pour tenter de déterminer les sites de phosphorylation des canaux Shakers par les CPKs. Enfin, l'imagerie in planta avec différentes lignées transgéniques (GFP-

Aequorine, gènes rapporteurs) a été mise en place afin de visualiser les variations de calcium et d'étudier leurs impacts sur l'expression de gènes in vivo.

(ii) Régulation des mouvements stomatiques par CPK13 à travers le canal potassique Shaker KAT2 (chapitre IV). Ce chapitre présente la régulation de KAT2 par CPK13 chez Arabidopsis thaliana au niveau du stomate. La fonction de cette kinase dans cet organe était encore inconnue. Une étude fonctionnelle de la CPK13 a alors été réalisée grâce à l'utilisation de lignées transgéniques sur-exprimant cette kinase. Un phénotypage et des mesures de conductances ont permis de préciser le rôle de CPK13 dans le stomate. Le profil d'expression de cette kinase a été étudié grâce à une lignée pCPK13::GUS. Enfin, des mesures biophysiques telles que le FRET-FLIM et le voltage-clamp ont été réalisées pour mettre en évidence respectivement une interaction physique entre CPK13 et KAT2 et une régulation de l'activité du canal par la kinase.

(iii) Rôle de CPK6 dans la résistance au stress salin chez Arabidopsis à travers le canal KAT2 (chapitre V). Ce chapitre décrit le rôle de CPK6 dans la tolérance au stress salin par l'intermédiaire de KAT2. Des lignées pCPK6::GUS et pCPK6::LUC, ont été générées puis utilisées pour réaliser de l'imagerie en condition normale et en condition de stress salin. Des techniques de FRET-FLIM et de voltage-clamp ont également été réalisées pour déterminer l'impact de CPK6 sur le canal KAT2. Une approche FRET-FLIM a été utilisée pour mettre en évidence une interaction directe entre les deux protéines. Enfin, une phosphorylation sur puce à peptides a permis de mettre en évidence les peptides susceptibles d'être à l'origine de la régulation de KAT2.

II. Matériel et méthodes

II.1 Matériel Végétal

II.1.1 Stérilisation des graines et culture de plantules en milieu gélosé

Les graines sont stérilisées à l'aide d'une solution de lavage (0.6% (m/v) Bayroclore, 50% Ethanol) et sont placées sous forte agitation pendant 10min. Elles sont ensuite rincées par 3 lavages successifs avec de l'eau stérile puis placées dans 1 ml d'eau. Les graines sont alors déposées sur des boîtes de Petri carrées sur 40 ml de milieu "MS/2"(Murashige Skoog dilution 1/2) gélosé (2,2 $g.l^{-1}$ "MS" (Sigma), 10 $g.l^{-1}$ Saccharose, 0,5 $g.l^{-1}$ MES-KOH pH 5,7, 0,7% (m/v) agar) et supplémenté ou non d'antibiotiques : 50 $\mu g.l^{-1}$ de kanamycine, ou 30 $\mu g.l^{-1}$ d'hygromycine en fonction de la résistance des plantes. Les boîtes sont scellées par du sparadrap Urgopore (URGO®, France) et sont placées pendant 48 h à 4°C dans l'obscurité pour le processus de stratification. Elles sont ensuite déposées en position horizontale dans un cabinet de culture (16 h de photopériode, 90 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ de lumière, 21,5°C, 65 % hygrométrie) pour une durée de 10 jours.

II.1.2 Culture des plantes en serre

Pour réaliser des transgénèses ou pour amplifier des graines d'une lignée, les plantules de 10 jours sont repiquées sur terreau dans des pots individuels, et sont mises en culture à la serre (16 h de photopériode, 20-25°C) respectivement jusqu'au stade de la floraison puis de la graine. Les graines sont alors récoltées et conservées dans une armoire à graine.

II.1.3. Culture des plantes en chambre de culture

Pour réaliser des mesures d'ouverture stomatique ou bien réaliser des colorations GUS, les plantules préparées comme au §II.1.1, sont mises en culture sur terreau dans des pots de poids connu et sont placées en chambre de culture en conditions "jours courts" (8 h de photopériode, 300 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ de lumière, 22°C, 70 % d'hygrométrie). L'arrosage se fait tous les deux jours par un ajout de 20 ml d'eau par pot.

- Application d'un stress lumière en chambre de culture

Les graines de ces différentes lignées à phénotyper, sont semées sur gélose MS/2 (voir §II.1.1) et sont cultivées pendant 10 jours en conditions standards (voir §II.1.1). Après 10 jours de culture, les plantules sont repiquées sur terreau dans des pots de poids connu. Les pots sont placés dans un cabinet (19°C et HR 65%) pour l'application du "stress photopériode" consistant à fractionner la période d'éclairage (≈ 300 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ de lumière) de 8 h en 4 périodes de 2 h espacées par 4 h d'obscurité. L'arrosage se fait tous les deux jours par un ajout de 20 ml d'eau par pot. Les plantes

poussent dans ces conditions pendant 20 jours. Les rosettes sont pesées et photographiées. L'aire occupée par les feuilles et leur nombre sont déterminés pour chaque plante (analyse des photographies à l'aide du logiciel Image J).

II.2 Clonage avec le système Gateway®

La technologie Gateway est utilisée comme plateforme de clonage (technologie empruntée au bactériophage Lambda, (Landy, 1989). Cette technologie a été développée pour cloner un gène de façon rapide à partir d'un vecteur donneur dans un vecteur dit de « destination » par une simple recombinaison.

II.2.1 PCR d'assemblage

Le clonage par recombinaison à l'aide du système Gateway se fait en deux étapes. La première étape consiste en deux PCR successives : PCR1, avec une enzyme iProof (BioRad) et les amorces spécifiques du gène contenant 10 bases de la cassette Gateway (prog : 5 min 98°C et 15 cycles : 15 sec 98°C; 30 sec 55°C; 30 sec/kb 72°C) et PCR2, avec les amorces universelles U5 et U3 qui contiennent la cassette Gateway (prog : 5 min 98°C et 15 cycles : 25 sec 98°C; 30 sec 55°C; 30 sec/kb 72°C). Le résultat de ces deux PCR conduit à l'amplification du fragment d'intérêt encadré par les sites de recombinaisons Gateway® attB1 et attB2. Les amorces utilisées durant ma thèse sont présentées en annexe (annexe 1). Le fragment PCR est alors purifié à l'aide d'une précipitation au PEG (45 µl de produit PCR, 225 µl de PEG et 1 µl de glycogène azur (20 $mg.ml^{-1}$). Le mix est mis à -20°C pendant 20 min puis il est centrifugé 15 min à 13000 rpm et enfin le culot est repris dans 20 µl de TE.

II.2.2 Réaction BP- Recombinaison entre les sites attB et attP (BP)

Les sites attB1 et attB2 sont reconnues spécifiquement par une enzyme BP Clonase, cette dernière réalise une recombinaison entre le gène d'intérêt flanqué des sites attB1 et attB2 et la cassette de toxicité CmR-ccdB) (contenant le gène de résistance au chloramphénicol (Cm^r) et le gène codant pour la protéine cytotoxique (ccdB)) flanquée des sites attP1 et attP2 du plasmide pDONR207® (Voir figure II.1). Pour la réaction de BP, 2 µl de produit PCR purifié sont incubés toute la nuit à 25°C en présence de plasmide pDONR207® (1 µl à 50 $ng.\mu l^{-1}$) dans un milieu réactionnel de 5 µL contenant 1 µl de tampon de réaction clonase 5X, 0,5 µl de BP clonase et 1 µl de TE (Tris-HCl pH 8-EDTA). La réaction de BP est stoppée par l'ajout de 1 µg de Protéinase K durant 15 min à 37°C.

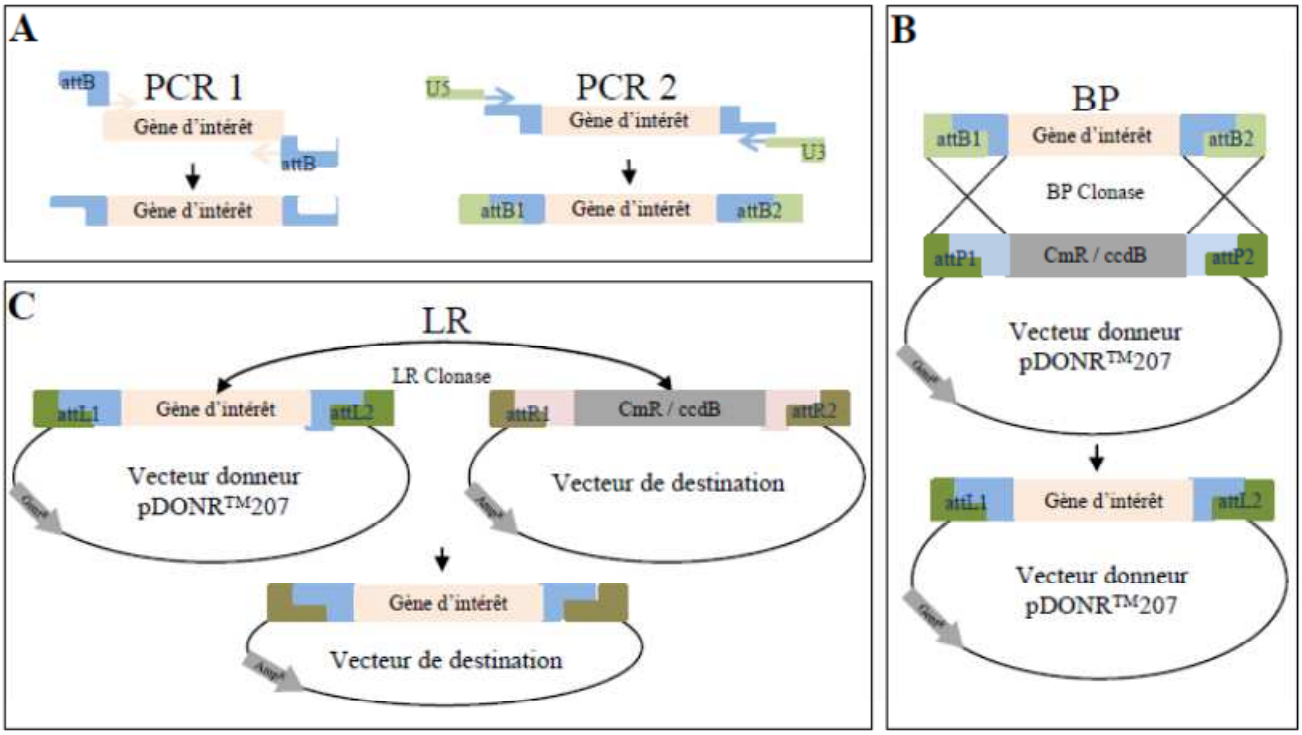


Figure II.1: Clonage par la technique Gateway (gateway® Recombination Cloning Technology).
Cette technologie Gateway permet de cloner un gène d'intérêt dans un vecteur donneur (pDONR207) et de le transférer dans un second vecteur de destination par une simple recombinaison.
A. La première étape est la PCR1 dite « d'assemblage » qui consiste cloner le gène d'intérêt (schématisé en beige) avec à ses extrémités 5' et 3' des séquences spécifiques (attB). Ces séquences seront reconnues par des amorces universelles U5 et U3 lors de la seconde PCR. A la fin des 2 PCR, le gène est adjoint en 5' et 3' à deux sites attB1 et attB2. B. Ces deux sites sont reconnus spécifiquement par une enzyme appelée BP clonase et permettent de cloner le gène d'intérêt dans un plasmide donneur (pDONR™207) par recombinaison homologue entre les sites attB1-attP1 et attB2-attP2. Il en résulte une substitution de la cassette de toxicité (CmR/ccdb) contenu dans le plasmide pDONR207 par le gène d'intérêt. La cassette de toxicité contient un gène codant pour la protéine cytotoxique (ccdB) et un gène de résistance au chloramphénicol (Cm^r). C. Une fois que le gène est cloné dans le plasmide donneur, une seconde enzyme appelée LR clonase peut être utilisé pour intégrer le gène dans un second vecteur dit « de destination » toujours par recombinaison entre les sites attP1-attL1 et attP2-attL2. La cassette de toxicité (CmR/ccdb) du plasmide de destination est remplacée par le gène d'intérêt.

II.2.3 Transformation des bactéries DH5α par choc thermique

La transformation des bactéries thermo-compétentes est réalisée par choc thermique. Ce dernier se fait en présence 4 µl de plasmide issu de la recombinaison BP et 100 µl de bactéries thermo-compétentes (DH5α). Le mix est gardé 30 min dans la glace, 45 sec à 42°C puis de nouveau 30 min à 4°C. Après le choc thermique, 800 µl de milieu SOC (Super Optimal broth with Catabolit repression) (2 % Tryptone, 0,5% extrait de levure, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM, glucose 20 mM, ajustement du pH à 7 avec NaOH) sont ajoutés au mix réactionnel et les bactéries sont placées durant 45 min à 37°C sous agitation (200 rpm). Après cette incubation, 100 µl de cette solution bactérienne sont étalés sur boîtes de gélose LB (Lysogeny Broth) (10 $g.l^{-1}$ bacto tryptone, 5 $g.l^{-1}$ extrait de levure, 5 $g.l^{-1}$ NaCl, ajustement du pH à 7 avec NaOH) supplémentée de 50 µg/ml de gentamycine puis les boîtes sont mises à 37°C toute la nuit. Seuls les

clones bactériens possédant le plasmide recombiné leur conférant une résistance à la gentamicine, poussent sur la gélose durant la nuit.

II.2.4 Criblage par PCR

Les colonies bactériennes présentes sur la gélose sont criblées par PCR utilisant une amorce sens spécifique du plasmide et une amorce anti-sens spécifique du gène d'intérêt afin de s'assurer que le plasmide est bien présent et qu'il contient le gène d'intérêt. Le mix PCR est réalisé avec 0,5µl d'amorce DNR5 (10 mM), 0,5 µl d'amorce anti-sens du gène (10 mM), 0,5µl de dNTP (10 mM), 2,5 µl de tampon goTaq de 1 µl de goTaq polymérase. Le programme PCR utilisé est le suivant : 5 min à 95°C et 30 cycles de 30 sec à 95°C, 30 sec à 55°C et 1 min/kb à 72°C. Les produits PCR sont vérifiés avec une électrophorèse sur gel 1% agarose en présence de BET (Bromure d'Ethidium).

Les colonies positives d'après le gel d'agarose (fragments PCR compatible avec la taille attendue) sont repiquées dans 10 ml de LB+ gentamicine et sont incubées toute la nuit à 37°C sous agitation (200 rpm). Le lendemain, des stocks glycérol sont préparés avec les 3 clones différents en ajoutant 800 µl de ces cultures bactériennes à 200 µl de glycérol (20 % final), après homogénéisation. Ces stocks sont conservés à -50°C. Le reste des différentes cultures est centrifugé 10 min à 5600 rpm avant l'extraction des plasmides (ci-dessous). Après l'étape de séquençage présentée ci-dessous, les stocks glycérol sont jetés ou gardés.

II.2.5 Extraction des plasmides et séquençage

Les plasmides sont extraits à partir des culots bactériens à l'aide d'un kit de purification de plasmide (GenElute Plasmid Miniprep, ref : NA0160-1KT, SIGMA) et sont dosés à l'aide du Nanodrop (Spectophotometre, Thermo Scientific).

Une partie des plasmides extraits (15 µl d'une solution à 75 $ng.\mu l^{-1}$) est envoyée à une entreprise de séquençage (Eurofin) afin de vérifier la séquence du gène d'intérêt. Le reste de plasmide est conservé à -20°C.

II.2.6 Réaction LR- Recombinaison homologue entre les sites attL et attR (LR)

Une fois que le gène d'intérêt est correctement intégré au plasmide donneur pDONR207 (figure II.2A), il est transféré dans le plasmide dit de destination, par une réaction de "LR cloning" (Voir figure II.1). Cette réaction se fait durant 4 h à 25°C en présence de 300 ng de plasmide de destination (pDEST15/17 (figure II.2B), pGWB 523/534/533 (figure II.2C-E), pGEM-GWC (figure

II.2F) ou pEarley Gate 101/102 (figure II.2G-H), 100 ng de pDONR207 contenant le gène d'intérêt, 2 µl de tampon de réaction 5X et 2 µl de LR clonase et 2 µl de TE (8 µl finale). La réaction de LR est également stoppée à l'aide de 1 µg de Protéinase K.

Les plasmides de destination recombinés sont vérifiés comme dans le §II.2.3-2.4 et les clones bactériens sont sélectionnés sur gélose LB supplémentée d'antibiotiques appropriés en fonction du gène de résistance contenu dans le plasmide (voir figure II.2). Le criblage des colonies positives, l'extraction de plasmides et l'envoi au séquençage se font respectivement comme dans les §II.2.4 et II.2.5.

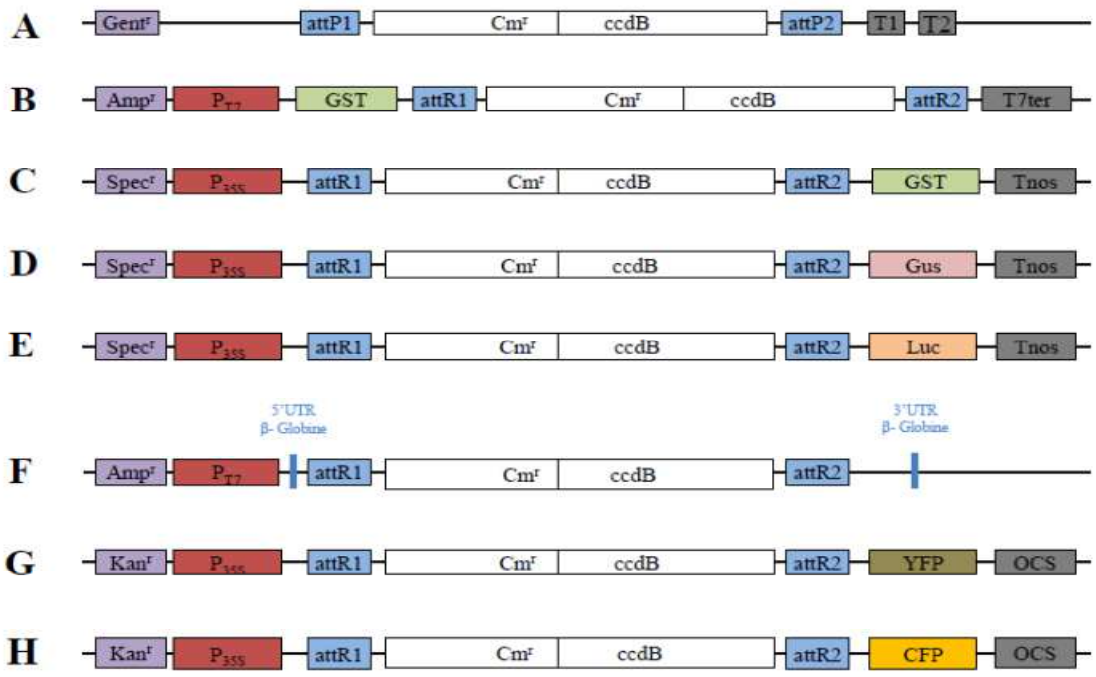


Figure II.2 : Cassette Gateway des différents plasmides utilisés au cours de la thèse.
La technologie Gateway utilise le principe de la recombinaison homologue entre le plasmide « donneur » (pDONR207) (A) et les plasmides de destinations (B-E). (A) Cassette Gateway du plasmide pDON207 contenant les sites de recombinaisons (attP1 et attP2) encadrant la cassette de toxicité (CmR/ccdb), le gène de résistance à la gentamicine (Gent^r), les sites de terminaison (T1 et T2), (B) Cassette Gateway du plasmide pDEST15 contenant un gène de résistance à l'ampicilline (Amp^r) un promoteur T7, un tag GST, les sites attR1 et aattR2, la cassette de toxicité et un terminateur T7. (C-E) Cassette Gateway du plasmide pGWB523-533 et 535 contenant un gène de résistance à la spectinomycine (Spec^r), un promoteur fort 35S (P_{35S}), les sites attR1 et attR2, respectivement les gènes de la Glutathione S-transerase (GST), de la β-glucoronidase (GUS) et le gène de la Luciférase (Luc) et un terminateur nos (Nopaline synthase). (F) Cassette du plasmide pGEMGWC qui est un plasmide pGEM Xho dans lequel une cassette Gateway a été insérée. Elle est composé d'un gène de résistance à l'Ampicilline, un promoteur T7, la cassette de toxicité et les régions 5' et 3' non-transcrites de la β- Globine. (G-H) Cassette Gateway des plasmides pEarley Gate 101 et 102 contenant un gène de résistance à la kanamycine (Kan^r), un promoteur P35S, les sites attR1 et attR2 flanquant la cassette de toxocité, respectivement les gènes YFP et CFP en C-terminal et un terminateur OSC (Octopine synthase gene). Les vecteurs C, D, E, G et H sont des vecteurs binaires.

II.2.7 Mutagénèse dirigée

La mutagénèse dirigée est réalisée directement sur le plasmide contenant le gène/la séquence d'intérêt à muter. Le protocole utilisé est une adaptation du kit QuickChange Mutagenesis

(Stratagene). Des amorces spécifiquement dessinées pour la mutation dirigée sont utilisées. Elles doivent répondre à plusieurs critères: comprendre entre 25-45 paires de bases, (avoir une température d'hybridation (Tm) ≥ 78°C), posséder la mutation ± au milieu de l'amorce, être composées d'au moins 40 % de Guanine-Cytosine (GC) et enfin, elles doivent se terminer par un G ou un C. La réaction de mutation dirigée est réalisée avec un mix contenant 50 ng de plasmide (matrice), 125 ng d'amorce sens, 125 ng d'amorce anti-sens, 2,5 mM de DNTPs, 5 µl de tampon iProof (BioRad), 2 U (soit 1 µl) d'enzyme iProof (BioRad) et ce mix est ajusté à 50 µl avec de l'eau. Le programme PCR utilisé est le suivant : 30 sec à 95°C ; 5 cycles de 30 sec à 95°C, 1 min à Tm-5°C et 30 sec/kb 72°C ; 10 cycles de 30 sec à 95°C, 1 min à Tm et 30 sec/kb 72°C ; 5 min à 72°C puis à 25°C. Une fois la PCR terminée, il faut éliminer le plasmide (la matrice) d'origine qui ne porte pas la mutation. Pour ce faire, le plasmide est digéré avec 1 µl d'enzyme de restriction DpnI (reconnaissant spécifiquement l'ADN parental méthylé) pour éliminer le plasmide parental pendant 1h30 à 37°C. Après cette dernière étape, des bactéries thermo-compétentes sont transformées avec le plasmide muté comme dans le §II.2.3, le criblage des colonies transformées est fait comme au §II.2.4 et enfin le plasmide est purifié puis envoyé au séquençage (§II.2.5) pour valider la présence de la mutation.

II.3 Transformation des plantes et obtention de lignées transgéniques

Les plasmides binaires pEarley Gate 101-CPK13, pEarley Gate 102-KAT2, pGWB-523-CPK13 et pGWB533-CPK13 sont utilisés pour réaliser des transformations transitoires ou stables.

II.3.1 Transformation transitoire chez Arabidopsis thaliana

(i) Préparation de protoplastes

Les protoplastes sont préparés à partir de plantes d'Arabidopsis thaliana âgées de 4 à 5 semaines. Les feuilles sont récoltées et les nervures principales de ces dernières sont éliminées. Les feuilles sont découpées en petits morceaux à l'aide d'un scalpel puis ces morceaux sont incubés 3 h à l'obscurité, sous agitation (50 rpm) dans 10 ml d'une solution de digestion (mannitol 0,4 M, KCl 20 mM, MES-KOH 20 mM, pH 5.7) supplémentée avec 0,15 g de Cellulase Onozuka R-10 et 0,04 g de Pectolyase Y-23. Après cette incubation, la solution est passée à travers un filtre de 75 µm. Le filtrat est récupéré au fur et à mesure et avec précaution dans un tube de 50 ml. Ce filtrat est ensuite lavé à l'aide de 40 à 50 ml de solution de digestion sans enzyme puis centrifugé 5 min à 100 g à 18°C. Le surnageant contenant majoritairement les chloroplastes est éliminé, et le culot contenant les protoplastes du mésophile est rincé 3 fois avec une solution W5 (NaCl 154 mM, $CaCl_2$ 125 mM, KCl 5 mM, MES-KOH 2 mM, pH 5,7). La solution de protoplastes est incubée 1 h

à température ambiante dans la solution W5 jusqu'à la formation d'un culot. Les protoplastes sont ensuite purifiés à l'aide d'un gradient de sucrose : 10 ml de solution de gradient (saccharose 0,6 M, MES-KOH 10 mM, pH 5,5) sont déposés délicatement sous le culot puis 5 ml de solution W5 sont déposés doucement à la surface du tube. Ce gradient discontinu est incubé 30 min à température ambiante afin que les déchets tombent au fond du tube. Après l'incubation, la couche intermédiaire (verte, à l'interface entre les deux solutions) est récupérée puisqu'elle contient les protoplastes intactes. Ces derniers sont rincés avec 10 ml de solution W5 suivi d'une centrifugation de 5 min à 1000 rpm sont réalisés. Cette étape est reconduite 3 fois puis le culot est finalement re-suspendu à 4°C dans 5 ml de MMg (mannitol 0,4 M, $MgCl_2$ 15 mM et MES-KOH 4 mM, pH 5,7).

(ii) Transformation de protoplastes

Une fois la préparation de protoplastes terminée, ces derniers sont comptés à l'aide d'une cellule de Malassez.

Pour une transformation, 200 µl de solution de protoplastes (environ 400000 protoplastes) sont déposés délicatement dans un tube de 2 ml à l'aide d'un cône coupé, et sont mélangés avec 10 à 15 µg de plasmide (pEarley Gate 101-CPK13 et pEarley Gate 102-KAT2). La solution de PEG (40 % PEG 4000, mannitol 0,2 M, $CaCl_2$ 100 mM) est ajoutée ensuite dans le tube à hauteur de 220 µl. Le tube est incubé 15 min à température ambiante. Après cette incubation, les protoplastes sont lavés, le tube est alors centrifugé 1 min à 1000 rpm, puis le culot est lavé deux fois avec 600 µl de W5. Les protoplastes sont transférés dans une plaque 12 puits et cette dernière est placée 12 à 48 h à l'obscurité à température ambiante avant toute observation.

(iii) Transformation transitoire chez Nicotiana benthamiana

Les plantes de tabac sont agro-infiltrées à l'aide d'une solution d'Agrobacterium (DO600 = 0,5 dans un tampon Mes 10 mM, pH 5,8) portant le plasmide d'intérêt (pEarley Gate 101-CPK13 et pEarley Gate 102-KAT2). Les agrobactéries sont injectées directement dans les feuilles de la plante à l'aide d'une seringue. Les tabacs sont placés à température ambiante pendant deux jours avant toute observation.

III.3.2 Transformation stable chez Arabidopsis thaliana

(i) Transformation des Agrobactéries par electroporation

La transformation des agrobactéries électro-compétentes est réalisée par electroporation et ceci en présence 100 ng de plasmide et 100 µl de bactéries électro-compétentes (Agrobacterium tumefaciens GV3101::pMP90). Après le choc, 800 µl de milieu SOC (Super Optimal both with

Catabolit repression) (2 % Tryptone, 0,5 % extrait de levure, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM, glucose 20 mM, ajustement du pH à 7 avec NaOH) sont ajoutés au mix réactionnel et les bactéries sont placées durant 45 min à 30°C sous agitation (200 rpm). Après cette incubation, 100 µl de cette solution bactérienne sont étalés sur boîtes de gélose LB (Lysogeny Broth) (10 $g.l^{-1}$ bacto tryptone, 5 $g.l^{-1}$ extrait de levure, 5 $g.l^{-1}$ NaCl, ajustement du pH à 7 avec NaOH) supplémentée d'antibiotiques adéquats (voir figure II.2) puis les boîtes sont mises à 37°C

(ii) Préparation des solutions d'agrobactéries

Une pré-culture dans 25 ml de LB supplémenté d'antibiotiques (Spectinomycine, gentamycine et Rifampicine à 100 $\mu g.ml^{-1}$ à pour pGWB533/523/524) est démarrée à partir du stock glycérol des agrobactéries ou directement d'une colonie isolée sur gélose. La pré-culture est incubée 24 h à 30°C.

Après ces 24 h d'incubation, une culture de 250 ml de LB enrichis avec des antibiotiques (Spectinomycine et Rifampicine à 50 $\mu g.ml^{-1}$ ou Gentamycine à 25 $\mu g.ml^{-1}$), est lancée à partir de 1 ml de pré-culture et incubée à 30°C. Lorsque que la DO de la culture est comprise entre 0,7 et 0,8, la solution bactérienne est centrifugée à 5000 rpm à 4°C pendant 5 min dans un pot Nalgène préalablement stérilisé. Le surnageant est éliminé tandis que le culot bactérien est repris dans un volume défini de solution de trempage (5 % sucrose, 0,02 % silwett L77) pour obtenir une DO finale de 0,8.

(iii) Transformation des fleurs

La solution d'agrobactéries est transférée à la serre où se trouvent les plantes A. thaliana de 4 à 5 semaines possédant des hampes florales et des jeunes fleurs. Les agrobactéries sont déposées dans une barquette en aluminium, les hampes et les fleurs sont trempées par immersion dans cette dernière durant 60 sec. Les plantes sont alors disposées dans une atmosphère très humide pendant 24 heures. Lorsque les siliques de ces plantes sont formées et sèches, les graines sont récoltées (génération F0).

(iv) Sélection des lignées homozygotes

Les graines de la F0 sont semées sur une boîte de gélose MS/2 supplémentée d'antibiotique approprié. Pour les lignées pGWB523-CPK13, l'hygromycine est utilisé à 30 $\mu g.ml^{-1}$. La boîte est placée 2 jours à 4°C à l'obscurité, puis en chambre de culture comme décrit dans le §II.1.1. Les plantules qui ont intégré le plasmide sont résistantes à l'antibiotique, et poussent sans problème sur

la gélose. Une plantule résistante possède des cotylédons verts et des racines bien développées. Ces dernières sont alors transférées sur terreau et sont mises en culture à la serre jusqu'à la récolte des graines de la F1. Ces premiers transformants F1 sont en général hétérozygotes. La sélection sur antibiotique sur la génération F2 a permis d'isoler des lignées homozygotes (100 % résistant à l'antibiotique)

II.4 Production de protéines recombinantes

II.4.1 Construction des souches productrices

Les vecteurs utilisés pour la production de protéines recombinantes sont des vecteurs Gateway pDEST15 (tag-GST) ou/et pDEST17 (tag-His). Nous avons principalement utilisé les vecteurs pDEST15 pour réaliser une purification sur billes de Glutathione (Glutathione Sepharose^{TM} 4B, GE Healthcare).

Les gènes codant pour les CPKs ont été intégrés au plasmide pDEST15 par recombinaison (technique Gateway LR) comme expliqué dans les §II.2.2 à §II.2.6. Les plasmides ont également été séquencés pour valider le clone. Enfin les plasmides pDEST15-CPKs sont introduits par choc-thermique dans les bactéries Escherichia coli « Rosetta, Novagen ». Ces dernières ont été spécifiquement utilisées pour la production de protéines. Pour cela elles ont été transformées par choc thermique comme décris au §II.2.3 avec les plasmides pDEST15-CPK. La souche Rosetta possède un plasmide endogène pRARE appelé « épisome ». Ce dernier porte un gène de résistance au chloramphénicol mais surtout possède un gène codant pour des codons rares. La sélection des colonies transformées est donc réalisée sur milieu LB contenant de l'ampicilline pour le plasmide pDEST15 et du chloramphénicol pour l'épisome (50 $\mu g.ml^{-1}$). Les colonies sont criblées par PCR comme au §II.2..4 puis les stocks glycérol des différentes souches sont réalisés.

II.4.2 Production de la protéine

Une pré-culture dans 25 ml de LB supplémentés d'antibiotiques (ampicilline + chloramphénicol) est démarrée à partir du stock glycérol des Rosetta ou, directement, d'une colonie isolée sur gélose. La pré-culture est incubée 12 h à 37°C. Après ces 12 h d'incubation, une culture dans 250 ml de LB supplémentés avec de l'ampicilline et du chloramphénicol, est démarrée à partir de 2,5 ml de pré-culture et est incubée à 37°C. La densité bactérienne à 660nm est mesurée toutes les 30 min pour surveiller la croissance des bactéries et pour ne pas dépasser la DO de 0,7-0,8 adéquate pour lancer la production de la protéine. La DO de 0.7-0.8 souhaitée est atteinte après plusieurs heures de culture, entre 2 h et 5 h selon les cultures. La production des CPKs recombinantes est induite par

l'ajout de 1 mM d'IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) dans la culture de 250 ml, qui est ensuite incubée 12 h à 18°C.

II.4.3 Purification de la protéine

Après l'incubation de 12 h à 18°C, la culture de 250 ml est centrifugée à 7500 rpm à 4°C pendant 10 min dans un pot Nalgène. Le surnageant est éliminé, tandis que le culot bactérien est remis en suspension dans 8 ml de PBS (Phosphate-Buffered Saline) (NaCl 80 $g.l^{-1}$, KCl 2 $g.l^{-1}$, Na_2HPO_4 14,4 $g.l^{-1}$, KH_2PO_4 2,4 $g.l^{-1}$, ajustement du pH à 7,4 avec HCl) avec 0,05 $g.l^{-1}$ de Lysozyme (Lysozym, Roth) et ½ tablette d'inhibiteur de protéase (EDTA-free protease inhibitor, Roche). Les 8 ml de solution sont vortexés à 4°C jusqu'à dissolution complète du culot bactérien. Les bactéries sont ensuite lysées par sonication 2 fois 15 s puis 1 fois 30 s. Enfin, la solution de 8 ml est centrifugée 10 min à 12000 g à 4°C.

Des billes de Glutathione Sepharose^{TM} 4B (GE Healthcare) (250 µl de billes pour 250 ml initiale de culture bactérienne) sont mises dans un tube de 15 ml et lavées 3 fois avec 2 ml de PBS puis centrifugées 10 min à 2300 rpm afin d'éliminer toute trace d'éthanol. Après le dernier lavage, le surnageant est éliminé et le tube contenant le culot de billes est mis à 4°C. Le surnageant contenant les protéines totales notées PT (protéines bactériennes + protéine recombinante) est déposé ensuite dans le tube de 15 ml où se trouvent les 250 µl de billes. Le tube est mis sous faible agitation (20 rpm) à 4°C pendant 2h30. Cette incubation permet l'adsorption des protéines couplées à la GST sur les billes de Glutathione. Après cela, le tube de 15 ml est centrifugé 10 min à 2300 rpm à 4°C. Le surnageant est éliminé puis les billes sont lavées plusieurs fois avec 10 ml de PBS puis centrifugé 10 min à 2300 rpm à 4°C. Après chaque lavage, 200 µl de surnageant ont été prélevés puis déposés sur un gel SDS-PAGE afin de vérifier extemporanément que les billes sont correctement lavées. En pratique, trois lavages suffisent avant de commencer l'élution des protéines recombinantes.

Cette élution se fait en ajoutant 200 µl de tampon d'élution (10 mM reduced Glutathione, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 et ½ tablette d'inhibiteur de protéase) aux billes, puis les tubes sont mis sous agitation à 20 rpm pendant 15 min à température ambiante. Après cette agitation, le tube est centrifugé 10 min à 2300 rpm. Le surnageant contenant les protéines recombinantes éluées, est récupéré dans un tube de 1,5 ml et est stocké à 4°C. L'élution est reconduite 3 fois (reprise du culot dans du tampon d'élution) afin d'optimiser le processus.

II.4.4 Dosage des protéines recombinantes

Les protéines recombinantes sont dosées en utilisant un kit Pierce (660 nm protein assay, Thermo scientific) qui contient une gamme étalon de BSA (125, 250, 500, 750, 1000, 1500 et 2000 $\mu g.ml^{-1}$) et un réactif permettant de doser les protéines totales. La réaction se fait en mélangeant 10 µl d'échantillon (ou de solution de la gamme BSA) à 150 µl de réactif de dosage. L'absorbance est mesurée à 660 nm après 5 min d'incubation à température ambiante. L'absorbance obtenue pour les échantillons est reportée sur la droite étalon préalablement tracée à l'aide de la gamme BSA. La concentration de chaque échantillon est ainsi déterminée en $\mu g.ml^{-1}$. Les protéines sont conservées à -20°C dans 20 % de glycérol.

II.4.5 Vérification de la qualité des protéines produites

(i) Gel SDS-Page

Pour contrôler la qualité de la protéine produite, il faut réaliser un gel SDS-PAGE 10% acrylamide/Bis- acrylamide. La migration est réalisée dans une cuve de migration (Biorad). La cuve est remplie de tampon de migration (Tris 25 mM –Glycine 192 mM, SDS 10 % Thermo Scientific). Les échantillons sont préparés en mélangeant 10 µg de protéines et du tampon Laemmly (4×). Les échantillons et le marqueur de taille (SM1811, Fermentas) sont ensuite dénaturés 5min à 95°C avant d'être déposés dans les puits. La migration est lancée à 90V pendant 1h30. A la fin de la migration, le gel est dissocié des plaques de verre et peut être coloré pendant 1 h avec du colorant protéique (Simply Blue, Thermo Scientific) puis le gel est rincé avec de l'eau.

(ii) Western Blot

Afin de s'assurer que les protéines produites soient les protéines d'intérêts, un western-blot est réalisé. Un gel SDS-PAGE de 10% acrylamide est réalisé comme décrit au §II.4.5.(i). Après migration du gel, le transfert est réalisé sur une membrane de nitrocellulose. Le transfert se fait dans une cuve remplie de tampon de transfert (Tris 25 mM –Glycine 192 mM -Ethanol 10 %) sous 80 V pendant 2 h ou sous 35 V pendant 16 h, dans les deux cas, la cuve de transfert est placée à 4°C et sous faible agitation en plaçant un agitateur dans la cuve. Après le transfert, le sandwich est démonté et la membrane est récupérée pour être placée dans une solution de saturation TBS + Tween 0,1% et Régilait 5 %) pendant 2 h. A la fin de la saturation, la membrane est placée dans la solution d'anticorps primaire (Anticorps anti-GST produit chez le lapin, 1/750, Invitrogen, dans TBS + Tween 0,1 % v/v et Régilait 1 %), enfin après trois rinçages de 20 min avec de la solution de saturation, la membrane est mise à incuber dans la solution d'anticorps secondaire (anticorps anti-lapin, 1/20000, GE Healthcare, dans TBS + Tween 0,1 % v/v et Régilait 1% m/v). Les 3 rinçages

se font également dans la solution de saturation. La membrane est alors mise en contact avec 5 ml de réactif de chimioluminescence (ECL plus, Thermo Scientific). Enfin un film auto-radiographique est placé dans une cassette avec la membrane. Apres révélation, les signaux imprégnés sur le film autoradiographique permet d'identifier et d'estimer la qualité des protéines recombinantes fusionnée à la GST (taille, nombres de bandes).

II.4.6 Identification des sites phosphorylables avec des Puces à peptide

(i) Test de l'activité kinase des protéines avec de l'ATP froid : kit kinase Glow®

Les activités kinases des protéines produites sont testées à l'aide du kit Kinase Glow® Luminescent kinase Assays (Promega) basé sur la quantification de l'ATP par la Luciférase. La réaction de phosphorylation in vitro se fait dans une plaque 96 puits et est réalisée en mélangeant dans chaque puits 500 ng de protéines (CPKs) recombinantes (plus H_2O qsp 10 µl), 25 µM de peptide substrat (Syntide-2), 25 µM ATP, le volume total étant ajusté à 50 µl avec du "tampon kinase" (HEPES 50 mM, $MgCl_2$ 10 mM, DTT 2 mM, EGTA 4 mM, pH 7,5, $CaCl_2$ 4,86 mM). La concentration en calcium libre est estimée avec Maxchelator (http://maxchelator.stanford.edu/CaMgATPEGTA-TS.htm). Avant (T0) ou après 15 min à température ambiante (t+15 min), la réaction est stoppée par l'ajout de 50 µl de réactif « Kinase Glo® Reagent ». La luminescence de chaque puits est mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque (Victor, Perkin Elmer Life Science). La quantité d'ATP consommée dans chaque puits correspond à l'activité kinase de la protéine qui est obtenue grâce à la différence entre la concentration d'ATP initiale à T0 et la concentration d'ATP restante (à t+15 min). Les CPKs dont l'activité a été ainsi vérifiée sont ensuite utilisées pour la phosphorylation in vitro sur les "puces à peptides" décrites ci-dessous.

(ii) Test de l'activité kinase des protéines avec de l'ATP radioactif : [ATP-γ-^{32}P]

La protéine kinase (600 ng) est incubée pendant 1 h avec un mélange de 1 mM de peptide cible (Syntide-2, Sigma), 20 µM d'ATP froid et 1,2 µCi d'ATP-γ-^{32}P, 24 µl d'une solution à 100 mM Tris/HCl (pH 8) et 12 µl de tampon ($MgCl_2$ 10 mM, DTT 2 mM, EGTA 4 mM, HEPES-NaOH 50 mM pH 7,5, 4.86 mM $CaCl_2$ (830 µM libre)), le volume total étant ajusté à 60 µl avec de l'eau. Pour la détermination du marquage radioactif (γ-^{32}P, par phosphorylation), la solution expérimentale contenant le peptide-cible est déposée sur un papier phosphocellulose (P81-sheets, Whatman GE Healthcare, Angleterre) qui retient spécifiquement les phosphoprotéines et phosphopeptides (Tebar et al., 2002). Les protéines (Syntide-2 et CPK) s'adsorbent sur le papier qui peut être rincé plusieurs fois avec une solution d'acide phosphorique (20 %, v/v) pour éliminer l'ATP-γ-^{32}P en solution. Le papier est ensuite déposé dans un tube contenant 3 ml de scintillant puis les tubes sont mélangés puis passés au compteur à scintillation pour déterminer le niveau de marquage.

II.4.7 Design des puces à peptides

L'objectif est d'identifier des protéines-cibles des CPKs recombinantes en identifiant éventuellement les résidus phosphorylés (sites de phosphorylation) dans ces protéines-cibles. Quatre protéines-cibles potentielles ont fait l'objet de cette étude par "peptide-array" : les sous-unités de canaux potassiques KAT1, KAT2, AKT2 et la phosphatase PP2CA d'Arabidopsis. Ces matrices de peptides sont fabriquées par Proteomic Solutions (http://www.proteomicsolutions.fr/) avec les contraintes techniques suivantes: sur chaque lame de verre sont fixés 384 (24×16) peptides, ces peptides doivent comporter de 15 à 18 acides aminés, au minimum 6 de ces 384 peptides sont connus pour être des "peptides-cibles" des CPKs et jouent le rôle de contrôles positifs. Dans le cas présent, le choix de ces 384 peptides a été fait de la manière suivante. Puisque les CPKs sont caractérisés comme des Sérines/Thréonines kinases, les peptides comportent au moins un résidu Sérine ou un résidu Thréonine. À part 6 peptides contrôles (potentiellement phosphorylables par les CPKs, Syntide-2, Autocamtide-2, CSP, AtDil9, TPK1a and TPK1b ; Shao and Harmon, 2003 ; Rodriguez Milla et al., 2006 ; Latz et al., 2013), les 378 autres peptides couvrent la totalité des résidus sérines et thréonines des séquences protéiques de KAT1, KAT2, AKT2 et PP2C. Pour identifier les faux et vrais signaux, chaque lame ou "puce à peptide" comporte ces 384 spots en "duplicate" (tout spot marqué d'un côté seulement de la lame sera considéré comme un faux positif). Dans le cas de plusieurs résidus sérine et/ou thréonine présents dans un même peptide, des peptides mutants sont ajoutés aux peptides sauvages. Ces peptides mutants comportent une ou plusieurs substitutions de S ou T par A. Ainsi, 198 peptides mutants (dont 66 pour KAT2) ont été fixés en plus de 180 peptides sauvages (séquence complète des 384 peptides donnée en annexe 2).

II.4.8 Phosphorylation des puces à peptide

Les puces à peptides sont disposées dans une chambre à hybridation (4-chamber NUNC) et sont incubées 1 h à 25°C dans un tampon de saturation (1 % (m/v) BSA, 0,05 % (v/v) Triton X-100, HEPES-NaOH 50 mM pH 7,4). Après la saturation, les puces à peptides sont lavées 2 fois avec 4 ml de "tampon kinase" ($MgCl_2$ 10 mM, DTT 2 mM, EGTA 4 mM, HEPES-NaOH 50 mM pH 7,5, 4.86 mM $CaCl_2$ (830 µM libre). Après les lavages, les puces sont incubées 1 h sous faible agitation avec 4 ml de tampon kinase dans lequel il y a 5 µCi d'ATP-γ-^{32}P et 5 µg de protéines recombinantes (CPKs) (Figure II.3). Les puces sont ensuite rincées 4 fois (4×5 min à température ambiante) à l'aide de tampon de lavage (NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, 0,05 % Triton X-100, HEPES-NaOH 50 mM, pH 7,4). Les puces sont alors placées dans une cassette d'auto-radiographie et les films (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare) sont révélés après une exposition de 1 h à 24 h, selon l'intensité du signal.

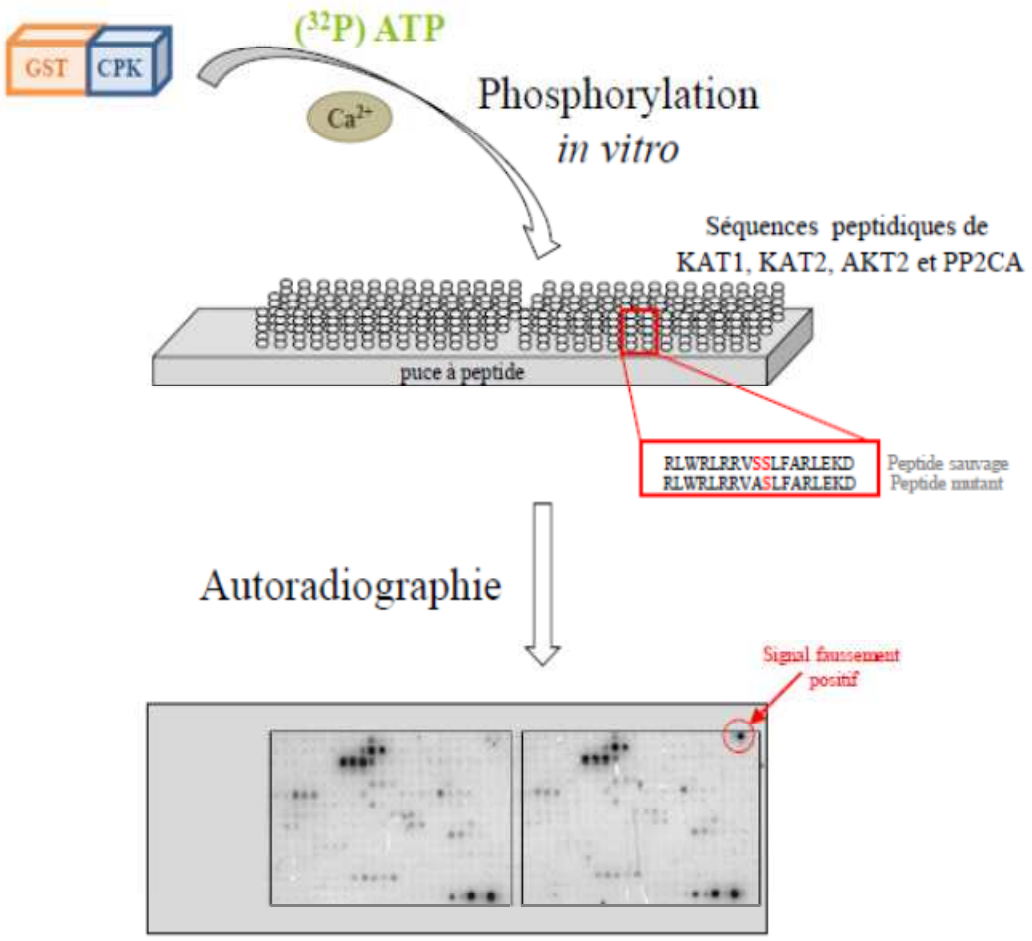


Figure II.3: Phosphorylation in vitro avec les puces à peptides (Proteomic solution).
La puce à peptides est composée de 2×384 peptides (détection de signaux faussement positifs) comprenant des peptides sauvages et des peptides mutants. Elle est incubée pendant 1h avec 5 µg de protéines recombinante, 5 µCi d'ATP-^{32}P et 830 µM de calcium libre. La puce est exposée à un film autoradiographique et la révélation de ce dernier permet de repérer les peptides phosphorylés comme montrés ci-dessus.

II.4.9 Analyse des puces à peptides

Chaque peptide phosphorylé est repéré par son impression sur le film auto-radiographique. Les signaux, représentés par des spots sur le film autoradiographique, sont analysés avec le logiciel Image J (Schneider et al., 2012). Des régions d'intérêts (ROIs) sont tracées au niveau de chaque spot, ceci permettant de faire une quantification relative du signal de phosphorylation des 384 peptides. Les différences d'intensité entre les peptides sauvages et les peptides mutés sont comparées afin d'évaluer ou d'identifier le/les résidus phosphorylables sur ces peptides. Un exemple en est donné dans la figure II.3.

II.5 Voltage-Clamp à deux éléctrodes

II.5.1 Transcription in vitro des ARNc

(i) Linéarisation

Avant de débuter une transcription in vitro, le plasmide pGEM-GWC contenant le gène d'intérêt doit être linéarisé. Pour ce faire, 10 µg de plasmide sont incubés 2 fois 2 h à 37°C avec 20 U (2 µl) d'enzyme de restriction (NheI ou Sph1), 7 µl de tampon correspondant à l'enzyme (plus H_2O qsp 70 µl de volume total). Le plasmide linéarisé est purifié à l'aide d'un kit (PCR clean up, Promega).

Un gel de Tris-acétate-EDTA (TAE) à 1% d'agarose est réalisé pour vérifier la qualité de la linéarisation. Pour le plasmide, 1 µl de digestion est mélangé avec 4 µl H_2O et 1 µl de bleu de charge (6x) et le mélange est déposé dans le gel à proximité d'un marqueur de taille (1kb+, Promega). La migration du gel se fait sous 100 V pendant 30 min.

(ii) Transcription in vitro (Kit Ambion)

Pour réaliser une transcription in vitro, un kit Mmessage T7 Ultra (Ambion) a été utilisé en suivant les instructions du fournisseur : 1 µg de plasmide linéarisé est incubé 2h30 à 37°C avec 8 µL de T7 2X NTP/ ARCA, 2 µL 10X T7 réaction buffer et 2 µL d'enzyme T7. La réaction de transcription in vitro est stoppée à l'aide de 50 µl de "solution de précipitation au LiCl" (kit Ambion). Le tube est placé au minimum 20 min à -20°C. Le tube est ensuite centrifugé 15 min à 15000 rpm à 4°C afin de culoter l'ARNc. Le culot est lavé avec 1 ml d'éthanol 70% puis le tube est de nouveau centrifugé 15 min à 15000 rpm à 4°C. L'éthanol est éliminé délicatement pour ne pas perdre le culot d'ARNc. Ce dernier est repris dans 22 µl d'eau (RNAse free). Les 22 µl sont aliquotés en 5×4 µl, les 2 µl restant permettent de réaliser un dernier gel (gel agarose 1% acrylamide/bis-acrylamide) de contrôle de la qualité de l'ARNc et un dosage au Nanodrop (Spectrophotomètre, Thermo Scientific) de la concentration de l'ARNc obtenu.

(iii) Obtention des ovocytes de Xénopes et injection des ARNc

Les ovocytes nécessaires pour les mesures d'électrophysiologie sont fournis par le CRBM (CNRS Montpellier).

Les lobes ovariens sont divisés, à l'aide de pinces, en petites grappes d'ovocytes qui sont ensuite plongées pendant 1 h sous agitation dans une solution d'OR2 (NaCl 82,5 mM, KCl 2 mM, $MgCl_2$ 1 mM, Hepes-NaOH 5 mM, pH 7,4) contenant 2 $mg.ml^{-1}$ de collagénase (Type IA, Sigma) dans le but d'éliminer l'épithélium ovarien et le tissu folliculaire. Après cette incubation, les

ovocytes individualisés sont lavés 3 fois avec une solution "ND96" (NaCl 96 mM, KCl 2 mM, $MgCl_2$ 1 mM, $CaCl_2$ 1,8 mM, Na-pyruvate 2,5 mM, Hepes-NaOH 5 mM, pH 7,4) supplémentée de 50 µg.ml^{-1} de gentamycine (Sigma) pour limiter la contamination par les bactéries ou champignons. Après les lavages, les ovocytes aux stades V et VI (Dumont, 1972) correspondant à un pôle animal bien différentié du pôle végétatif et à un diamètre de 1 à 2 mm, sont triés et sélectionnés puis sont placés à 19°C.

Le lendemain, les ARNc sont injectés dans les ovocytes (≈ 20 ng d'ARNc par ovocyte) à l'aide d'une micropipette préalablement étirée puis cassée à un diamètre de pointe de quelques µm et montée sur un micromanipulateur mécanique (Narishige, Japon). L'injection se fait sous une loupe binoculaire (Olympus, Japon). Les ovocytes correctement injectés sont placés dans une solution de ND96 pendant 48 h afin que la traduction de l'ARNc à la protéine se fasse.

II.5.2 Enregistrement des courants ioniques sur les ovocytes ("voltage-clamp" à deux microélectrodes intracellulaires ou TEVC)

La conductance potassique des ovocytes est étudiée après 48 h d'incubation sur un poste d'enregistrement spécialement conçu pour le TEVC sur ovocyte (Figure II.4).

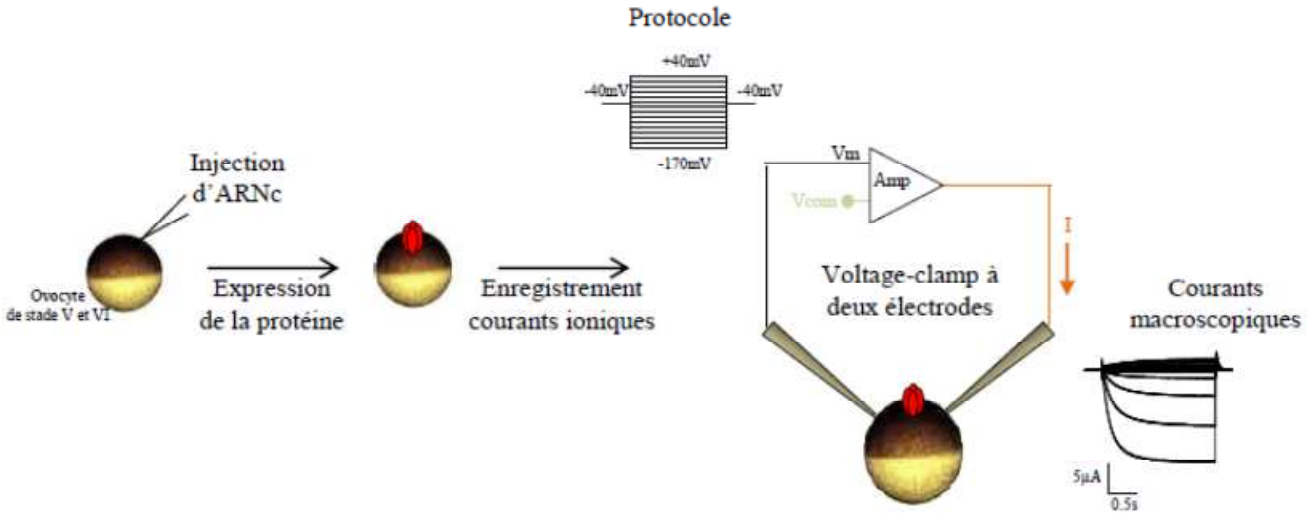


Figure II.4: Principe du voltage clamp à deux éléctrodes (TEVC) sur des ovocytes de xénopes.
Les ovocytes de stade V et VI sont injectés avec l'ARNc d'interêt. L'activité des canaux ioniques exprimés à la membrane des ovocytes après 48h d'incubation, sont enregistrés en voltage-clamp. Une première électrode intracellulaire mesure le potentiel de membrane, une seconde électrode intracellulaire injecte le courant. Ce courant est injecté par l'amplificateur de manière à amener le potentiel de membrane aux valeurs désirées (voir protocole) (principe du voltage-clamp). Le courant injecté et le potentiel de membrane sont enregistrés par une interface sur le disque dure d'un ordinateur.

Un ovocyte est placé dans une cuve à travers laquelle circule une solution "K10Na90" (KCl 10 mM, NaCl 90 mM, $MgCl_2$ 1 mM, $CaCl_2$ 1 mM, HEPES-NaOH pH 7,5). L'ovocyte est visualisé à l'aide d'une loupe binoculaire placée au-dessus de la cuve et est éclairé à l'aide d'une fibre optique.

Les électrodes de références connectées au dispositif de "virtual ground" de l'amplificateur (GeneClamp 500, Axon Instruments, USA) sont constituées d'un pont gélosé de KCl 3 M puis sont remplies d'une solution de KCl 3 M et enfin sont placées dans la cuve en aval de l'emplacement de l'ovocyte. Les microélectrodes intracellulaires ont été préalablement étirées à partir de capillaires de verre (ref : GC150TF-7.5, Clark Medical Instruments, Royaume-Uni). Ces microélectrodes sont remplies avec une solution de KCl 3 M. Les microélectrodes sont implantées dans l'ovocyte à l'aide de micromanipulateurs mécaniques à commande manuelle (Narishige, Japon). Au préalable, il est vérifié que la résistance électrique de ces microélectrodes dans le bain ND96 est comprise entre 0,5 et 2,5 MOhms dans une solution de K10Na90. Cette installation est placée sur une table anti-vibration et à l'intérieur d'une cage de Faraday pour limiter les bruits d'origine mécanique (vibrations) et électromagnétiques.

L'installation est reliée à un micro-ordinateur (type PC sous Windows) qui exécute le programme pClamp9 (Axon Instruments, USA). Ce logiciel dédié, à travers une interface Digidata 1320 (Axon Instruments, USA), pilote l'électromètre et échantillonne les signaux qui sont stockés sur un disque dur.

Le protocole de TEVC le plus souvent utilisé dans pClamp9 pour ce travail de thèse est le suivant : épisodes de voltage-clamp de 3 s à des potentiels imposés allant de +40 and -145 mV avec des décréments de -15 mV; enregistrement du courant de base au potentiel dit de "holding" à -40 mV avant chaque épisode et enregistrement des courants de queue (désactivation) généralement à ce même potentiel de holding (dans le cas contraire, le potentiel d'enregistrement des courants de queue est indiqué dans la légende de la figure).

II.6 FLIM (Fluorescence lifetime imaging microscopy)

II.6.1 Vecteur et souche bactérienne

Les vecteurs utilisés sont des vecteurs Gateway pEarleyGate dans lesquels, les gènes CPK13 et KAT2 ont été clonés par la technique Gateway LR (Cf. §II.2..2 et §II.2..6). CPK13 a été cloné dans le plasmide pEarleyGate 101 permettant la production de la protéine de fusion CPK13-YFP. KAT2 est quant à lui cloné dans pEarleyGate 102 résultant la protéine fusion KAT2-CFP. Ces plasmides ont été intégrés dans une souche d'Agrobactérieum tumefaciens GV3101::pMP90 par électroporation (voir §II.3.3(i))

II.6.2 Transformation de feuilles de tabac et observation au confocal

Une solution bactérienne d'Agrobacterium tumefaciens est cultivée jusqu'à obtenir une DO de 0,5 à 600 nm dans un tampon spécifique ($MgCl_2$ 10 mM, and acetosyringone 200 µM, MES-KOH

10 mM pH 5,8). Des feuilles de tabac (Nicotiana benthamania) âgées de 4 à 5 semaines sont transformées par agro-infiltration avec ces solutions bactériennes possédant soit p101-CPK13-YFP seul, soit p102-KAT2-CFP seul ou bien les deux à la fois. L'expression des protéines fusions CPK13-YFP et KAT2-CFP et leur localisation sont regardées deux jours après l'agro-infiltration. Les images sont prises à l'aide d'un microscope confocal (LSM SP2 AOBS, Leica Microsystem, Allemagne) avec un objectif 40x et un laser Argon est utilisé pour exciter les fluorochromes CFP et YFP respectivement à 458 et 514 nm. Les émissions sont regardées respectivement, entre 470-500 nm et 535-590 nm pour la CFP et l'YFP.

II.6.3 Interaction protéine-protéine par la méthode de FRET-FLIM

Le FLIM est réalisé à l'aide d'un système de "Streak-FLIM" (Streakscope C4334, Hamamatsu Photonics, Japon) couplé à une camera CCD hautement sensible (model C8800-53C, Hamamatsu). Une diode électroluminescente de puissance à 439 nm émet un faisceau laser pulsé à 2 MHz (Hamamatsu) qui constitue la source de lumière pour l'excitation des sondes. Toutes les images sont acquises avec un objectif 60x à immersion à huile (Plan Apo 1.4 NA, IR, Nikon, Japon) monté sur un microscope inversé (Eclipse TE2000E, Nikon, Japon). Ce microscope est couplé à un système FLIM avec un filtre pour la CFP. Les images de décroissance de la fluorescence de la CFP ont ensuite été analysées avec un logiciel élaboré à Toulouse par Christian Brière, permettant de déterminer (τ) le temps de vie de fluorescence par l'ajustement aux courbes de décroissance de la CFP d'un modèle de décroissance bi-exponentielle (algorithme des moindres carrés non linéaire de Levenberg-Marquardt). Pour chaque condition, au moins 30 mesures ont été effectuées.

II.7 Analyse de l'expression in planta des lignées GUS

II.7.1 Vecteur et transformation stable par Agrobacterium tumefaciens

Les vecteurs utilisés sont des vecteurs Gateway pGWB-533 dans lesquels, les gènes des CPKs ont été clonés par la technique Gateway LR (Cf. §II.2.2 et §II.2.6). La sélection des plasmides puis des Agrobactéries transformées avec ces derniers a été réalisée comme décrit en §II.2.3-2.6. Les lignées GUS ont été réalisées par transformation stable d'Arabidopsis thaliana comme en §II.3.(iii).

II.7.2 Coloration GUS

La coloration GUS se fait sur des plantes âgées de 3 à 4 semaines. Les plantes sont placées dans une solution de fixation ($NaPO_4$ 50 mM, ferricyanide 0,5 mM, ferrocyanide 0,5 mM, 0,05 % Triton

X100, X-Gluc 1 mM, pH7), les plantes immergées sont mises sous vide pendant 15 min puis sont incubées toute une nuit à 37°C sous faible agitation. Le lendemain, la solution de fixation est éliminée puis des lavages successifs avec des solutions de 50, 70, 90 et 100 % d'éthanol jusqu'à une décoloration complète de la chlorophylle. Les observations se font avec une loupe binoculaire équipée d'une caméra couleur (Olympus soft imaging system, Japon).

II.8 Phénotypage (des lignées sur-exprimantes CPK13)

II.8.1 Vecteur et obtention des plantes sur-exprimant CPK13

Les vecteurs utilisés sont les vecteurs Gateway pGWB-523/524 dans lesquels, les gènes des CPKs ont été clonés par la technique Gateway LR (Cf. §II.2.2 et §II.2.6). La sélection des plasmides puis des agrobactéries transformées avec ces derniers a été réalisée comme décrit au §II.2.3-2.6. Les lignées ox-CPK13 ont été réalisées par transformation stable d'Arabidopsis thaliana comme décrit au §II.3.(iii).

II.8.2 Mesure d'ouverture stomatique

Les mesures stomatiques ont été réalisées avec une lignée sauvage Col-0 et deux lignées différentes sur-exprimant la CPK13.

Des épidermes pelés sont obtenus comme décrit ci-dessous à partir de feuilles de plantes âgées de 4 semaines (Hosy et al., 2003). Les feuilles dont la nervure principale a été ôtée par dissection sont déposées leur face abaxiale sur une lamelle préalablement recouverte d'une colle silicone non toxique (de marque Telesis) permettant les mouvements stomatiques. Les tissus supérieurs des feuilles sont éliminés délicatement par grattage à l'aide d'une lame de microscope en ne laissant subsister, collé sur la lamelle, que l'épiderme abaxial le plus intact possible. Les lamelles sont immergées dans un tampon (KCl 30 mM, MES-KOH 10 mM, pH 6) et sont placées, dans un premier temps, à l'obscurité (T0), puis sont exposées à la lumière blanche (300 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$). Les ouvertures stomatiques sont mesurées toutes les heures (2x50 stomates par épiderme pelé) pendant 180 minutes avec un microscope optique en utilisant un objectif 60× (Optiphot, Nikon). Le microscope est relié à une table digitale (Houston Instrument, USA), permettant de superposer une mire et l'image visualisées dans le microscope.

Classiquement, une moyenne de l'ouverture stomatique est calculée à partir de 2×50 stomates par génotype. Un tri des données est réalisé pour chaque série de mesures. En effet, un histogramme est réalisé à partir des 2x50 mesures obtenues pour un point donné. A partir de cet histogramme, une distribution gaussienne est faite et une valeur de pic est obtenue. Par la suite, toutes les valeurs se

trouvant à plus de 1,5 fois la valeur de l'écart type, en dessous ou en dessus, par rapport à ce pic, sont éliminés et une nouvelle moyenne ± écart-type est re-calculée sur la population de valeurs restantes. Cette procédure a été utilisée pour écarter de manière objective des valeurs aberrantes (erreurs de mesure, ou stomate endommagé…).

II.8.3 Mesure de la conductance stomatique à l'aide d'un poromètre

Les conductances stomatiques sont mesurées sur des plantes âgées de 4 à 5 semaines. Les conductances sont enregistrées à l'aide d'un poromètre (AP4, Delta-T Devices). Cet appareil est capable de mesurer la conductance, la résistance, l'hygrométrie relative et la température. Il est composé d'un boitier et d'une pince au bout de laquelle se trouve deux cuvettes de mesure : une oblongue (2,5×17,5mm) et une circulaire (6mm) (Figure II.5). La conductance est mesurée à travers l'une des deux cuvettes sectionnée en amont. Avant une série de mesures, le poromètre est calibré avec une plaque d'étalonnage comprenant 6 positions (mimant 6 diamètres d'ouverture stomatique de tailles croissantes correspondant aux conductances stomatiques suivantes : 15 ; 25 ; 55 ; 132 ; 257 ; 513 mmol.m^{-2}.s^{-1}). Par la suite, une jeune feuille est sélectionnée et est pincée à travers la cuvette de mesure. La conductance doit se stabiliser avant d'être enregistrée. Les valeurs sont récoltées et sont analysées à l'aide du logiciel Excel (Suite Microsoft office).

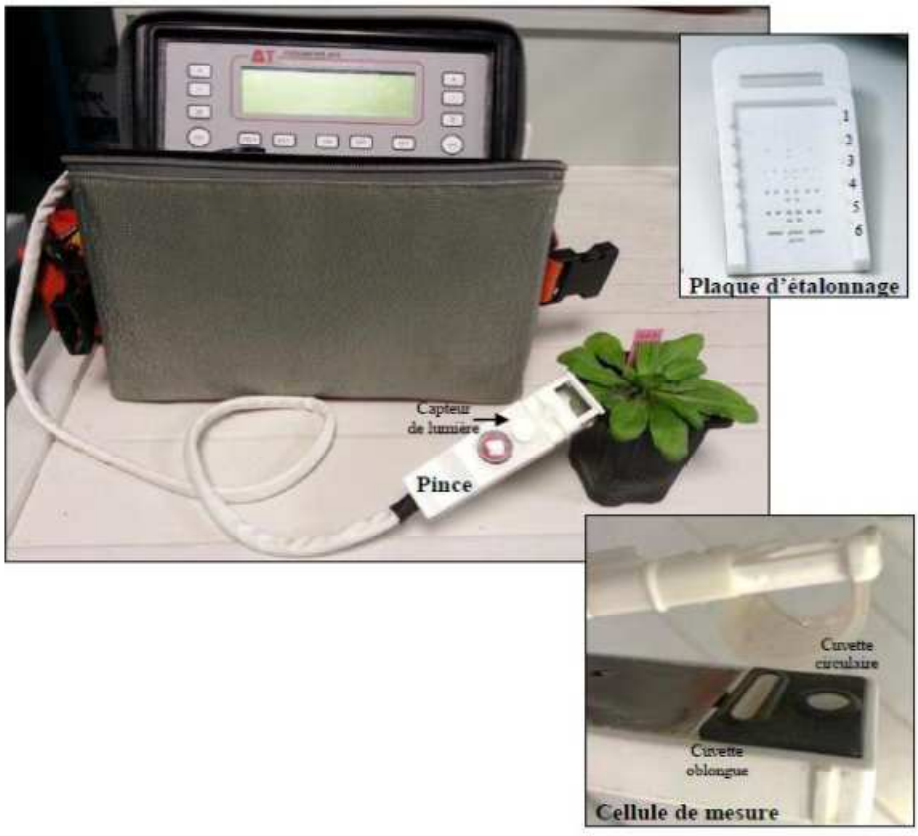


Figure II.5: Mesure de la conductance stomatique à l'aide d'un poromètre.
Le poromètre est un appareil de mesure portatif permettant de mesurer la conductance stomatique d'une feuille exprimée en mmol.m^{-2}.s^{-1}. Il est composé d'un boîtier avec un écran, d'une pince au bout de laquelle se trouve une cellule de mesure qui peut être oblongue ou circulaire. La conductance stomatique est mesurée à travers cette cellule.

II.9 Imagerie in planta

II.9.1 Enregistrement de signaux calciques in planta

Les variations calciques sont enregistrées sur des plantes de 4 à 5 semaines appartenant à la lignée transgénique G5A. Les plantes ont été cultivées sur terreau jusque-là, il est donc nécessaire, pour appliquer une solution liquide aux racines, de retirer délicatement le terreau. Les plantes sont incubées toute une nuit à l'obscurité dans une solution supplémentée du cofacteur : la coelenterazine (2,5 µM concentration finale). Le lendemain, les plantes sont mises sur un support (relié à une seringue) contenant un réservoir de 36 ml d'eau dans lequel baignent les racines (Figure II.6A). Les montages sont alors placés dans une boîte noire dans laquelle seront effectuées les mesures de bioluminescence. Différentes solutions de NaCl sont alors injectées pour appliquer un stress salin au niveau des racines uniquement des plantes à travers la seringue (Figure II.6A). Des images sont alors prises avec une caméra CCD (Hamamatsu C4880-30, Japon) montée sur la boîte noire. La caméra est pilotée par le logiciel Hipic. Les temps d'exposition sont variables en fonction de l'intensité du signal bioluminescent et sont en moyenne de 30 secondes d'exposition par image. Les images sont analysées avec le logiciel Image J.

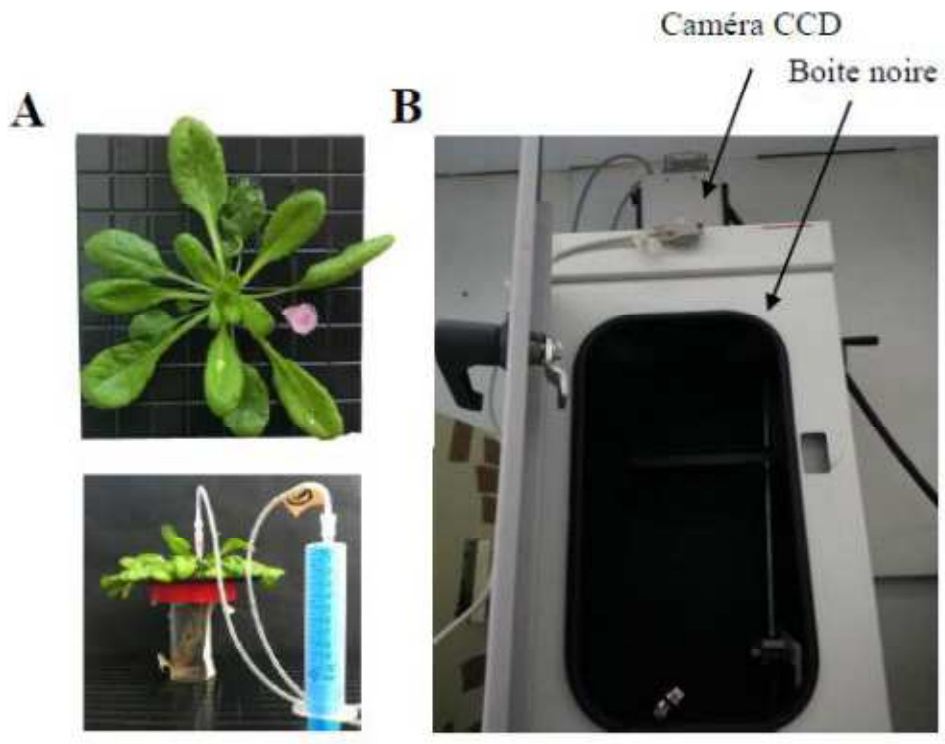


Figure II.6: Dispositif expérimental pour réaliser de l'imagerie sur plante entière.
A. Les plantes sont disposées sur un réservoir contenant 36 ml d'eau et une seringue est reliée à ce dernier par l'intermédiaire du bouchon (socle rouge). Cette seringue permet d'injecter une solution liquide (par exemple une solution saline) pour appliquer un stress directement aux racines. B. Le montage est placé dans une chambre noire à laquelle est reliée une caméra CCD. Cette dernière est pilotée par un logiciel depuis un ordinateur.

II.9.2 Mesure de l'activité du promoteur d'un gène à l'aide du gène rapporteur luciférase

Les plantes pCPKs-LUC utilisées pour les mesures d'expression de la luciférase sont âgées de 4 à 5 semaines. Les plantes sont préparées comme au §II.9.1. Les plantes sont incubées pendant plusieurs heures (au minimum 3 h) avec le cofacteur de la luciférase (luciférine à 1 mM, concentration finale). Les plantes sont alors placées dans la boîte noire et des clichées sont pris à l'aide de la caméra CCD comme au §II.9.1.

III. Travaux préparatoires, mise en place de nouveaux outils, choix de cibles moléculaires pour l'étude

La régulation post-traductionnelle des canaux Shakers a fait l'objet de plusieurs publications montrant que certains senseurs de calcium tels que les CBL/CIPK et les CPKs peuvent être des régulateurs de l'activité de ces canaux potassiques Shaker (Cf. Etude bibliographique §I.2.2(ii)).

Afin d'apporter de nouvelles connaissances sur la régulation des canaux Shaker, nous avons étudié, durant ma thèse, la régulation post-traductionnelle de ces canaux exprimés dans les stomates ou le phloème (GORK ; KAT1 ; KAT2 et AKT2) par des CPKs exprimées dans ces mêmes tissus (CPK3 ; 4 ; 6 ; 7 ; 11 ; 13 et 33).

A partir des résultats d'un criblage fonctionnel systématique (Cf. §III.1), des cibles moléculaires ont été choisies pour la suite de mon travail de thèse, pour réaliser une étude plus approfondie des cinq CPKs suivantes : CPK3, CPK4, CPK6, CPK13 et CPK33. Les clonages de ces CPKs et la génération de plusieurs formes mutantes de ces kinases ont été achevés (Cf. §III.2), toutes ces protéines ont été produites (Cf. §III.3) et leur activité kinase a été testée (Cf. §III.4). Des cibles potentielles de phosphorylation de ces CPKs ont été trouvées (Cf. §III.5). Enfin, l'activité des promoteurs des CPKs a été mesurée in planta chez des lignées transgéniques d'Arabidopsis thaliana exprimant le gène GUS sous contrôle du promoteur des CPKs (Cf. §III.6). Des études plus approfondies sur deux couples (CPK13/KAT2 et CPK6/KAT2) ont été réalisées dans la plante et sont décrites dans les parties IV et V, respectivement. Une nouvelle sonde calcique, permettant l'imagerie sur plante entière des événements calciques, a été développée dans l'équipe pour déterminer les conditions dans lesquelles les protéines CPKs peuvent s'activer et modifier les flux de potassium via les canaux Shaker (Cf. §III.7).

III.1 Criblage fonctionnel de CPKs capables de modifier l'activité de canaux Shaker

L'effet de chaque CPK (CPK3, CPK4, CPK6, CPK7, CPK11, CPK13 et CPK33) a été testé sur l'activité des canaux Shaker (KAT1, KAT2 et GORK) exprimés ensemble dans l'ovocyte. Pour ce faire, les ovocytes ont été injectés au préalable soit avec un mélange d'ARNc KAT1, KAT2 et GORK, soit avec ce même mélange plus les ARNc d'une CPK. Les courants ioniques ont été enregistrés et les résultats sont présentés dans la figure III.1. Un courant nul (ou négligeable) est enregistré sur les ovocytes témoins injectés avec de l'eau. Les ovocytes utilisés dans cette manipulation ne possèdent donc pas, à ces potentiels, de conductance endogène pouvant perturber

l'enregistrement des courants potassiques recherchés dans cette expérience (figure III.1A). Le potentiel membranaire de repos est de -40 mV. Les conductances potassiques enregistrées avec les ovocytes injectés avec le mélange de Shaker sont de deux sortes. Lorsque la membrane est dépolarisée (au-dessus du potentiel membranaire, entre 0 et +40 mV), les courants enregistrés sont sortants et correspondent à l'efflux de potassium à travers les canaux GORK. Lors de l'hyperpolarisation de la membrane (en dessous du potentiel membranaire, entre -80 et -170 mV), les courants enregistrés sont entrants et correspondent à l'activation des canaux KAT1 et KAT2 et donc à l'influx de potassium dans la cellule (figure III.1B). Lorsque le mélange Shaker est co-injecté avec les ARNc d'une CPK, nous observons trois de cas de figure : inhibition ; absence d'effet ou stimulation des courants potassiques. Ce criblage a permis de mettre en évidence que certaines CPKs inhibent aussi bien l'activité des canaux potassiques entrants (KAT1 et KAT2) et du canal sortant (GORK). C'est notamment le cas de CPK3, CPK7 et CPK13 (figure III.1B). Inversement CPK6, CPK11 et CPK33 ont un effet stimulateur sur l'activité des canaux potassiques. Enfin, CPK4 n'a aucun effet sur l'activité des canaux potassiques testés. Ce criblage nous à permis d'identifier, parmi les CPKs testées, quelques-unes capables de réguler l'activité des canaux Shaker KAT1, KAT2 et GORK.

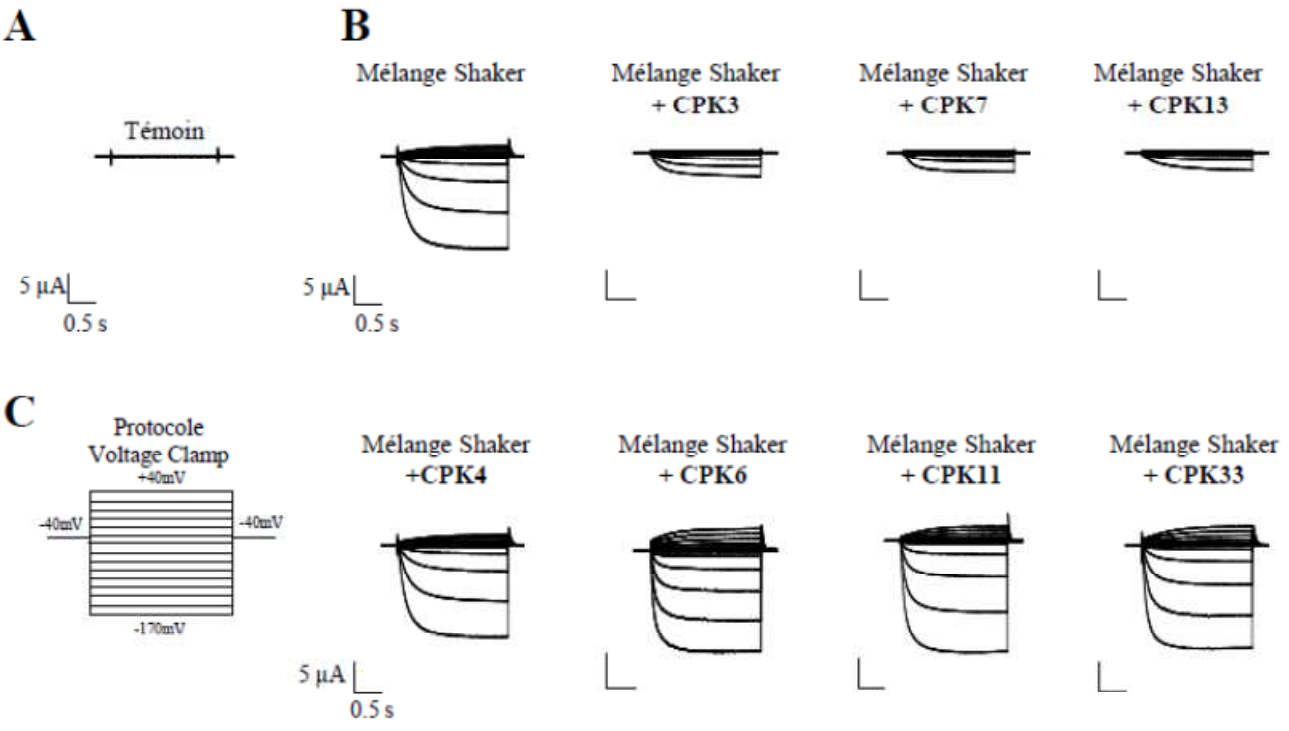


Figure III.1 : Effets des CPKs sur l'activité des canaux Shaker KAT1, KAT2 et GORK co-exprimés dans l'ovocyte de xénope. Les courants sont enregistrés à partir d'ovocytes : injectés avec de l'eau (Témoin) (A), injectés avec un mélange d'ARNc des canaux Shaker (KAT1, KAT2 et GORK) ou avec le mélange d'ARNc Shaker + CPK (B). Les courants potassiques dans ces ovocytes sont enregistrés par la technique de voltage-clamp à deux électrodes (TEVC). La solution extracellulaire perfusée pendant l'enregistrement est du K10Na90 (10 mM de KCl, 90 mM de NaCl). C. Le protocole de voltage-clamp utilisé est le suivant: -40 mV (potentiel de repos) puis 3 sec à une valeur allant de +40 à -170 mV avec des décréments de -15 mV puis un retour au potentiel de repos (-40 mV).

III.2 Clonage et génération des mutants CPKs

Pour caractériser le rôle des CPKs dans la régulation des Shaker, il nous a semblé utile de générer des versions mutantes des CPKs. Sur la base de leurs séquences consensus et de la relation structure-fonction de ces protéines (FL, forme native, Figure III.2), ces constructions sont censées être, soit dépourvues d'activité kinase (KM, mutant kinase, Figure III.2), soit constitutivement actives (indépendamment du Ca^{2+}, mutation AC, Figure III.2). Certaines formes mutantes des CPKs (CPK6, CPK7, CPK13) ont été fournies par Marie Boudsocq (URGV) dans le vecteur HBT95-1X-flag. Avant mon arrivée dans l'équipe, le clonage des différentes formes mutantes des CPKs avait été débuté (avec l'aide de Claire Corratgé, Karine Prado et Tou Cheu Xiong). Au cours de ma thèse, le clonage des différentes formes a été achevé. Dans un premier temps, les CPKs-KM ont été obtenues. Elles possèdent une mutation dans leur domaine kinase (à proximité du domaine de liaison à l'ATP) correspondant à une substitution d'une lysine en méthionine rendant ce dernier non fonctionnel. Dans un second temps, il a été cloné les CPKs dont la partie C-terminale comprenant le domaine Calmoduline (4 "EF-hands") et le domaine auto-inhibiteur ont été tronqués. Les CPKs-AC ont théoriquement perdu la dépendance au Ca^{2+} et l'inhibition par le domaine auto-inhibiteur (Harper et al., 1991 ; Harper et al., 1994). Elles sont donc supposées être constitutivement actives et sont notées CPKs-AC (Figure III.2). A l'exception de la CPK6-AC dont aucun clone n'a pu être obtenu, toutes les versions des CPKs ont été obtenues (3 ; 4 ; 6 ; 13 et 33) dans les trois formes FL, KM et AC. Les résultats sont présentés dans le tableau III.1. Le clonage des différentes formes a été réalisé dans le vecteur pDONR207 pour permettre un clonage plus simple dans les vecteurs d'expression grâce à la technologie Gateway®.

Tableau III.1: Différentes formes de CPKs obtenues au cours de ma thèse.
Ce tableau présente les formes obtenues pour chaque CPK clonées dans le plasmide pDONR207 et dans les différents plasmides de destination utilisés au cours de ces travaux.

CPKs	Native (FL)	Domaine kinase muté (KM)	Constitutivement active (AC)	Non myristoylable (G2A)
CPK3	CPK3-FL	CPK3-KM	CPK3-AC	-
CPK4	CPK4-FL	CPK4-KM	CPK4-AC	-
CPK6	CPK6-FL	CPK6-KM	-	-
CPK13	CPK13-FL	CPK13-KM	CPK13-AC	CPK13-G2A
CPK33	CPK33-FL	CPK33-KM	CPK33-AC	-

Avec la technologie Gateway, ces différents ADNc ont été clonés depuis le plasmide donneur (pDONR207) jusqu'aux différents plasmides de destination avec une recombinaison entre les sites attL et attR des cassettes (voir Chap. II). Dans un premier temps, nous avons cloné les différentes formes des CPKs dans le plasmide de destination pDEST15. Ce plasmide est spécifiquement utilisé pour la production de protéines recombinantes.

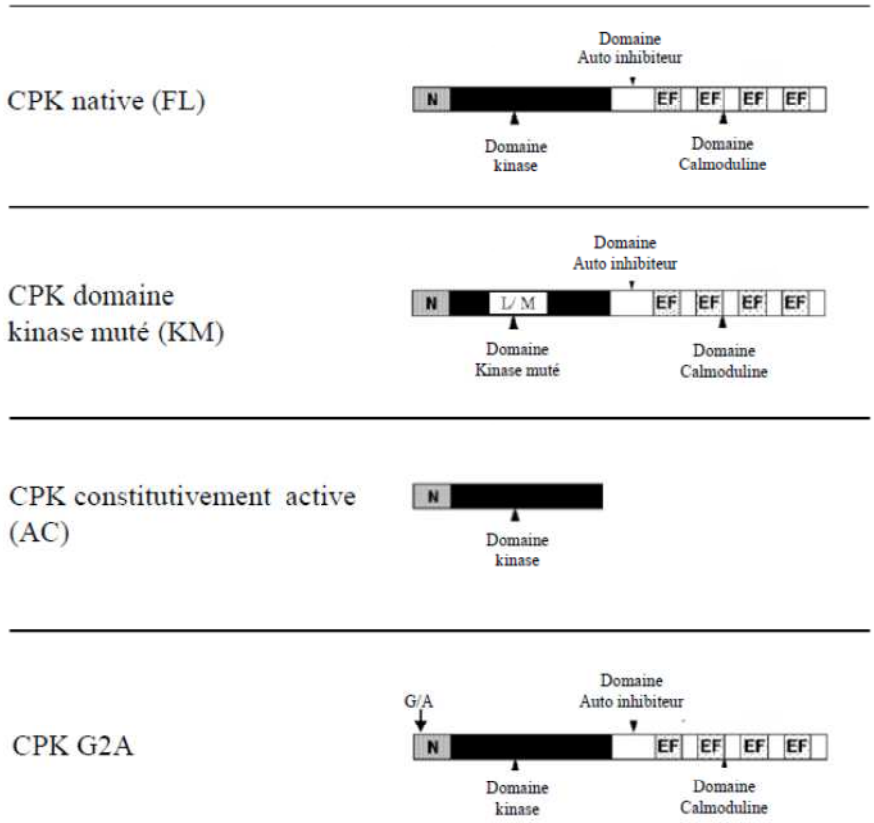


Figure III.2 : Structures des différentes formes des CPKs obtenues aux cours de ma thèse.
Trois formes de CPKs mutantes ont été construites à partir de la première forme native (FL pour full length). Cette forme native possède un domaine N-terminal (N), un domaine kinase, un domaine auto-inhibiteur, et un domaine CaM portant 4 EF-Hands (EF). La forme « CPK domaine kinase muté » (KM pour kinase mutant) diffère seulement de la forme FL par une mutation dans le domaine kinase (en substituant le résidu Lysine en résidu Méthionine) dans le site de fixation de l'ATP, censée inactiver celui-ci. La forme « CPK active constitutivement» (AC pour active constitutivement) ne possède plus de domaine CaM et plus de domaine auto-inhibiteur. Une troisième forme de CPK mutante a été générée (seulement pour CPK13) en substituant le résidu Glycine en position 2 en résidu Alanine pour empêcher la myristoylation de la CPK.

III.3 Production des CPKs recombinantes en système bactérien.

Les différentes CPKs recombinantes ainsi que les versions mutantes ont été produites par un système bactérien selon le protocole établi dans l'équipe de Dirk Becker (Université de Würzburg, Allemagne).

Chaque protéine recombinante est quantifiée grâce à un kit de dosage protéique pour évaluer l'efficacité de la production. Certaines CPKs-FL recombinantes, comme CPK3, CPK6 et CPK33 sont produites facilement. Les concentrations protéiques les plus élevées qui ont été obtenues pour chaque CPK au cours de ma thèse sont présentées dans le tableau III.2. Avec ce système bactérien, les CPKs ont été produites à des concentrations allant jusqu'à 1.8 $\mu g.\mu l^{-1}$ (soit 1,2 mg de protéines pour 250 ml de culture bactérienne initiale). Cependant, la production de la protéine recombinante CPK13-FL s'est toujours révélée plus difficile, avec des concentrations obtenues de 0,3 $\mu g.\mu l^{-1}$, tout de même suffisantes pour réaliser les tests d'activité kinase et de phosphorylation. Les CPKs-AC

sont également difficiles à produire, les concentrations obtenues pour CPK3-AC, CPK13-AC et CPK33-AC sont respectivement de 0,07 ; 0,3 et 0,9 $\mu g.\mu l^{-1}$. Les concentrations obtenues pour toutes ces protéines sont cependant suffisantes pour réaliser les tests d'activité kinase. Les concentrations des CPKs-KM recombinantes sont quant à elles, variables mais restent toujours inférieures à celles obtenues pour les CPK-FL.

Tableau III.2: CPKs recombinantes obtenues à partir d'un système bactérien.
Les protéines recombinantes fusionnées à la GST ont été produites à partir d'une souche bactérienne Rosetta et ont été purifiées avec des billes de sépharose recouvertes de glutathion (Glutathione Sepharose 4B, GE Healthcare Life Sciences). Les différentes concentrations de protéines ont été mesurées avec un kit Pierce après élution par une solution de glutathione (660 nm protein assay). Les poids moléculaires théoriques des CPKs recombinantes fusionnées à la GST sont présentés dans le tableau.

CPKs	Concentration ($\mu g.\mu l^{-1}$)	Poids moléculaires théoriques (kDa)
GST-CPK3 FL	1,3	85
GST-CPK4 FL	0,3	82
GST-CPK6 FL	1,8	87
GST-CPK13FL	0,3	85
GST-CPK33 FL	0,7	84
GST-CPK3 AC	0,07	64
GST-CPK13 AC	0,03	62
GST-CPK33 AC	0,009	62
GST-CPK3 KM	0,1	85
GST-CPK6 KM	0,05	87
GST-CPK13 KM	0,2	85
GST-CPK33 KM	0,06	84

Après avoir déterminé les concentrations de chacune des protéines produites, la pureté et l'identité de ces dernières ont été vérifiées. Pour valider la pureté des protéines, chacune d'elles a été déposée sur un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomasie. Les gels correspondant respectivement aux CPKs-FL, CPKs-AC et CPKs-KM sont présentés dans la figure III.3A. Pour les versions CPKs-FL et CPKs-KM (figure III.3A), des bandes majoritaires sont présentes à environ 85 kDa ce qui correspond à la taille théorique des CPKs natives fusionnées à la GST (voir tableau III.2). Pour les versions CPKs-AC (figure III.3A), des bandes majoritaires sont visibles à environ 65 kDa correspondant aux poids moléculaires des protéines CPKs-AC ($\approx$ 40 kDa) fusionnées à la GST (26 kDa).

Une vérification complémentaire a été réalisée par Western-Blot à l'aide d'un anticorps anti-GST. Après révélation par autoradiographie, des bandes majoritaires sont observées aux poids moléculaires attendus de 85 kDa pour les CPKs-FL et -KM et de 65 kDa pour les CPKs-AC. Ceci suggère fortement la présence de nos protéines recombinantes fusionnées à la GST.

Cet ensemble de données montre que les protéines produites, fusionnées à la GST, sont de la taille attendue et ne semblent pas dégradées.

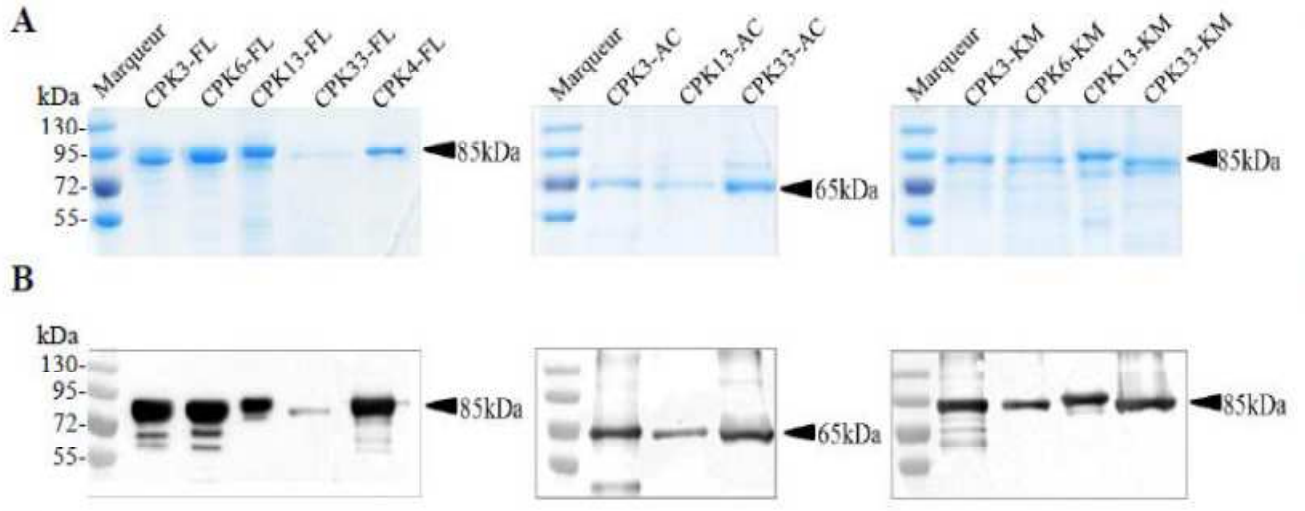


Figure III.3: Vérification de la taille et de la qualité des protéines recombinantes produites.
A. Les gels SDS-PAGE sont colorés avec du bleu de coomasie (Simply Blue, Thermo Scientific). B. Western-Blot (immuno-détection) a été réalisé à l'aide d'un anticorps primaire (Anticorps anti-GST produit chez le lapin, 1/750, Invitrogen, dans TBS + Tween 0,1% et Régilait 1%) et d'un anticorps secondaire (anticorps anti-lapin, 1/20000, GE Healthcare, dans TBS + Tween 0,1% et Régilait 1%). La révélation se fait à l'aide d'un réactif de chimioluminescence (ECL plus, Thermo Scientific).

III.4 Test des activités kinases in vitro des différentes formes de CPKs recombinantes produites

Les activités kinases de ces séries de CPKs recombinantes ont été testées en réalisant des phosphorylations in vitro à l'aide d'un peptide cible des CPKs, la Syntide-2. L'activité des kinases est évaluée à l'aide d'un kit (Kinase-Glo® luminescent, Promega) dans lequel l'ATP est mesuré (Cf. §II.4.6.(i)). L'ATP restant dans le mélange (CPK, Syntide-2, Ca^{2+}, ATP froid) pourra être utilisé par la luciférase dès lors que l'on ajoute le réactif Kinase-Glo®. Plus il y a d'ATP restant, plus la bioluminescence, résultant de l'oxydation de la luciférine par la luciférase (présente dans le réactif Kinase-Glo®), sera importante.

Nous avons mesuré la quantité d'ATP consommée en 15 minutes par les 3 formes de CPKs recombinantes produites en présence de Syntide-2. Les valeurs obtenues sont reportées sur la figure III.4.

L'analyse de l'activité kinase de CPK3, présentée en figure III.4A révèle plusieurs choses. La protéine CPK3-FL, en présence de 830 µM de Ca^{2+} libre, consomme environ 9 µM d'ATP en 15 minutes. CPK3-FL possède donc une activité kinase. La quantité d'ATP consommé par CPK3-FL en absence de Ca^{2+} est 1.6 fois plus faible qu'en présence de Ca^{2+}. L'activité kinase de CPK3 est donc bien dépendante du Ca^{2+}. La forme CPK3-KM montre une activité kinase presque nulle en présence ou en absence de Ca^{2+} : la mutation introduite dans le domaine kinase entraîne bien une inhibition de l'activité kinase de CPK3-KM. Enfin, la forme CPK3-AC consomme la même quantité d'ATP (5 µM) en présence ou en absence de Ca^{2+} et a donc perdu la dépendance au Ca^{2+}. Cependant, cette activité kinase "constitutive" n'est pas aussi élevée que celle de la forme de type sauvage (FL) en présence de Ca^{2+}. Les 3 types de CPK3 recombinantes (-FL, -KM et –AC) montrent donc des caractéristiques biochimiques correspondant à ce qui était attendu (Fig. III.4A).

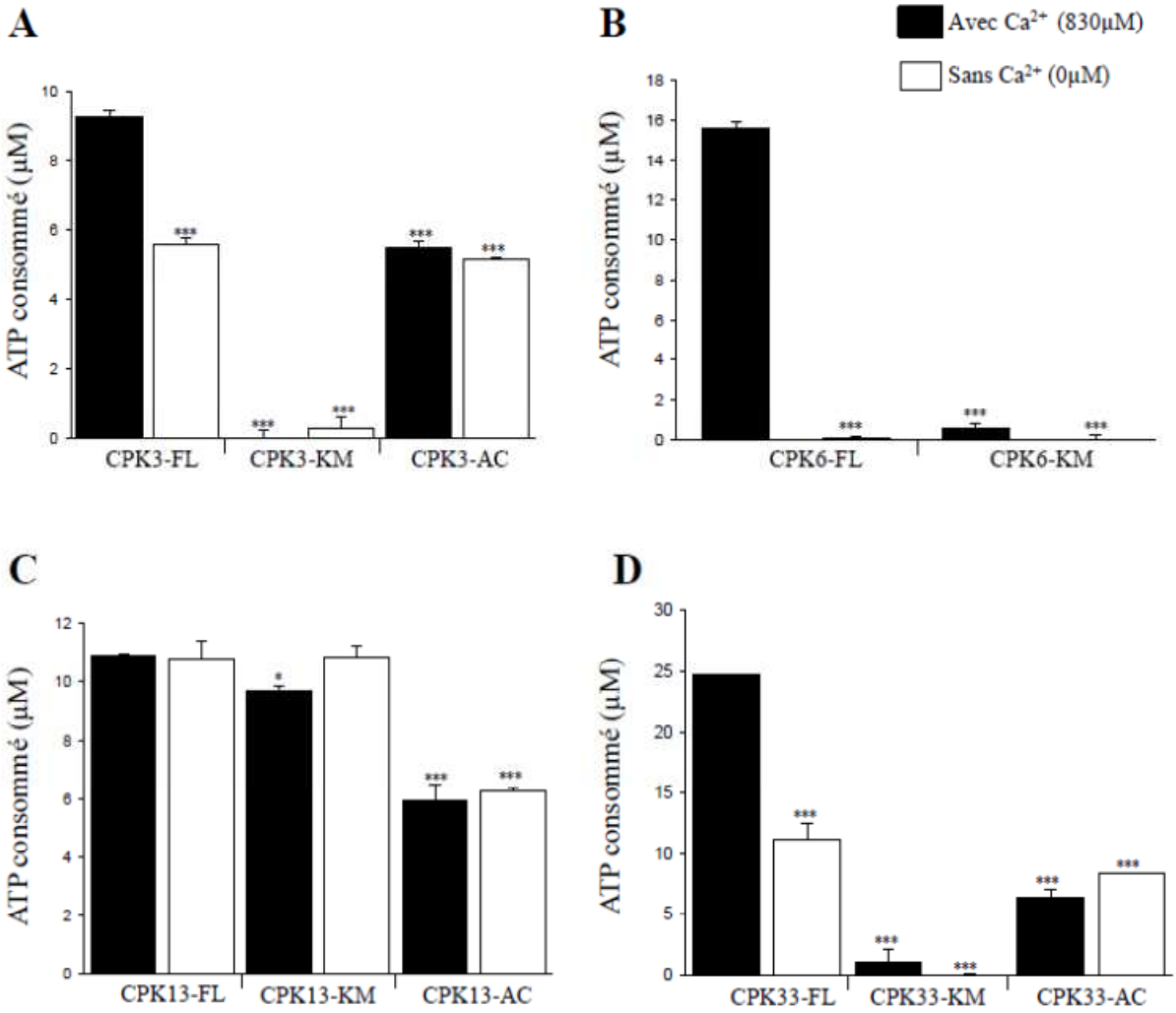


Figure III.4 : **Mesure de l'ATP consommé par les CPKs durant la phosphorylation** in vitro
L'activité des CPKs est mesurée par dosage de l'ATP consommé (Kinase Glo® Luminescent kinase Assays, Promega) en utilisant comme peptide cible la Syntide-2, en présence de 25 µM d'ATP. La réaction de phosphorylation est stoppée après 15 minutes d'incubation en ajoutant le réactif « Kinase Glo® reagent ». Les valeurs de la luminescence émise sont mesurées à l'aide d'un lecteur de plaque (Xenius, Safas). Grâce à une gamme d'ATP, les valeurs de luminescence obtenues lors des essais sont converties en ATP consommé (µM). Les analyses statistiques ont été faites avec des t-test 'Student', $p \leq 0.001$ avec *** et $p \leq 0.05$ avec *.

La même conclusion peut être tirée de l'examen des données relatives aux différentes formes testées de CPK33 (Figure III.4D) et CPK6 (Figure III.4B) excepté une dépendance au calcium plus importante pour CPK6-FL.

Les résultats des tests de phosphorylation pour les formes CPK13 (Figure III.4C), montrent une situation très différente et désignent cette kinase comme un membre atypique de la famille CPK. En présence de Ca^{2+}, la protéine CPK13-FL consomme 11 µM d'ATP en 15 min. Elle possède donc une activité kinase. Il est intéressant de noter qu'en absence de Ca^{2+} la quantité d'ATP consommée, est la même qu'avec du Ca^{2+}. L'activité kinase de cette CPK est donc, de façon intéressante, indépendante du Ca^{2+}. Ce résultat corrobore avec les données obtenues par Marie Boudsocq publiées en 2012 sur cette même CPK (Boudsocq et al, 2012 ; Kanchiswamy et al., 2010).

La quantité d'ATP consommé en présence ou en absence de Ca^{2+}, pour la protéine CPK13 est équivalente aux valeurs obtenues pour la forme CPK13-FL. Pour cette CPK, la substitution de la lysine en méthionine dans le domaine kinase, n'entraîne pas d'inhibition de l'activité de la protéine. Au cours de la thèse, la construction d'autres mutants a été entreprise. Nous avons déterminé à l'aide d'un logiciel informatique de prédiction (UniProtKB), le site de fixation de l'ATP dans le domaine kinase de CPK13. Ce site théorique de fixation de l'ATP est une séquence de 9 acides aminés, LGRGEFGV. Il a donc été décidé de muter cette séquence en LGGGGGGV puisque la séquence initiale comportait déjà trois glycines. Le clone bactérien possédant cette nouvelle construction a été obtenu mais la production de la protéine n'est pas satisfaisante. Ce travail est encore en cours dans l'équipe.

Les tests réalisés avec la forme CPK13-AC, confirment que la délétion de la partie C-ter des CPKs engendre une baisse de leur activité kinase. En effet, l'activité kinase de CPK13-AC, avec ou sans Ca^{2+} est de 6 µM d'ATP consommé en 15 minutes, soit deux fois moins importante par rapport aux activités mesurées avec la forme CPK13-FL.

En conclusion de ce travail, nous avons mis en évidence que les CPKs recombinantes produites sont fonctionnelles puisqu'elles possèdent des activités kinases. Les résultats mettent en évidence trois cas de figure vis-à-vis de la dépendance au Ca^{2+}, d'abord l'activité kinase de CPK3 et CPK33 est partiellement dépendante du Ca^{2+}, puis celle de CPK6 est fortement dépendante du Ca^{2+} et enfin celle de CPK13 est indépendante du Ca^{2+}.

Les CPKs recombinantes produites ont, par la suite, été utilisées pour réaliser des phosphorylations in vitro sur des puces à peptides.

III.5 Phosphorylation in vitro par les CPKs sur des puces à peptides

Nous avons envoyé à l'entreprise Proteomic Solutions, une liste de 384 peptides constitués chacun de 15 à 18 acides aminés choisis selon une série de critères tel qu'expliqué dans le chapitre "Matériels et méthodes (§II.6.2). Six de ces 384 peptides ont été choisis d'après les données de la littérature comme des cibles probables des CPKs et tiennent donc lieu de contrôles positifs. Ces 6 peptides sont : Syntide-2, Autocamtide-2, Control subtrate peptide (CSP), AtDil9, TPK1a et TPK1b (Shao and Harmon, 2003 ; Rodriguez Milla et al., 2006 ; Latz et al., 2013b). Les 378 autres peptides ont été synthétisés d'après la séquence protéique des sous-unités de canaux Shaker KAT1, KAT2, AKT2 et de la protéine phosphatase PP2CA d'Arabidopsis thaliana (régulateur potentiel des CPKs, Brandt et al., 2012). Ces peptides contiennent au moins un résidu sérine et/ou thréonine et d'après une étude in silico correspondent à des sites putatifs de phosphorylation par le CPKs au sein des protéines Shaker (i.e. censés être accessibles depuis le cytoplasme dans la configuration native de ces protéines membranaires). Beaucoup de ces peptides comprennent plusieurs résidus Sérine/Thréonine. Afin de lever le plus possible de ces ambiguïtés (i.e. afin d'identifier le résidu responsable de la phosphorylation du peptide), des peptides mutants ont été synthétisés et fixés à proximité du peptide sauvage correspondant. Ces peptides mutants contiennent au moins une mutation ponctuelle (sérine ou thréonine substitué en alanine).

La société Proteomic Solutions a donc synthétisée puis fixée les 384 peptides sur une lame de verre selon le patron représenté sur la figure III.5. Les spots sont ordonnés selon une matrice à maille carrée de 16 lignes (A à P) et de 24 colonnes (1 à 24). De cette manière, chaque peptide est repéré par sa position (exemple : P19 pour le peptide contrôle Syntide2). La liste complète des 384 peptides avec leur séquence en acides aminés et leur position sur la puce est donnée dans l'annexe 2 de ce mémoire. A noter que l'alignement des spots n'était pas rigoureux ce qui a empêché l'automatisation de l'analyse des autoradiographies obtenus après le test de phosphorylation. Une analyse avec Image J a cependant permis de quantifier les intensités des signaux de phosphorylation (en niveau de gris).

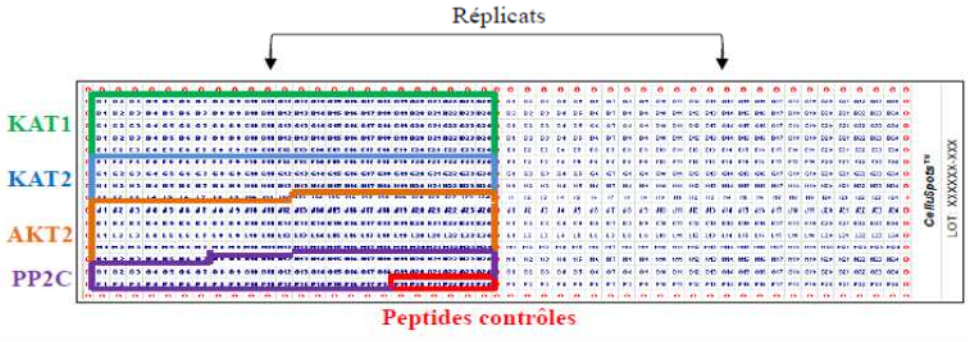


Figure III.5: Plan des puces à peptide utilisées au cours de ma thèse.
Des peptides de 15 à 18 acides aminés sont synthétisés et fixés sur des lames de verre. 384 peptides sont fixés sur cette lame en réplicat, ils correspondent aux séquences peptidiques des canaux Shaker KAT1, KAT2, AKT2 et de la protéine PP2CA. La puce contient également 6 peptides contrôles connus pour être phosphorylés par les CPKs : Syntide-2, Autocamtide-2, CSP, AtDil9, TPK1a et TPK1b.

Les protéines recombinantes CPK3, CPK6, CPK13 et CPK33 ont été testées sur ces lames (Cf. §II.6.3). Des exemples d'autoradiographies obtenues pour chacune de ces CPKs sont présentés dans la figure III.6. Chaque spot marqué (coloration noire sur la figure III.6) correspond à un peptide phosphorylé. L'intensité de la coloration noire d'un spot indiquant le niveau de phosphorylation du peptide. La quantification du signal a été réalisée, dans un premier temps, pour les peptides contrôles, elle est présentée (une fausse couleur différente pour chaque kinase testée) dans le tableau III.3. Les 6 peptides contrôles ont été phosphorylés par les 4 CPKs. Les CPKs testées possèdent bien la capacité de phosphoryler avec plus ou moins de facilité ces 6 peptides cibles. Après quantification (Figure III.7), les CPKs testées ont le même profil de phosphorylation vis-à-vis des 6 peptides contrôles. Elles phosphorylent plus facilement les peptides CSP et TPK1a. D'après ces résultats, la Syntide-2 n'est pas l'un des meilleurs peptides phosphorylés pour les CPKs.

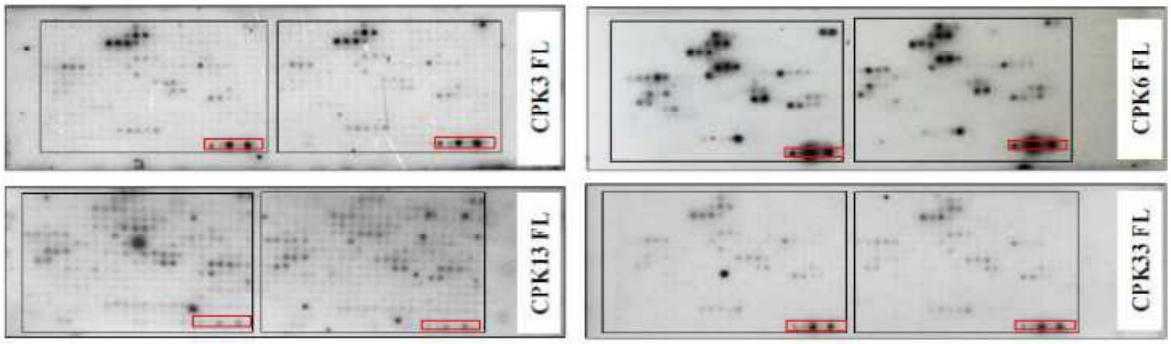


Figure III.6: Autoradiographies des puces à peptides après phosphorylation in vitro.
Les autoradiographies ont été obtenues après 1h de phosphorylation in vitro avec les différentes CPKs recombinantes CPK3-FL, CPK6-FL, CPK13-FL et CPK33-FL en présence de 830 µM de calcium libre et d'ATP radio-marqué [ATP γ-^{32}P]. Les cadres rouges permettent de repérer les 6 peptides contrôles.

Tableau III.3: Phosphorylation des 6 peptides contrôles présents sur la puce par les CPKs
Ce tableau présente les 6 peptides contrôles (Syntide-2, Autocamtide-2, CSP, AtDil9, TPK1a et TPK1b, leurs séquences et leur position sur la puce. Les 4 dernières colonnes du tableau représentent les signaux de phosphorylation (en fausses couleurs) obtenus pour chaque peptide contrôle pour la CPK3 (spots oranges), la CPK6 (spots verts), la CPK13 (spots bleus) et la CPK33 (spots rouges).

Nom du peptide	Sequence AA	Position sur la puce	CPK3	CPK6	CPK13	CPK33
Synthide-2	PLARTLSVAGLPGKK	P19				
Autocamtide-2	KKALRRQETVDAL	P20				
CSP	AERHPTLTRSPTLRNIQPPC	P21				
AtDil9	SGTNSTLSLLR	P22				
TPK1a	RRLRRSRSAPRGDCMYND	P23				
TPK1b	TEKIDTMAQDFNLNSRTSSSRK	P24				

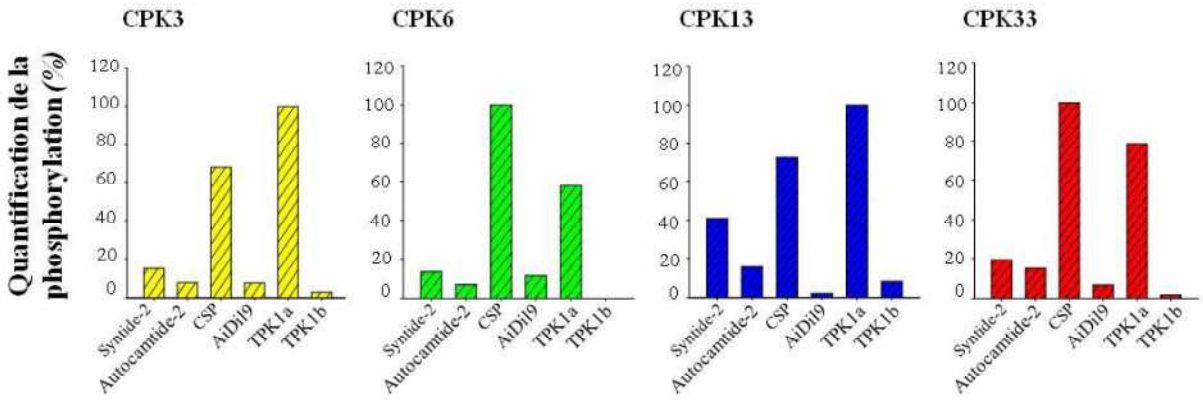


Figure III.7 : Quantification relative de la phosphorylation des peptides contrôles par les CPKs
La quantification de la phosphorylation des 6 peptides par CPK3, CPK6, CPK13 et CPK33 a été réalisée avec Image J. Les résultats sont exprimés en pourcentage en prenant pour 100%, les valeurs obtenus avec le peptide le plus fortement phosphorylé et ceci pour chaque CPK.

De manière générale, les autoradiographies montrent un profil similaire de phosphorylation des Shaker quel que soit la CPK utilisée. Ceci s'explique par le fait que les CPKs font partie de la même famille de kinases. Cependant, une analyse détaillée de la phosphorylation, par exemple des peptides de KAT2, montre des différences entre les CPKs testées. Dans le cas d'un peptide comprenant plusieurs résidus S/T comme montré dans la figure III.8, toutes les CPKs ne phosphorylent pas forcement le même résidu. Deux exemples sont présentés dans la figure III.8. Dans le premier exemple (Figure III.8A), nous avons un peptide avec deux résidus potentiellement phosphorylables. Le peptide sauvage (S190/S191) est phosphorylé par toutes les CPKs testées mais le peptide mutant (A190/S191) n'est plus phosphorylé par CPK13. Nous pouvons en conclure que CPK13 phosphoryle plus spécifiquement le résidu Sérine 190 de KAT2. La phosphorylation du peptide mutant A190 reste inchangée pour les autres CPKs, ceci permet de supposer que les CPK3, 6, et 33 ciblent plutôt le résidu S191. Le second exemple présenté dans la figure III.8B, met en évidence que CPK13 est la seule CPK capable de phosphoryler la Thréonine 354 de KAT2. Ces deux exemples ne représentent pas la majorité des cas, les résidus ne peuvent pas être discriminés même avec l'aide des peptides mutants.

En conclusion, en croisant les données obtenues avec les différentes CPKs, il est mis en évidence un pattern de phosphorylation de KAT2 par les différentes CPKs. Nous avons étudié avec précision la phosphorylation des peptides de KAT2-CPK13. Ce travail est présenté dans la partie IV. Concernant les autres CPKs, l'analyse est encore en cours dans l'équipe.

L'analyse des puces montre que certains peptides de KAT1 sont également phosphorylés par les CPKs testées. Sur la puce, certains peptides homologues pour KAT2 et KAT1 sont phosphorylés. Les peptides d'AKT2 et de et KAPP2CA sont rarement phosphorylés.

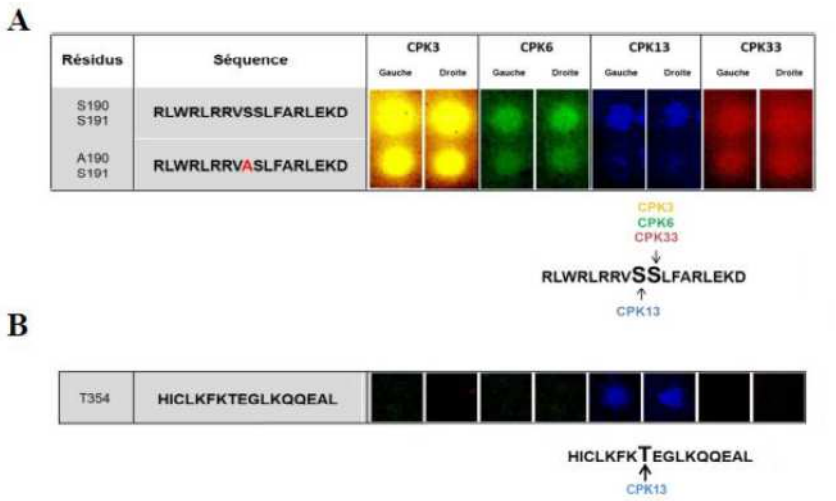


Figure III.8 : Exemples d'analyse de la phosphorylation de peptides présents sur les puces.
A. Analyse de phosphorylation d'un peptide sauvage (WT) comprenant 2 résidus Sérines et de son peptide mutant correspondant par les 4 CPKs. B. Analyse de la phosphorylation d'un peptide sauvage possédant un seul résidu Thréonine.

III.6 Etude in planta **de l'activité des promoteurs CPKs à l'aide de l'imagerie**

III.6.1 Constructions de lignées pCPK::LUC

Nous avons réalisé dans l'équipe, des lignées d'Arabidopsis thaliana exprimant le gène codant la luciférase sous contrôle du promoteur d'un gène cpk (lignées notées pCPK::LUC). L'activité enzymatique de la Luciférase est présentée dans la figure III.9A. En présence d'ATP et de son substrat : la luciférine, la Luciférase catalyse l'oxydation de cette dernière en oxy-luciférine, il en résulte une émission de photon à 560 nm. La construction pCPK::LUC est schématisée dans la figure III.9B. A ce jour, nous disposons dans l'équipe des lignées pCPK3::LUC, pCPK6::LUC, pCPK13::LUC et pCPK33::LUC (construites par Fréderic Sanchez).

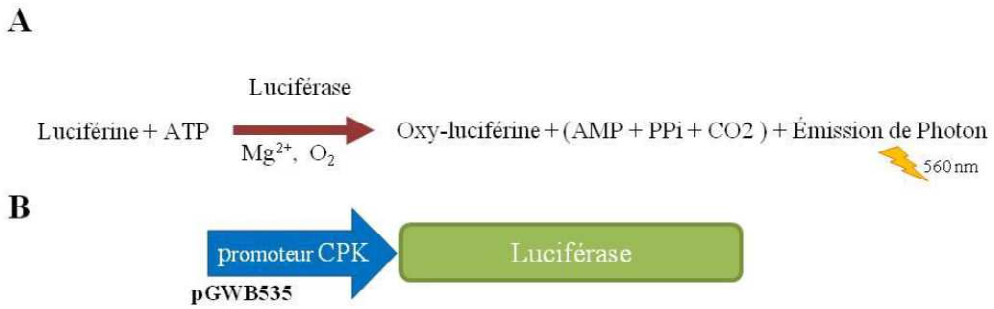


Figure III.9 : Construction des lignées « promoteur CPKs-Luciférase ».
A. Principe de la réaction de bioluminescence induite par la Luciférase Firefly. La luciférase utilise de l'ATP afin de catalyser la réaction d'oxydation de la luciférine. Il en résulte de l'oxy-luciférine et une émission de photons. La luciférase B. Schéma de la fusion promoteur CPK et gène rapporteur LUC. L'activité du promoteur est suivie grâce au signal bioluminescent de la luciférase.

Des premières données de mesure d'activité des promoteurs des CPKs ont été obtenues. Elles sont présentées en figure III.10. Les premières mesures de ce type ont été réalisées avec la lignée pCPK6-LUC (par Sophie Lanciano). Nous sommes capables d'enregistrer, avec ces différentes lignées, des signaux luminescents émis dans les feuilles d'Arabidopsis thaliana. Ces mesures sont en cours dans l'équipe. Les données enregistrées avec la lignée pCPK6-LUC seront exploitées dans la partie V de ce manuscrit.

Ces expériences ouvrent des perspectives intéressantes puisque ce signal émis dans les plantes peut-être quantifié. Il sera donc possible à grande échelle, d'appliquer différents stress connus aux plantes et de suivre en temps réel l'activité des promoteurs en réponse à ces stress (i.e. expression spatio-temporel des CPKs).

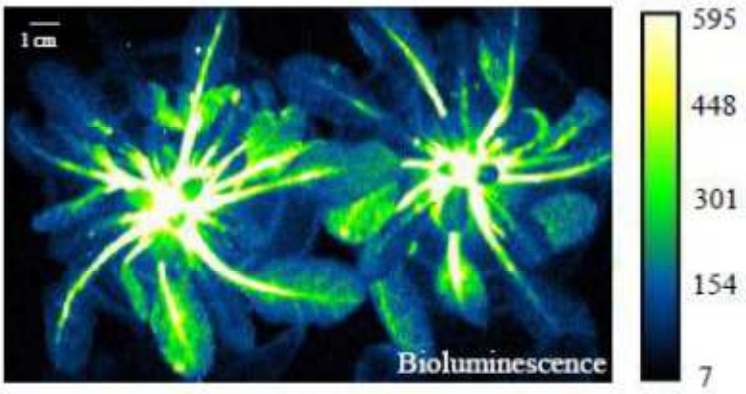


Figure III.10 : Exemple de signal bioluminescent de la Luciférase sur des plantes transgéniques pCPKs-Luciférase.
La lignée pCPK6-LUC est utilisée ici pour illustrer la méthode. Les plantes sont pulvérisées avec une solution de luciférine et elles sont placées dans la boite noire. L'image a été réalisée à l'aide d'une caméra CCD. Le signal (en fausse couleur) représente l'intensité de l'expression de la Luciférase, plus le signal est blanc, plus l'expression est forte. L'échelle placée à droite correspond à une échelle d'intensité du signal bioluminescent.

III.7 Mise en place d'une sonde génétique pour l'imagerie calcique in planta

En complément, les CPKs étant impliquées dans les voies de signalisation calcique, nous avons mise en place une méthode performante pour visualiser les évènements calciques associés à ces stress.

III.7.1 Principe de la sonde G5A

L'aequorine est une protéine capable de fixer 3 ions calcium et d'émettre un photon en présence de son co-facteur (Coelenterazine). Cette sonde bioluminescente émet des photons à 468 nm. L'intérêt de cette sonde en imagerie calcique végétale est qu'elle ne nécessite pas d'excitation lumineuse et ceci évite ainsi que le signal d'intérêt (émis par l'aequorine) soit masqué par l'autofluorescence des tissus de la plante. Ce problème est particulièrement rencontré dans les tissus photosynthétiques. Pour cette raison, l'usage de l'aequorine en imagerie calcique végétale est restreint à des tissus peu

pigmentés à faible autofluorescence. D'autre part, dans certains cas, le signal aequorine reste faible, notamment parce qu'une partie des photons émis par la sonde est absorbée par les tissus. En pratique l'imagerie calcique avec l'aequorine sur des feuilles ou des plantules entières doit être capable de détecter les photons uniques. Généralement une caméra ultra sensible de type EM-CCD ("Electron Multiplying Charge Coupled Device") ou une caméra intensifiée ICCD, IPD (Intensified Charge Coupled Device, Image photon detector) permettent d'imager les signaux bioluminescents. Une nouvelle sonde calcique appelée G5A a été inventée et validée pour l'imagerie calcique de tissus animaux (Baubet et al., 2000 ; Martin et al., 2007 ; Rogers et al., 2008). Cette sonde, combinant l'aequorine et la GFP, émet de la fluorescence sans excitation, puisque l'aequorine excite la GFP grâce à un phénomène de BRET ("bioluminescence resonance energy transfer"). Dans le cadre de mon projet de thèse, afin d'améliorer nos possibilités d'imagerie de signaux calciques dans les feuilles d'A. thaliana, il a été décidé d'utiliser la sonde G5A dans un contexte végétal.

La G5A est codée par un gène chimérique construit à partir des gènes codant la GFP et l'aequorine. Dans le vecteur de transgénèse, ce gène est placé sous le contrôle d'un promoteur constitutif fort (35S). Le schéma de la construction G5A est présenté dans la figure III.11.

Dans la G5A, l'aequorine est liée à la GFP par l'intermédiaire de 5 répétitions d'une séquence peptidique (SGGSGSGGQ). D'après les auteurs de cette construction, cette configuration est optimale pour une réaction de type BRET entre l'aequorine et la GFP : l'émission d'un photon à 468 nm par l'aequorine permet l'excitation de la GFP qui émet des photons à 510 nm (Figure III.11A).

Le signal de la G5A est en moyenne 3 à 5 fois plus intense que le signal de l'aequorine dans des conditions expérimentales similaires. Cette sonde a été fournie par Philippe Brulet (Gif-Sur-Yvette).

III.7.2 Mesures de variations calcique in planta

Pour visualiser des variations calciques in planta, nous avons utilisé une lignée transgénique G5A. Une caméra CCD refroidie est suffisante pour visualiser les événements calciques déclenchés par un stress salin (NaCl 200 mM) appliqué, par exemple, au niveau des racines.

Nous observons, après l'application de NaCl 200mM au niveau des racines de la plante, des fluctuations calciques visibles d'abord dans le pétiole, puis dans les nervures primaires dès 2 min 30 sec, puis dans les nervures secondaires des feuilles après 3 min (Figure III.11B). Nous notons que les feuilles d'une même plante répondent différemment au stress. Une quantification du signal est possible dans les tissus vasculaires et les résultats sont présentés dans la figure III.11C. Les signaux lumineux aux temps t (T) sont normalisés par rapport à l'absence de signal à t0 (T0). Deux minutes

après l'application du stress, le rapport d'intensité T/T0 augmente pour atteindre un pic à 3 min d'un facteur 6 ± 2,1 (n= 5 plantes) au niveau des feuilles. Le signal reste stable pendant 1 min puis diminue rapidement pour revenir à son état initial au bout de 45 min (non montré). Ces résultats permettent alors de conclure que cette augmentation de l'intensité (T/T0) reflète l'augmentation du niveau de calcium dans les nervures de la feuille.

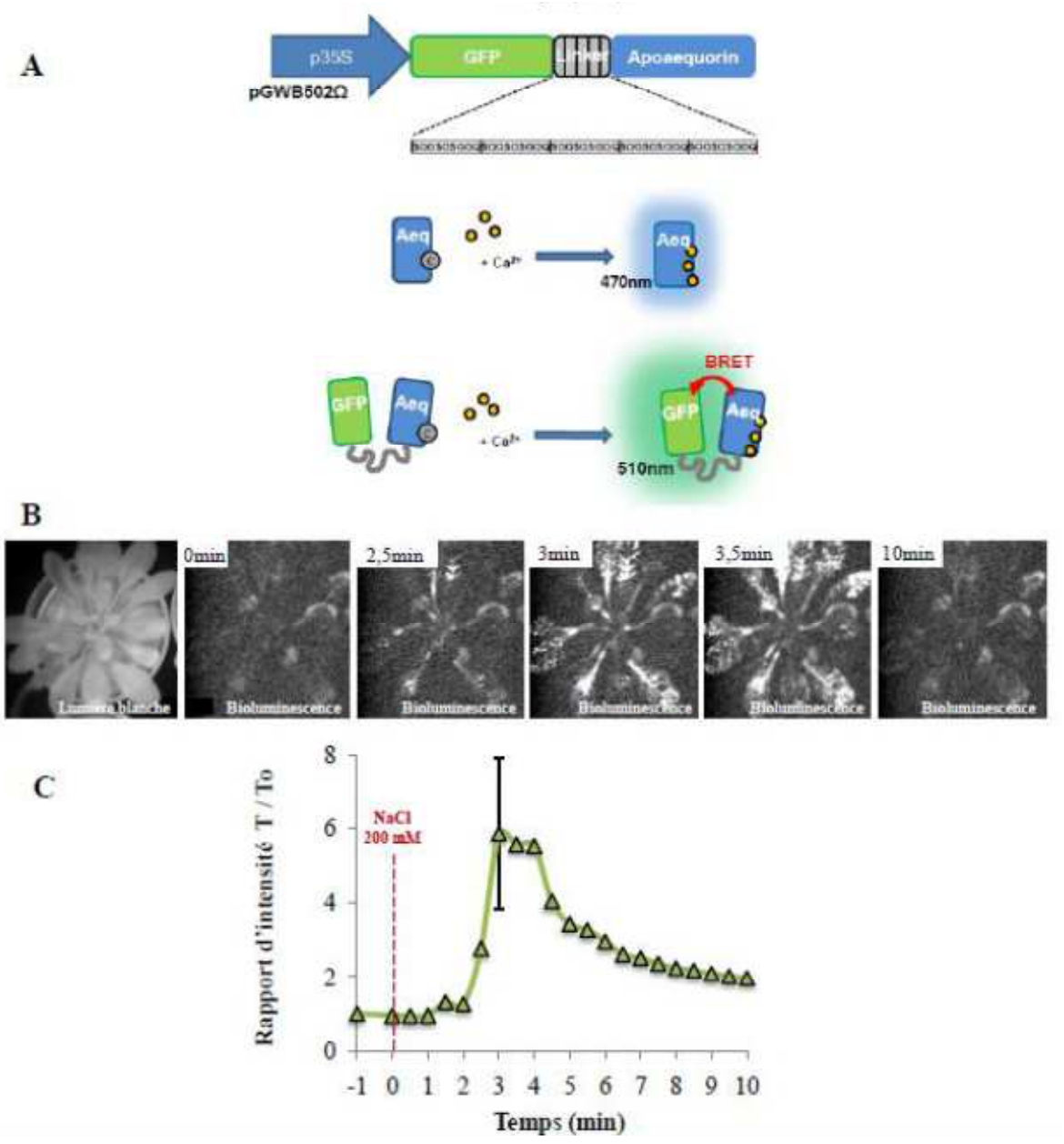


Figure III.11: Imagerie calcique in planta en utilisant la sonde G5A.
A. Principe de la sonde aequorine et G5A. Lorsque l'aequorine fixe le calcium, un changement conformationnel de la protéine entraine une émission de photon à 470 nm. La sonde G5A combine les protéines aequorine et GFP séparées par une répétition de courtes séquences. La GFP peut alors émettre de la fluorescence sans excitation extérieure puisque l'aequorine excite la GFP grâce à un phénomène de BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer). B. Exemple de mesure de calcium sur plante entière avec la sonde G5A. Le signal bioluminescent proportionnel au niveau de calcium libre est mesuré sur des plantes G5A sur laquelle, un stress salin (200mM NaCl) est appliqué à 0min au niveau des racines. Dès 2,5 min des signaux bioluminescents sont détectés au niveau des feuilles. Le pic maximum est atteint à 3,5 min. Après 10 min il n'y a plus de signaux détectés. (C) Quantification du signal calcique global de la plante au cours du temps. Signal moyen enregistré sur 5 plantes.

Ainsi, la G5A nous permet de visualiser une signalisation calcique mise en place en réponse à un stress salin, d'en connaître la dynamique spatio-temporelle et dans la plupart des cas, d'estimer le niveau de ce signal calcique. La méthode d'utilisation de cette sonde pour de l'imagerie calcique in planta fait l'objet d'une publication par notre équipe (annexe 3).

III.8 Conclusion

En résumé de cette partie, où sont exposés mes travaux préliminaires et les mises au point méthodologiques, j'ai initié la caractérisation des protéines CPK3, CPK6, CPK13 et CPK33. Nous avons étudié leur capacité à réguler les activités des canaux potassiques KAT1, KAT2 et GORK dans un système d'expression hétérologue (ovocyte de xénope). J'ai caractérisé les activités kinases de ces 4 CPKs en réponse au Ca^{2+}. L'analyse de la phosphorylation des canaux Shakers KAT1, KAT2, AKT2 et de PP2CA par les CPKs est actuellement en cours. Enfin, un travail important de transgénèse a été réalisé dans l'équipe afin d'étudier l'expression in planta des gènes CPK (activité de leurs promoteurs) en réponse à des situations de stress.

Lorsque l'on croise les résultats présentés ci-dessus avec les données de la littérature, plusieurs axes de recherche paraissent intéressants. En effet, nous savons d'après des données publiées (Leonhardt et al., 2004 ; Zhao et al. 2008), que CPK3, CPK6, CPK13 et CPK33 sont exprimés dans les cellules de garde. De plus, nous avons montré en voltage-clamp, que CPK6 et CPK13 ont un effet significatif sur l'activité des canaux Shaker. Nous notons que CPK13 inhibe fortement l'activité des canaux Shakers quand, à l'opposé, CPK6 augmente cette activité. Enfin, dans ce chapitre, j'ai mis en évidence que ces deux protéines possèdent des réponses différentes au Ca^{2+} : CPK6 est fortement dépendante du Ca^{2+} et CPK13 est essentiellement indépendante du Ca^{2+}. Une étude de ces deux kinases m'a donc paru être un choix pertinent. Nous avons étudié dans un premier temps, la régulation de KAT2 par la protéine kinase CPK13 dans la cellule de garde (partie IV). Dans un second temps, je me suis intéressée à la régulation du canal KAT2 par CPK6 dans les tissus vasculaires des feuilles (partie V).

IV. Inhibition de KAT2 par la protéine CPK13 impactant sur l'ouverture stomatique

Les résultats précédents et les données de la littérature mettent en évidence que la protéine kinase CPK13 est un candidat intéressant pour l'étude de la régulation des canaux Shaker dans la cellule de garde. En effet, d'après des expériences en voltage-clamp sur ovocyte de xénope, CPK13 inhibe l'activité des canaux KAT2 qui est un acteur des mouvements « rapides » d'ouverture stomatique (Lebaudy et al., 2008a). De plus, Leonhardt et ses collègues ont mis en évidence que CPK13 est exprimée dans la cellule de garde (Leonhardt et al., 2004). Des données transcriptomiques extraites du site de genevestigator, présentées en figure IV.1, montrent que l'expression de CPK13 est l'une des plus élevée dans les feuilles, par rapport aux 5 autres CPKs (exceptée CPK3). À ce jour, le rôle de CPK13 dans les stomates n'a jamais encore été décrit et son profil d'expression dans la feuille est inconnu. Ces données rendent son étude particulièrement intéressante. Nous émettons l'hypothèse que CPK13 peut être un régulateur potentiel de l'ouverture stomatique à travers le canal potassique KAT2.

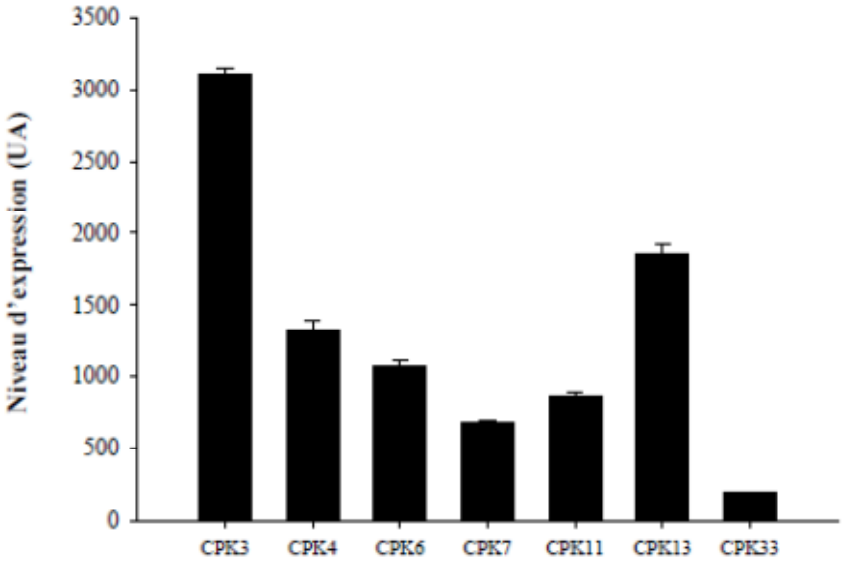


Figure IV.1:Analyse in silico **de l'expression de chaque CPK dans les feuilles d'**Arabidopsis thaliana. Données provenant de Geneverstigator (www.genevestigator.com)

Dans ce chapitre, le rôle de CPK13 comme acteur potentiel de la régulation des mouvements stomatiques est étudié. Dans un premier temps, il est montré que CPK13 inhibe la conductance potassique de KAT2 en ovocyte de xénope, en utilisant une technique de voltage-clamp à deux électrodes. Dans un second temps, la technique de FRET-FLIM, a permis de mettre en évidence une

co-localisation et une interaction directe entre KAT2 et la kinase. Par la suite, la phosphorylation in vitro de KAT2 par CPK13 est étudiée. In planta, l'utilisation d'une lignée pCPK13::GUS permet de confirmer les données transcriptomiques, car l'activité du promoteur de CPK13 est présente entre autres dans les parties aériennes d'Arabidopsis thaliana et tout particulièrement dans les cellules de garde. Enfin, il est mis en évidence que la surexpression de CPK13 chez Arabidopsis thaliana induit un défaut dans l'ouverture stomatique.

IV.1 CPK13 inhibe l'activité de KAT2 en ovocyte de xénope

Afin de tester l'activité de CPK13 sur l'activité du canal Shaker KAT2, un système d'expression hétérologue est utilisé : l'ovocyte de xénope. Il permet d'enregistrer les activités des courants ioniques exprimés dans l'ovocyte de xénope en fonction du potentiel imposé à la cellule. En voltage clamp, une gamme de potentiels est appliquée à l'ovocyte, ce qui tend à activer ou à inhiber les canaux ioniques exprimés à la membrane (Matériel et méthode, figure II.4). Avec ce système, les courants potassiques des canaux Shaker entrants KAT2 et AKT2 sont enregistrés en présence ou non de CPKs : CPK13, CPK13-G2A et CPK4 (utilisé comme contrôle négatif).

Au préalable, la quasi-absence de conductances endogènes dans des ovocytes « témoins » (ovocytes non injectés) est vérifiée. Aucun courant endogène significatif n'a été enregistré avec ces ovocytes témoins dans les conditions testées (figure IV.2A). Des ovocytes exprimant seulement le canal KAT2 sont utilisés comme contrôles en début de manipulation afin de vérifier la présence de courant entrant (figure IV.2A) et de tester sur ce dernier l'effet du césium (cation bloquant les canaux potassiques de type Shaker, figure IV.2A). Dans ce cas, le blocage complet par Cs^+ confirme que les courants enregistrés sont bien dus à l'activité de canaux très sélectifs de K^+, ici KAT2. Une fois que tous les contrôles ont été validés, les enregistrements réalisés sur des ovocytes exprimant KAT2 ou KAT2+CPK13 sont comparés (Figure IV.2B).

Plus la membrane est hyper-polarisée, plus l'activité du canal KAT2 est importante. En effet, à un potentiel de -100 mV, la probabilité de l'état ouvert des canaux potassiques KAT2 devient significative (un faible courant est visible). Lorsque le potentiel de membrane atteint -145 mV, un courant de plusieurs µA (-10 µA, dans l'exemple de la Fig. IV.2B) est enregistré, indiquant de nombreux canaux KAT2 ouverts. Ces valeurs de courants, importantes et dépendantes du changement de potentiel de membrane confirment que le canal KAT2 est correctement exprimé dans l'ovocyte en accord avec les données publiées (Lebaudy et al., 2010). Si CPK13 est co-exprimé avec KAT2, une diminution significative de la conductance potassique (-60 %). est observée à -145 mV. En réalisant la courbe I-V (Figure IV.2D), représentant le courant enregistré

(I) en fonction du potentiel des membranes (V) à l'état stationnaire, nous notons que l'inhibition de l'activité de KAT2 n'est pas due à un changement du seuil d'activation de KAT2. En effet, lorsque KAT2 est exprimé avec ou sans CPK13, la population de canaux ne s'ouvre qu'à partir d'un potentiel de membrane de -100 mV. Au potentiel de -145 mV, la valeur de la conductance potassique des ovocytes co-injectés est de -4 µA en moyenne sur 12 ovocytes, représentant 60 % d'inhibition de l'activité de KAT2.

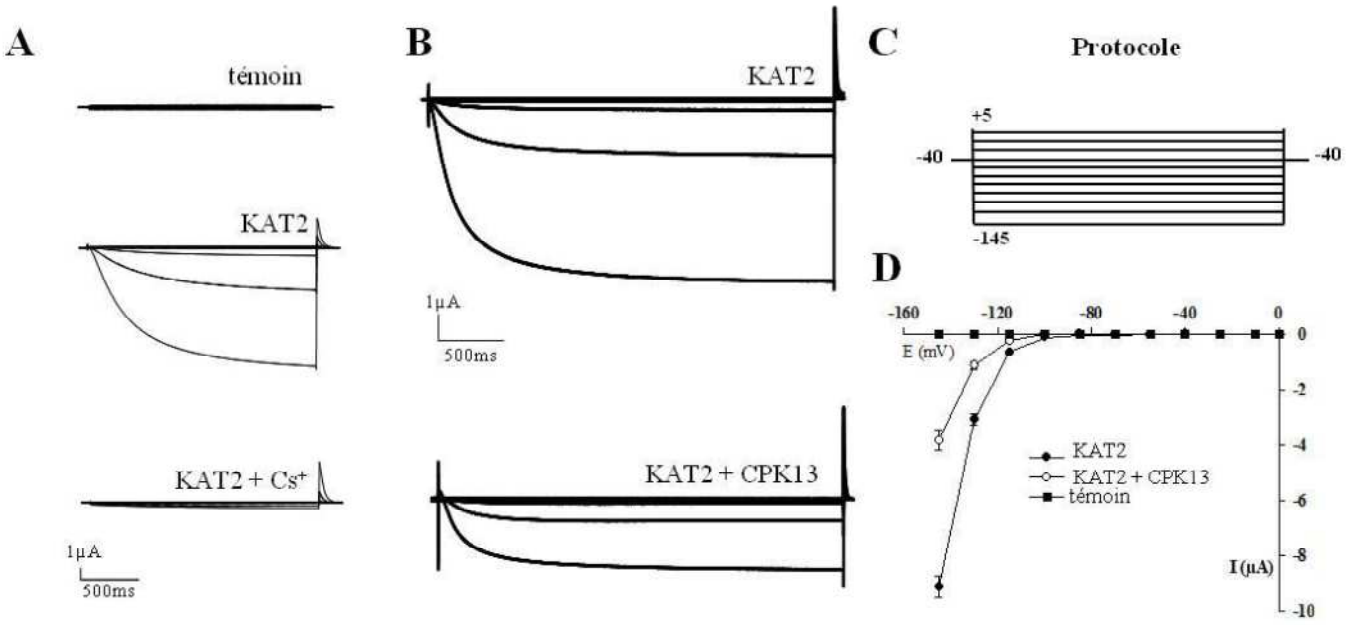


Figure IV.2 : Enregistrement de courants ioniques dans des ovocytes en TEVC.
A. Des courants des ovocytes contrôles sont enregistrés avant chaque manipulation : ovocytes non injectés (haut) sont mesurés pour vérifier l'absence de courants endogènes, des ovocytes exprimant simplement KAT2 (milieu) pour vérifier l'expression des ARNc et ces mêmes ovocytes avec une solution de 10 mM de Césium (Cs^+, bas) bloquant spécifiquement les courants potassiques entrants. B. Courants potassiques entrants enregistrés avec les ovocytes exprimant uniquement KAT2 (haut) ou co-exprimant KAT2 et CPK13 (bas). C. Protocole de voltage clamp utilisé pour les enregistrements composé de 11 épisodes de voltage clamp de 3 s à des potentiels imposés allant de +5 à -145 mV avec des décréments de -15 mV ; enregistrement du courant de base au potentiel dit de "holding" à -40 mV avant et après chaque épisode. D. Courbe I-V représentant le courant enregistré (I en µA) en fonction du voltage (V en mV), n=12 ± SE (erreur standard).

Pour évaluer l'éventuelle spécificité de l'inhibition de KAT2 par CPK13, l'effet d'une seconde CPK (CPK4) a été testé sur l'activité de KAT2. L'activité de KAT2 exprimé seul est estimée par la valeur du courant à -145 mV (100 %, Figure IV.3). En présence de CPK13, l'activité de KAT2 est d'environ 40 %, ce qui représente environ 60 % d'inhibition de KAT2 par CPK13. En présence de CPK4, l'activité de KAT2 est de 94 %, CPK4 n'a donc pas d'effet significatif sur le canal. Ces données montrent que KAT2 semble être une cible spécifique de CPK13.

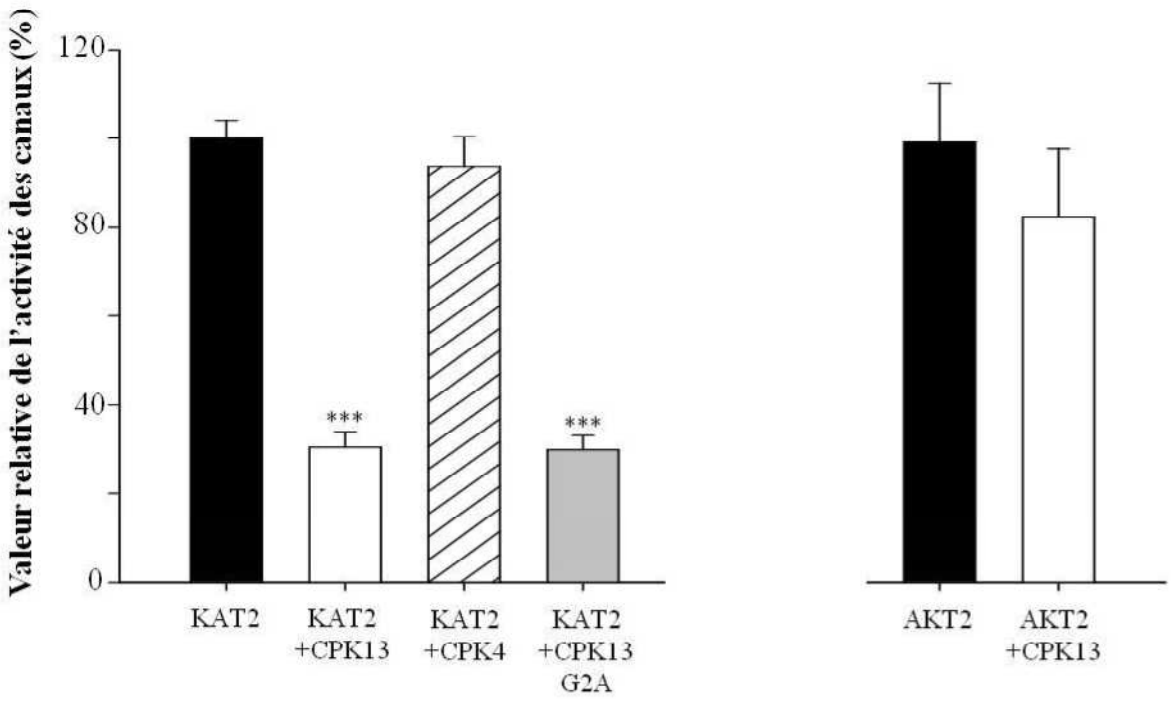


Figure IV.3: Pourcentage d'activité de KAT2 et AKT2 en présence de différentes CPKs.
Représentation des pourcentages d'activité des canaux Shaker KAT2 (n=53) (panel gauche) à -145 mV et AKT2 (n=13) (panel droite) à -140 mV en présence ou non des CPKs: KAT2+CPK13 (barre blanche, n=40), KAT2+CPK4 (barre hachurée, n=8) et KAT2+CPK13-G2A (barre grise, n=30), AKT2+CPK13 (barre blanche, n=10). n représente le nombre d'ovocytes enregistrés avec le pourcentage d'activité enregistrée ± SE. Les analyses statistiques ont été faites avec des t-test 'Student', $p \leq 0.001$ avec ***.

L'effet de CPK13 a aussi été testé sur un second canal de type entrant exprimé dans la cellule de garde : AKT2. L'activité de ce canal, d'après la littérature, est augmentée en présence du couple CBL4-CIPK6 en ovocyte de xénope (Held et al., 2011).

Cependant, le courant potassique d'AKT2 à -140 mV (probabilité de l'état ouvert maximale) est identique en présence ou en absence de CPK13 : cette kinase n'entraîne aucune inhibition sur l'activité d'AKT2 (Figure IV.3).

L'ensemble de ces résultats indiquent que CPK13 inhibe spécifiquement les courants KAT2. Pour expliquer l'effet de CPK13 nous avons émis plusieurs hypothèses : (i) la présence d'un nombre de canaux moins important à la membrane s'explique par une réduction de l'adressage à la membrane, une durée de vie à la membrane plus courte ou une diminution de la traduction de la protéine ; (ii) une modification du seuil d'activation des canaux entrainant donc moins de courant pour un même potentiel ; (iii) une conductance unitaire réduite ; (iv) ou bien une probabilité de l'état ouvert plus faible (temps moyen d'ouverture plus court).

L'hypothèse (i) peut être la résultante de multiples causes et n'est pas facile à éclaircir. Des analyses en spectrométrie de masse sur ovocytes pourraient être utiles pour quantifier le nombre de

canaux à la membrane. Des approches utilisant des tags fluorescents fusionnés aux parties N-terminal ou C-terminal du canal peuvent être envisagées en s'assurant que le tag n'entraîne ni de problème d'adresse à la membrane ni de problème d'activité du canal. Néanmoins, si l'adressage de KAT2 à la membrane est affecté par CPK13, il peut résulter d'un état de phosphorylation du canal KAT2 provoqué par la kinase. Nous avons donc essayé de générer un mutant CPK13 dépourvu d'activité kinase, mais comme expliqué dans la partie III.4, les mutations réalisées n'ont pas permis de supprimer l'activité kinase de cette protéine. Il n'a pas pu être vérifié en ovocyte, que la régulation de KAT2 par CPK13 passait par une phosphorylation du canal. Cependant, d'après la littérature, la protéine CPK13 est myristoylée, ce qui lui permet de s'ancrer à la membrane. Un mutant de CPK13 non myristoylable a été construit comme décrit par Benetka et ses collègues (Benetka et al., 2008). Pour ce faire, le résidu Glycine en position 2 (site d'accroche de l'acide myristique) a été substitué en Alanine, d'où le nom CPK13-G2A. Une fois généré, ce mutant CPK13-G2A a été testé en co-injection avec KAT2 toujours en ovocyte de xénope. L'effet de CPK13-G2A sur l'activité de KAT2 en voltage-clamp a pu être testé. Les résultats sont présentés dans la figure IV.4 (panel gauche). L'inhibition du courant potassique de KAT2 en présence de CPK13-G2A est maintenue. Le pourcentage d'inhibition de KAT2 est identique à celui obtenu avec CPK13 sauvage. A partir de ces résultats, il est possible de conclure que CPK13 n'a pas besoin d'être ancrée à la membrane pour cibler KAT2. Une interaction transitoire entre les deux est peut être suffisante pour que KAT2 soit régulé par CPK13.

L'hypothèse (ii) peut être traitée avec l'étude des courants de queue reflétant les courants de désactivation. A partir de ces courants de queue enregistrés (pour les ovocytes KAT2 et KAT2+CPK13) jusqu'à un potentiel de -160 mV, une extrapolation de ces courants jusqu'à -250 mV est possible grâce à l'équation de Boltzmann. Les deux courbes présentées en figure IV.4 représentent l'ajustement moyen des points expérimentaux par l'équation de Boltzmann.

$$I = I_{max} \frac{1}{1 + e^{\frac{zF(E - Ea50)}{RT}}}$$

A partir de ces courbes, il est possible de déterminer les paramètres d'activation des canaux : z (la pente de la courbe correspondant à la charge apparente de gating) et Ea50 (potentiel pour lequel il y a 50 % de canaux activés ou potentiel de demi-activation). Un troisième paramètre, Imax (correspond à la valeur initiale du courant de désactivation après une activation "totale" des canaux, i.e. pour une hyperpolarisation très grande) est obtenu avec ces courbes. Les deux paramètres de "gating", z et Ea50 que l'on calcule en modélisant la dépendance au potentiel du courant de désactivation ne sont pas significativement différents dans les deux situations. Surtout, si on calcule ces paramètres z et Ea50 pour les deux jeux de données mises ensemble, la qualité de l'ajustement

de la courbe (ajustement aux données expérimentales, par la méthode des "moindres carrés", des paramètres z et Ea50 d'une équation de Boltzmann) reste aussi bonne que pour des ajustements séparés de ces deux jeux de données (Tab. VI.1). Avec l'analyse de ces deux courbes (KAT2 et KAT2+CPK13), les paramètres z sont respectivement de 2,2 et 2,4 et les paramètres Ea50 sont respectivement de -166 et -159 mV (Voir tableau VI.1).

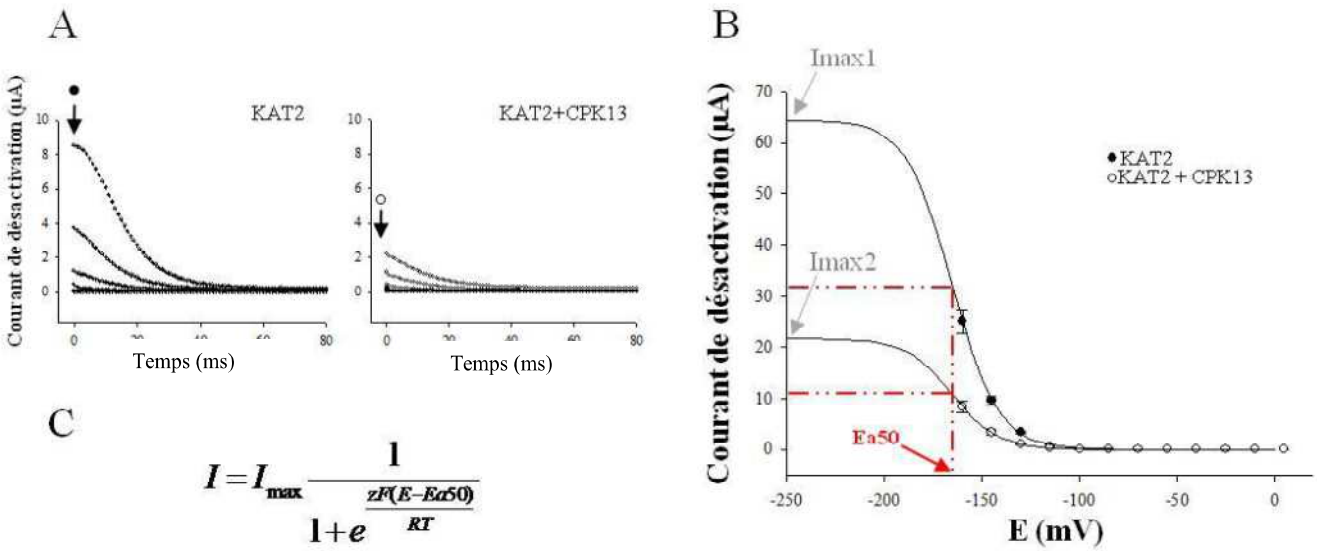


Figure IV.4 : Enregistrements et extrapolation des courants de désactivation des canaux KAT2 en réponse aux potentiels.
A. Exemple de courants de queues obtenus sur ovocytes exprimant KAT2 seul (haut) ou avec CPK13 (bas). B. Courants de désactivation des canaux KAT2 enregistrés en fonction du potentiel des membranes allant de 0 à -160 mV. Ces résultats permettent, grâce à l'équation de Boltzmann (C), d'extrapoler les courants allant de -160 mV à -250 mV et d'en déduire les paramètres : Imax correspond à la valeur initiale du courant de désactivation après une activation "totale" des canaux, i.e. pour une hyperpolarisation très grande, z (pente de la courbe, charge apparente de « gating ») et Ea50 (schématisé en rouge, potentiel de demi-activation des canaux

Tableau IV.1 : Paramètres électrophysiologiques des canaux KAT2 en présence de CPK13.
Les paramètres Imax (courant maximal à -250 mV), z (pente de la courbe, charge apparente de « gating ») et Ea50 (potentiel de demi-activation des canaux) sont montrés dans ce tableau, ils sont calculé pour chaque ajustement. Les valeurs des erreurs standard de chaque ajustement sont également présentées dans ce tableau.

	Ajustement courbe KAT2	Ajustement courbe KAT2 + CPK13	Ajustement commun KAT2 et KAT2+CPK13
z	2.164	2.434	2.188
Ea50	-166 mV	-159 mV	-165 mV
Imax	67.078	16.110	64.3939 (KAT2) et 21.6447 (KAT2+CPK13)
Erreur standard de l'ajustement	0.119	0.033	0.169

Les paramètres "voltage-gating", z et Ea50, sont similaires pour les deux courbes, seul les Imax sont différents indiquant seulement qu'un nombre différent de canaux fonctionnels sont présents dans les deux situations (avec et sans la kinase). Ces données permettent de dire que les deux courbes se superposent et donc que le seuil d'activation des canaux KAT2 en présence ou en absence de CPK13 est inchangé. Dans les deux cas (avec ou sans CPK13), les canaux K^+ KAT2 commencent à s'activer à un potentiel de -100 mV. Cela suggère que le mécanisme de « voltage-gating » du canal KAT2 n'est pas altéré. L'hypothèse la plus simple est donc que les canaux phosphorylés par CPK13 sont bloqués dans leur ouverture ou dans leur conduction et ne participent plus au courant. Ceux qui, à chaque instant, ne sont pas phosphorylés par CPK13 fonctionnent comme ceux exprimés sans la kinase.

Les hypothèses (iii) et (iv) nécessitent des enregistrements en mode canal unitaire (single-channel recording) sur les ovocytes qui n'ont pas été réalisés au cours de ma thèse.

L'ensemble de ces données suggère un effet inhibiteur spécifique de l'activité de KAT2 par CPK13. L'adressage de CPK13 à la membrane n'est pas requis pour cette inhibition, l'hypothèse semblant être la plus adaptée et qu'il convient d'étudier est celle d'une phosphorylation de KAT2 par CPK13 entraînant une inhibition de l'activité du canal.

IV.2 Caractérisation de l'activité kinase de CPK13

Dans le chapitre III de ce manuscrit, la protéine recombinante CPK13 a été produite et purifiée et sa fonctionnalité (activité kinase) a été étudiée. Il a été observé que cette activité kinase est indépendante du calcium. Le second paramètre connu pour réguler les CPKs est le pH. Ici, l'activité kinase de CPK13 a été testée en fonction du pH et avec ou sans Ca^{2+}. Les résultats sont présentés dans la figure IV.5. Il est mis en évidence que l'activité de CPK13, quel que soit le pH (entre 6,5 et 8,5), est indépendante du Ca^{2+} puisqu'il n'y a pas de différence significative avec ou sans Ca^{2+}, confirmant les observations précédentes (§III.4) et celles déjà publiées (Kanchiswamy et al. 2010 ; Boudsocq et al., 2012). Cette kinase apparaît également peu sensible au pH (dans la gamme testée) ce qui confirme et renforce son caractère atypique.

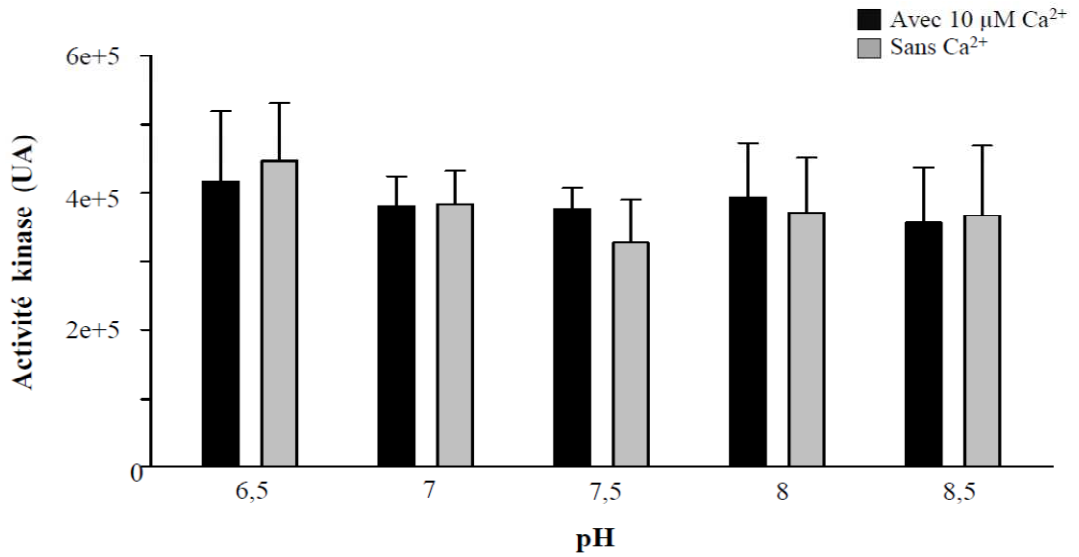


Figure IV.5: Activité kinase de CPK13 en fonction du pH et du Ca^{2+}.
L'activité de CPK13 est mesurée par dosage de l'ATP consommé (Kinase Glo® Luminescent kinase Assays, Promega) en utilisant comme peptide cible la Syntide-2, en présence de 25 µM d'ATP. L'activité kinase de CPK13 est mesurée en fonction du pH (6,5; 7; 7,5; 8 et 8,5) en présence de 10 µM de Ca^{2+} libre (barres noires) ou en absence de Ca^{2+} (barres grises).

IV.3 Phosphorylation in vitro de KAT2 par CPK13

Les puces à peptides peuvent, dans un premier temps, de montrer que CPK13 est capable de phosphoryler des peptides issus de KAT2 et dans un second temps, identifier le ou les résidus de KAT2 pouvant être mis en jeu dans la régulation de l'activité du canal via CPK13. Comme expliqué dans la partie III.5, la puce est composée de peptides de 15 à 18 acides aminés couvrant la totalité des Sérines (Ser) et des Thréonines (Thr) de la séquence de KAT2. Dans certains cas, les peptides contiennent plusieurs résidus Ser/Thr. Des peptides mutants dans lesquels l'un des résidus Ser/Thr est substitué par une Alanine (Ala) ont été synthétisés (un exemple est présenté dans la figure IV.6A côté gauche, peptides de coordonnées I2 et I3). Cette autoradiographie a été scannée et analysée par le logiciel Image J. L'intensité lumineuse de chaque spot est censée représenter le niveau de phosphorylation du peptide correspondant. Un grand nombre de peptides radio-marqués (spots lumineux) sont observables en parallèle du côté gauche et du côté droit de la lame : ces signaux sont donc considérés comme significatifs puisque dupliqués. A l'inverse, quelques spots ne sont marqués que d'un seul côté de la puce : par exemple le spot de coordonnée G12 et G13 (tâche), fortement marqué du côté gauche de la puce mais non marqué du côté droit. Il ne s'agit donc pas d'un peptide phosphorylé significativement, mais d'un signal faussement positif. Une situation identique est retrouvée à la position J17 marquée du côté droit de la puce et non sur le côté gauche de celle-ci (Figure IV.6A). De tels signaux faussement positifs sont écartés de la liste des peptides considérés comme des cibles de la CPK13.

À l'aide du logiciel Image J, le signal lumineux de chaque spot est quantifié. La phosphorylation des peptides correspondant à KAT2 (153 peptides listés en annexe 2) a été évaluée ainsi que celle correspondante à AKT2 (116 peptides listés en annexe 2) : ces quantifications sont présentées dans les figures IV.6B et IV.6C, respectivement.

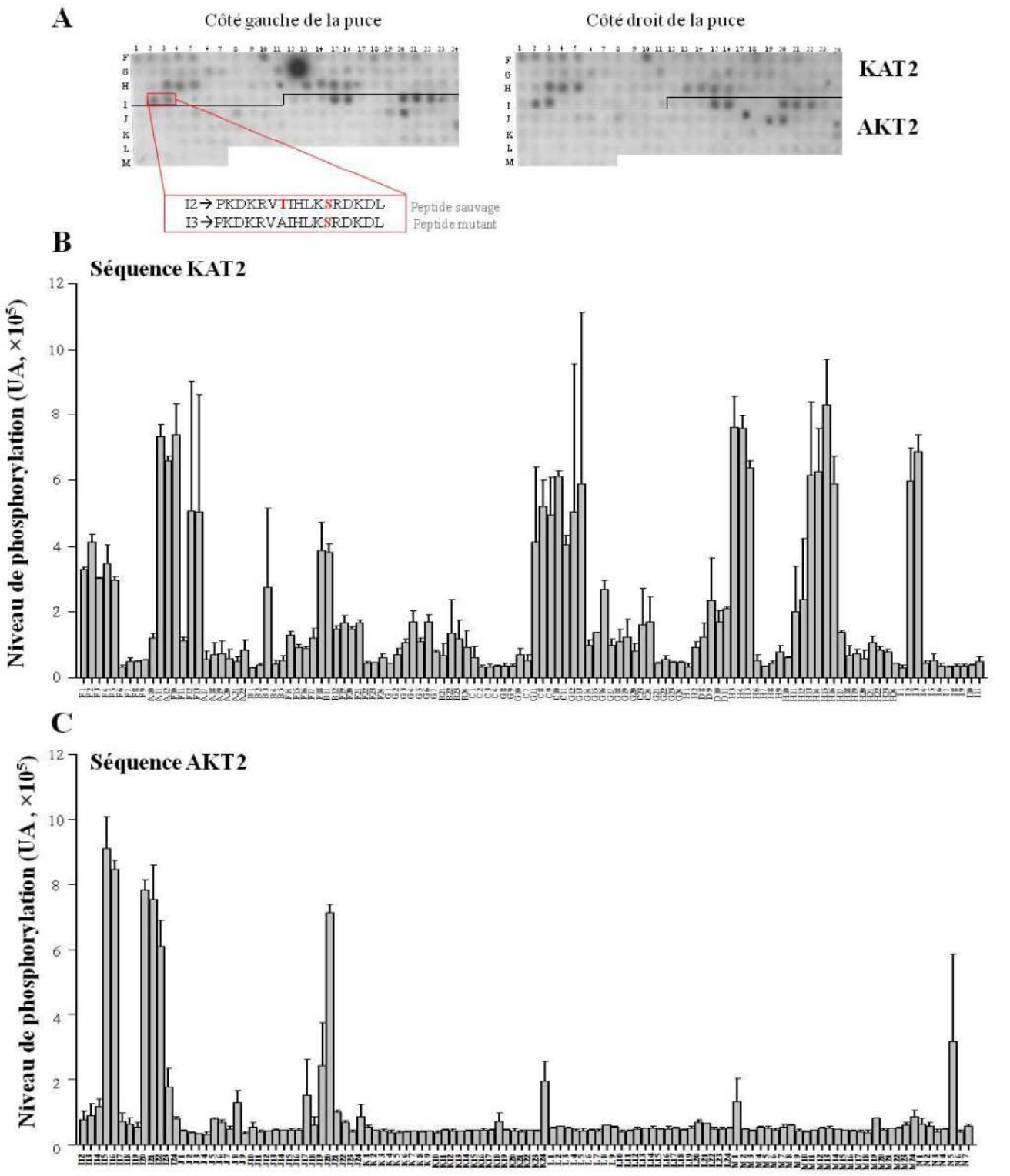


Figure IV.6: Analyse des puces à peptide réalisées avec CPK13 recombinante.
A. Autoradiographie de la puce à peptides réalisée avec CPK13 recombinante. B. Quantification de la phosphorylation de chaque peptide WT et mutés correspondant à la séquence entière de KAT2 de gauche à droite correspondant aux séquences de la partie N-ter à C-ter de la protéine. (C) Quantification de la phosphorylation de chaque peptide WT et mutés correspondant à la séquence entière de AKT2 de gauche à droite correspondant aux séquences de la partie N-ter à C-ter de la protéine

(i) Analyse des peptides de KAT2

Nous observons que beaucoup de peptides de KAT2 semblent être phosphorylés de manière significative par CPK13. En effet, 38 peptides de KAT2 sont phosphorylés, ils comprennent : 7 peptides sauvages communs à KAT1 et KAT2 (plus 10 peptides mutants) et 11 peptides sauvages appartenant uniquement à KAT2 (et 10 mutants). Deux critères ont été définis pour sélectionner, parmi ces 18 peptides sauvages, ceux susceptibles d'être impliqués dans la régulation fonctionnelle de KAT2 par CPK13. Ces critères sont les suivants : (i) le niveau de phosphorylation déterminé doit être bien au-dessus du bruit de fond (à la fois du côté gauche et du côté droit), et (ii) la position prédite dans la structure du canal KAT2 (sont exclus les peptides dont les résidus Ser/Thr supposément phosphorylés se trouveraient dans la partie extracellulaire. Sur ces critères, 11 peptides de KAT2 phosphorylés par CPK13 ont été retenus pour poursuivre l'analyse. Ces 11 peptides sont listés dans le tableau IV.1. Dans la majorité des cas (excepté pour le peptide B11), les peptides mutants n'ont pas permis de déterminer le résidu phosphorylé puisque les mutations réalisées n'induisent pas de diminution significative du signal. Pour le peptide B11 contenant les résidus S190/S191, la mutation S190A entraîne une diminution de la moitié du signal de phoshorylation. Le résidu S190 fait donc partie du site de phosphorylation du peptide B11 ciblé par CPK13. En résumé, avec cette puce, nous avons mis en évidence 20 résidus Ser/Thr (14 Sérines et 6 Thréonines) de KAT2 potentiellement phosphorylés par CPK13 : S13 ; S15 ; T17 ; S55 ; T56 ; S64 ; S179 ; S190 ; S191 ; T314 ; S315 ; T317 ; T354 ; S482 ; S485 ; S564 ; T565 ; S570 ; S573 ; T642 et S647.

Tableaux IV.1 : Analyse des peptides phosphorylés de KAT2 et d'AKT2 pour déterminer les résidus cibles de CPK13. Les tableaux regroupent les séquences des peptides phosphorylés de KAT2 et d'AKT2, les numéros des peptides, le nom des peptides, le nom du Shaker auquel le peptide appartient, la position du peptide sur la puce, les quantifications du côté gauche et droit de la puce, la moyenne des deux quantifications et les résidus cibles après analyse des peptides mutants. Les lettres inscrites en rouge sont les résidus S ou T potentiellement phosphorylables.

Séquence peptidique	N°	Peptide sauvage ou muté	Shaker	Position sur puce	Quantification (gauche)	Quantification (droit)	Moyenne
RPMSISCTRNFFKRFC	38	Sauvage S13/S15/T17	KAT2	F 3	300996	306703	303850
RPMAISCTRNFFKRFC	39	A13/S15/T17	KAT2	F 4	295166	404832	349999
RPMSIACTRNFFKRFC	40	S13/A15/T17	KAT2	F 5	288748	308146	298447
FKHSSFLSADLLP	43	Sauvage S55/S56	KAT2	F 7	38326	63282	50804
FKHASFLSADLLP	44	A55/S56	KAT2	F 8	51339	48429	49884
FKHSAFLSADLLP	45	S55/A56	KAT2	F 9	58082	49998	54040
KLRKHIISPFDPRFRG	48	Sauvage S64	KAT2	F10	834032	646842	740437
EIGFRVLSMLRLWRLRRV	67	Sauvage S179	KAT2	F18	300974	473610	387292
RLWRLRRVSSLFARLEKD	68	Sauvage S190/S191	KAT1/KAT2	B11	408476	356829	382652.5
RLWRLRRVASLFARLEKD	69	A190/S191	KAT1/KAT2	B12	138155	160570	149362.5
NLVVHWTSRTRNFRD	95	Sauvage T314/S315/T317	KAT2	G11	640907	184960	412933.5
NLVVHWASRTRTFRD	96	A314/S315/T317	KAT1/KAT2	C 9	384682	608020	496351
NLVVHWTARTRTFRD	97	T314/A315/T317	KAT1/KAT2	C10	628953	595124	612038.5
HICLKFKTEGLKQQEAL	104	Sauvage T354	KAT2	G16	239666	297747	268706.5
QILRISKKSLMSAMKAHV	121	Sauvage S482/S485	KAT2	H 3	856339	670816	763577.5
QILRIAKKSLMSAMRAHV	122	A482/S485	KAT2	H 4	798725	719698	759211.5
QILRISKKALMSAMRAHV	123	S482/A485	KAT2	H 5	660266	615791	638028.5
NIDMGSTEWRDSRKSGYG	132	Sauvage S564/T565/S570/S573	KAT2	H13	840609	392307	616458
NIDMGATEWRDSRKSGYG	133	A564/T565/S570/S573	KAT2	H14	759944	497401	628673
NIDMGSAEWRDSRKSGYG	133	S564/A565/S570/S573	KAT2	H15	969384	694536	831960
NIDMGSTEWRDARKSGYG	134	S564/T565/A570/S573	KAT2	H16	674172	502766	588469
PKDKRVTIHLKSRDKDL	144	Sauvage T642/S647	KAT2	I 2	699101	494860	596980.5
PKDKRVAIHLKSRDKDL	145	A642/S647	KAT2	I 3	740566	632871	686718.5

Séquence peptidique	n°	Peptide sauvage ou muté	Shaker	Position sur puce	Quantification (gauche)	Quantification (droit)	Moyenne
HCNLSSDMKLRRFHQHRG	4	Sauvage S13/S14	AKT2	I15	1009057	814683	911870
HCNLASDMKLRRFHQHRG	5	A13/S14	AKT2	I16	875415	819118	847267
LNNLSKLILPPLGVA	9	Sauvage S45	AKT2	I20	813211	752393	782802
KLILPPLGVASYNQNHIR	10	Sauvage S56/S57	AKT2	I21	859577	651414	755496
KLILPPLGVAAYNQNHIR	11	A56/S57	AKT2	I22	690189	528704	609447
RLRRVKHLFTRLEKDIR	33	Sauvage T201	AKT2	J20	739376	687989	713683
RLEKDIRYSYFWIRCFRL	34	Sauvage S210	AKT2	J21	95191	107328	101260
RLEKDIRYAYFWIRCFRL	35	A210	AKT2	J22	73807	59416	66612

(ii) Analyse des peptides d'AKT2

L'analyse de l'autoradiographie réalisée avec le logiciel Image J est présentée dans la figure IV.6C, nous permet de montrer que seulement 5 peptides d'AKT2 sont phosphorylés par CPK13. Ces peptides regroupent 7 résidus Ser/Thr (6 Sérines et 1 Thréonine) : S13 ; S14 ; S45 ; S56 ; S57 ; S210 et T201 (Tableau IV.1). Ces résidus sont majoritairement placés dans la région N-terminale cytoplasmique du canal. En conclusion de cette partie, CPK13 est capable de phosphoryler de nombreux résidus appartenant à la séquence de KAT2 comprenant des résidus placés en région N-terminale, dans le segment S4 et en région C-terminale de la protéine. La phosphorylation in vitro, met en évidence également que CPK13 phosphoryle 7 résidus appartenant à AKT2, rappelons que ce dernier n'est pas régulé par CPK13 en système hétérologue. Le résultat est schématisé dans la figure IV.7. Ces résultats appellent les remarques suivantes : (i) la phosphorylation est réalisée in vitro, un nombre aussi faible de résidus phosphorylés pour AKT2 pourrait refléter des résultats faussement positifs. Rappelons qu'AKT2 ne semble pas affecté dans son fonctionnement par la CPK13. En particulier, les résidus d'AKT2 S210 (peptide J21) et S329 (peptide L2), dont la phosphorylation contrôle le mode de "gating" de ce canal (Michard et al. 2005) ne sont pas phosphorylés par CPK13. Ceci indique que CPK13 n'est pas la Ser/Thr kinase (de nature moléculaire encore inconnue) responsable du contrôle du « gating » d'AKT2 dont l'existence est postulée par Michard et al. (Michard et al., 2005) ; (ii) l'homologie entre la partie N-ter de KAT2 et celle d'AKT2 est plus importante que l'homologie entre les deux parties C-terminales. CPK13 phosphoryle AKT2 uniquement dans la région N-terminale et semble sans effet sur ce canal. L'hypothèse que le site phosphorylé par CPK13 chez KAT2, responsable de l'inhibition du canal, serait plutôt à rechercher dans la région C-terminale de celui-ci.

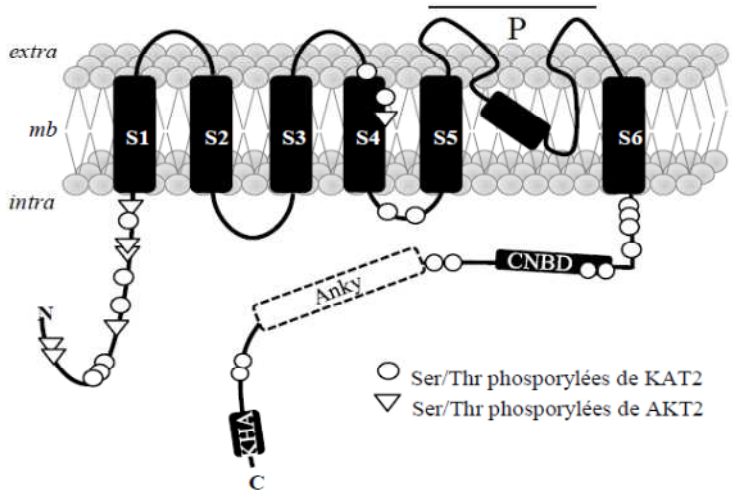


Figure IV.7: Représentation schématique d'un canal potassique de type Shaker présentant les sites de phosphorylation des canaux KAT2 et AKT2 par la protéine kinase CPK13.
Le schéma représente une sous-unité Shaker potassique avec une partie N-terminale cytosolique, 6 domaines transmembranaires (S1-S6), une région P (formant le pore du canal) entre S5 et S6 et une grande partie C-terminale contenant un site de liaison des nucléotides (CNDB), une répétition de domaines Ankyrine pour AKT2 (Anky) et un domaine KHA qui est impliqué dans la clusterisation des canaux. Les résidus Sérines/Thréonines phosphorylés par CPK13 appartenant à KAT2 sont schématisés avec un cercle vide, ou à AKT2 par un triangle.

IV.4 Effet de CPK13 sur l'activité des mutants KAT2 en voltage clamp

A partir des résultats obtenus avec les puces à peptides et afin de déterminer les résidus de KAT2 impliqués dans sa régulation par CPK13, plusieurs mutants de KAT2 ont été obtenus pour être testés en système hétérologue. A partir des résidus potentiellement phosphorylés présentés dans le tableau IV.1, 11 mutants de KAT2 ont été obtenus. Les Sérines et les Thréonines ont été substituées en Alanine (acide-aminé non phosphorylable). Ces 11 mutants de KAT2 sont présentés dans le tableau IV.2 : 4 mutants simples (S64A ; S179A ; S354A et S647A), 5 mutants doubles (S55A/S56A ; S190A/S191A ; S482A/S485A ; S564A/T565A et S570A/S573A) et enfin deux mutants triples (S13A/S15A/T17A et S314A/S315A/T317A).

Tableau IV.2: Présentation des 11 mutants de KAT2 testés en TEVC.
Ce tableau récapitule les mutations réalisées (Substitution des S/T en A) pour les 11 mutants de KAT2 et leur caractérisation en voltage clamp.

Mutant	Mutations	Caractéristique en voltage-clamp
1	S13A/S15A/T17A	Canal fonctionnel
2	S55A/S56A	Canal fonctionnel
3	S64A	Canal fonctionnel
4	S179A	Canal fonctionnel
5	S190A/S191A	Canal fonctionnel
6	S314AS315/T317A	Canal non fonctionnel
7	S354A	Pas d'ARNc
8	S482A/S485A	Canal fonctionnel
9	S564A/S565A	Canal fonctionnel
10	S570A/S573A	Canal fonctionnel
11	S647A	Canal fonctionnel

Les mutations ponctuelles de KAT2 ont directement été réalisées sur le plasmide pGEM-GWC-KAT2, ce qui a permis de synthétiser les ARNc de chaque mutant et de tester ces derniers en voltage clamp, en présence ou en absence de CPK13. Seul le mutant S354A n'a pas été obtenu à une concentration d'ARNc suffisante pour pouvoir l'injecter en ovocyte.

Ces 10 mutants ont été testés en ovocytes de xénope en les co-injectant avec ou sans CPK13 et les courants potassiques de ces derniers ont été enregistrés avec le même protocole de voltage clamp présenté dans la figure IV.2C. Ces résultats sont comparés avec les résultats obtenus pour KAT2 sauvage + ou - CPK13. Parmi les 10 mutants, seul le triple mutant S314A/S351A/T317A engendre la formation d'un canal non fonctionnel. Pour les autres mutants de KAT2, un pourcentage d'inhibition du canal induit par CPK13 a pu être déterminé et les résultats sont présentés dans la figure IV.8.

Les pourcentages d'inhibition de CPK13 sur les différents mutants se situent entre 60 et 90 %. À ce jour, aucun des mutants testés de KAT2 ne perd l'inhibition par CPK13. Les mutations réalisées

ne sont pas suffisantes pour lever l'inhibition par la CPK13, mais peuvent être nécessaire à cette régulation. Au vu de ces résultats, l'hypothèse que la phosphorylation de plusieurs résidus et à plusieurs endroits sur la séquence de KAT2 sont nécessaires pour maintenir l'effet d'inhibition par CPK13, a été émise.

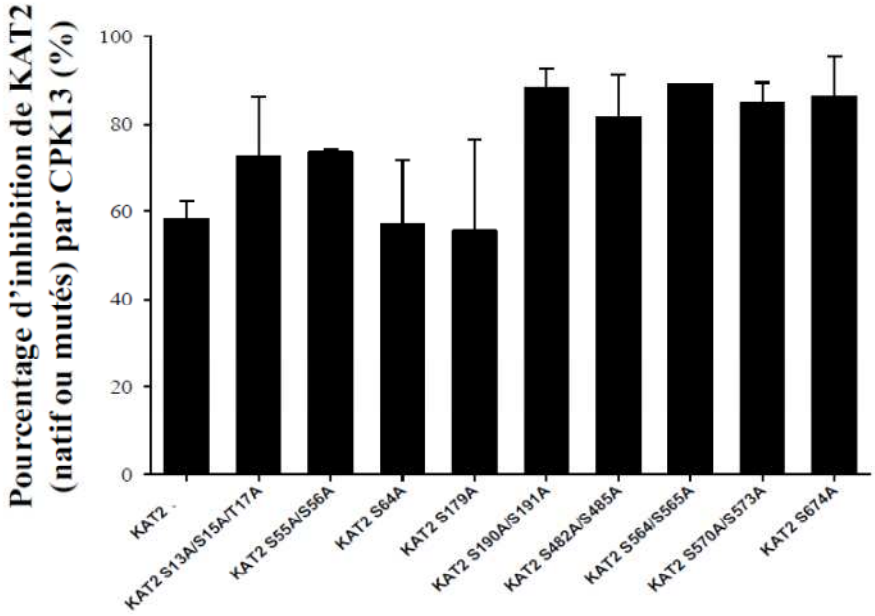


Figure IV.8 Pourcentage d'inhibition des canaux KAT2 natifs ou mutés testés en TEVC en présence de CPK13.
Le graphique représente le pourcentage d'inhibition de l'activité de KAT2 (natif ou mutés) en présence de CPK13 à un potentiel de membrane de -145 mV. Moyenne de deux expériences indépendantes avec n ≥8 ovocytes par expérience.

IV.5 Localisation et interaction de CPK13 et KAT2 in planta.

Nous avons cherché à montrer une co-localisation entre les deux protéines dans la cellule végétale. Pour ce faire, des plasmides pEarley-Gate 101 et 102 ont été utilisés et ont permis, respectivement de fusionner le gène CPK13 avec le gène YFP (Yellow Fluorescent Protein) et le gène KAT2 avec le gène CFP (Cyan Fluorescent Protein). Ces plasmides ont été utilisés pour réaliser des transformations transitoires au Polyethylene Glycol (PEG) de protoplastes de mésophiles d'A. thaliana (Figure IV.9A). Les protoplastes ont été transformés avec les plasmides p102 (KAT2-CFP) et p101 (CPK13-YFP). Après l'expression des protéines de fusion, il est observé dans la figure IV.9B que tous les protoplastes n'expriment pas les deux constructions. Certains protoplastes expriment qu'une seule des deux constructions (KAT2-CFP ou CPK13-YFP) alors que d'autres expriment les deux. Dans toutes les situations, la localisation de ces signaux fluorescents (CFP et YFP) est identique. Comme attendu, KAT2-CFP est localisée principalement à la membrane plasmique des protoplastes. CPK13-YFP semble être localisé à la membrane plasmique (Figure IV.9C). Enfin, la superposition des deux constructions KAT2-CFP et CPK13-YFP met en évidence que ces deux protéines sont co-localisées à la membrane plasmique. Ceci est visualisé par la couleur verte à la membrane plasmique. Ce résultat est en corrélation avec la littérature où CPK13 est

myristoylée et est ancrée à la membrane plasmique. De plus, ces résultats permettent de valider les constructions réalisées et de confirmer leurs co-localisations dans un système homologue (A. thaliana). Ces constructions sont ensuite utilisées pour déterminer une éventuelle interaction protéine-protéine dans des expériences de FRET-FLIM.

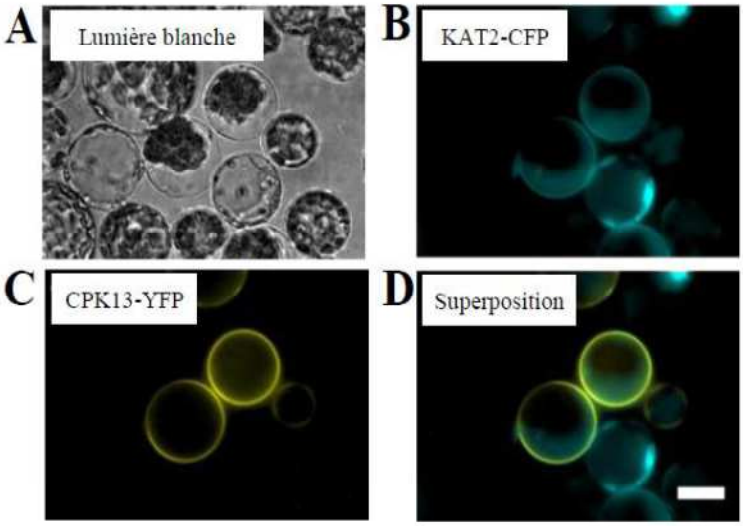


Figure IV.9: Co-localisaton de KAT2 et CPK13 dans des protoplastes de méso**phile d'**A. thialana.
Images de protoplastes de mésophiles d'Arabidopsis thaliana (A) exprimant des protéines de fusions KAT2-CFP (B) et CPK13-YFP (C). (D) Superposition des images CFP (bleu) et YFP (jaune) montrant une co-localisation des deux protéines à la membrane (vert). L'échelle correspond à 20 µm. Images prises en epifluorescence.

Pour mettre en évidence une interaction physique entre KAT2 et CPK13, les deux plasmides précédents ont été introduit dans deux souches d'Agrobacterium tumefaciens (GW3101::pMP90). Ces deux souches d'agrobacteries ont été envoyées à Christian Brière (LRSV, Toulouse). Il a dans un premier temps, vérifier la co-localisation des deux protéines dans des feuilles de Nicotiana benthamania. Il est observé in planta, comme pour les protoplastes de mésophile, que KAT2-CFP et CPK13-YFP sont co-localisés à la membrane plasmique (Figure IV.10A-D). La co-localisation de KAT2 et CPK13 est ainsi confirmée avec une autre technique d'infiltration et sur un autre modèle de plante.

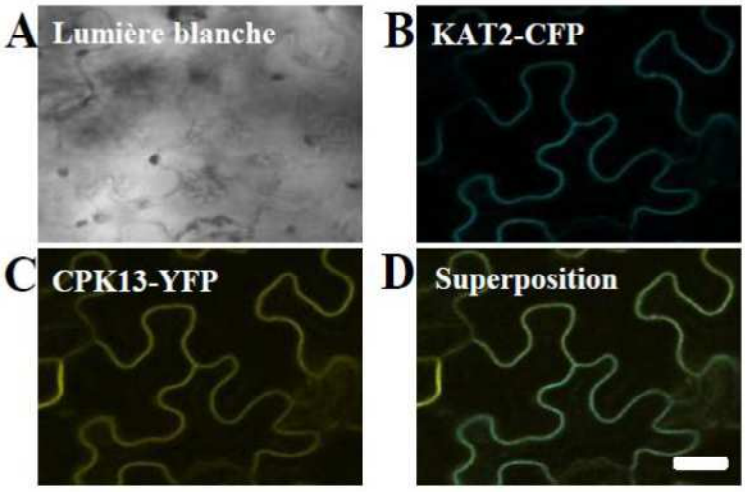


Figure IV.10: Co-localisation de KAT2 et CPK13 dans des cellules épidermiques de tabac Nicotiana benthamiana.
Images de cellules épidermique de N. benthamiana (A) exprimant des protéines de fusion KAT2-CFP (B) et CPK13-YFP (C). (D) Superposition des images CFP et YFP montrant une co-localisation des deux protéines à la membrane. L'échelle correspond à 20 µm. Images prises en microscopie confocale.

À partir de ces mêmes feuilles, des mesures de FRET-FLIM (Fluorescence Resonance Energy Transfer-Fluorescence Life-time Imaging Microscopy) ont été réalisées pour mettre en évidence une éventuelle interaction physique entre KAT2-CFP et CPK13-YFP. La technique de FRET-FLIM consiste à mesurer le temps de vie de la fluorescence (τ) de la molécule donneuse (CFP). Ce temps diminue lorsque cette dernière interagit avec une molécule accepteuse (YFP) et qu'il y a transfert d'énergie entre la molécule donneuse et la molécule accepteuse figure IV.11.

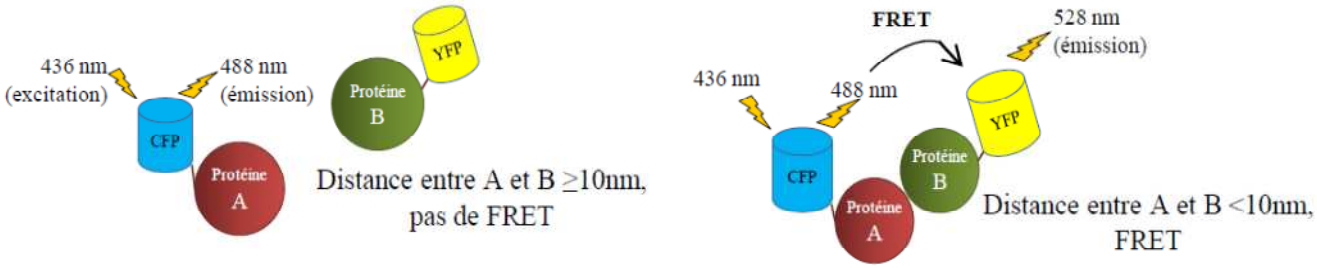
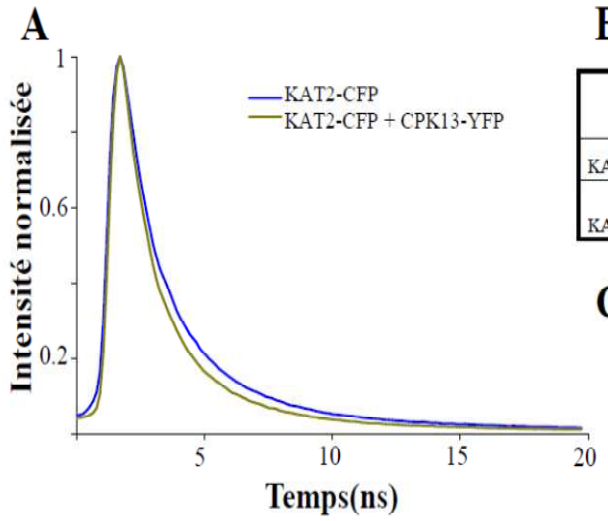


Figure IV.11 Principe du FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer).
Le FRET est un événement de transfert d'énergie non radiative entre deux molécules fluorescentes : une molécule donneuse (CFP) et une acceptrice (YFP). Cet événement est dépendant de la distance entre ses dernières. La CFP fusionnée à la protéine A est excité à 436 nm et émet des photons à 488 nm. Si cette protéine interagit avec une seconde protéine B fusionnée à l'YFP, la faible distance résultante entre la CFP et l'YFP permet alors un transfert d'énergie de la CFP vers l'YFP. Cet événement conduit à une diminution du signal émit par la CFP et à une augmentation du signal émit par l'YFP à 528 nm. Le FRET peut être mis en évidence par des mesures de FLIM (Fluorescence Life-time Imaging Microscopie) où le temps de vie de la fluorescence de la molécule donneuse CFP est mesurée dans les deux conditions (avec et sans YFP). Un phénomène de FRET est notifié par une diminution du temps de vie de fluorescence de la CFP.

Ensuite, les mesures de FRET-FLIM ont été faites sur le modèle de tabac. En effet, les mesures de la décroissance de la durée de vie de la CFP (fusionnée à KAT2) ont été réalisées lorsque KAT2-CFP est exprimée seule ou en présence de CPK13-YFP. L'interaction physique qui engendre un phénomène FRET entre la CFP et l'YFP est mise en évidence par une réduction du temps de vie de la fluorescence de la CFP. Le temps de vie de fluorescence de la CFP est mesuré, dans un premier temps, sur un tissu agro-infiltré avec la souche d'agrobacterium p102-KAT2. Dans un second temps, le temps de vie de fluorescence de la CFP est mesuré sur un tissu co-exprimant les deux protéines KAT2-CFP et CPK13-YFP. Les intensités de fluorescence normalisées sont présentées dans la figure IV.12A en fonction du temps. Dans le premier cas avec KAT2-CFP seule, un temps de vie de la CFP de 2,19 ± 0,05 ns est obtenu. Dans le second cas avec KAT2-CFP + CPK13-YFP, ce temps de vie est de 1,86 ± 0,04 ns. Il y a bien une diminution du temps de vie de la molécule donneuse. Avec ces deux valeurs, une efficacité de FRET de 14.9 % est calculée. Ces données sont présentées dans la figure IV.12B. Ces résultats tendent à montrer que KAT2-CFP et CPK13-YFP interagissent physiquement à la membrane plasmique.

À ce stade, nous avons montré que KAT2 et CPK13 co-localisent dans les cellules du mésophile chez A. thaliana mais également dans les cellules épidermiques chez N. benthamania. De façon intéressante, une interaction physique entre les deux protéines a été mise en évidence chez ce dernier.



B

	Temps de vie de la Fluorescence (τ) (ns)	Efficacité de FRET (%)	n
KAT2	2,18 ± 0,05	---	115
KAT2 +CPK13	1,86 ± 0,04	14,9	146

C

$$E = \left(\frac{\tau_{KAT2} - \tau_{KAT2+CPK13}}{\tau_{KAT2}}\right) \times 100$$

Figure IV.12: Mesure du temps de vie de la fluorescence de la CFP par la technique de FLIM.
A. Le temps de vie de la fluorescence de la CFP est mesuré dans des cellules épidermiques exprimant juste la protéine de fusion KAT2-CFP (courbe bleue) puis dans des cellules exprimant KAT2-CFP en présence de CPK13-YFP (courbe verte). B. Les temps de vie de la fluorescence (τ) de la CFP sont mesurés à partir des courbes de décroissance de la fluorescence, l'efficacité de FRET est mesurée avec l'équation présentée en C. n représente le nombre de mesures réalisées.

IV.6 Etude de l'activité du promoteur de CPK13 et de KAT2 chez Arabidopsis thaliana

Dans la littérature, des données transcriptomiques montrent que KAT2 et CPK13 sont exprimées dans les cellules de garde (Leonhardt et al., 2004). Néanmoins, le profil d'expression de CPK13 dans la plante est à ce jour inconnu.

L'activité des promoteurs de KAT2 et de CPK13 a été étudiée chez Arabidopsis thaliana à l'aide des lignées pKAT2::GUS (Pilot et al., 2001a) et pCPK13::GUS. Le gène GUS code pour une enzyme, la β-glucoronidase qui, en présence de son substrat, le 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Glucuronic acid (X-Gluc), entraine la formation d'un précipité de couleur bleu par la catalyse de son substrat. Une lignée pCPK13::GUS a été générée dans notre équipe par Fréderic Sanchez. Ce dernier a cloné le promoteur de CPK13 (fragment de 2,3 kb avant le codon start) en amont du gène GUS. Les travaux de Guillaume Pilot ont montré avec la lignée pKAT2::GUS, que KAT2 était exprimé dans les veines et dans les stomates de feuilles âgées de 4 à 5 semaines. Cette lignée a été utilisée en parallèle de la lignée pCPK13::GUS pour réaliser des colorations de GUS. Les résultats sont présentés dans la figure IV.13.

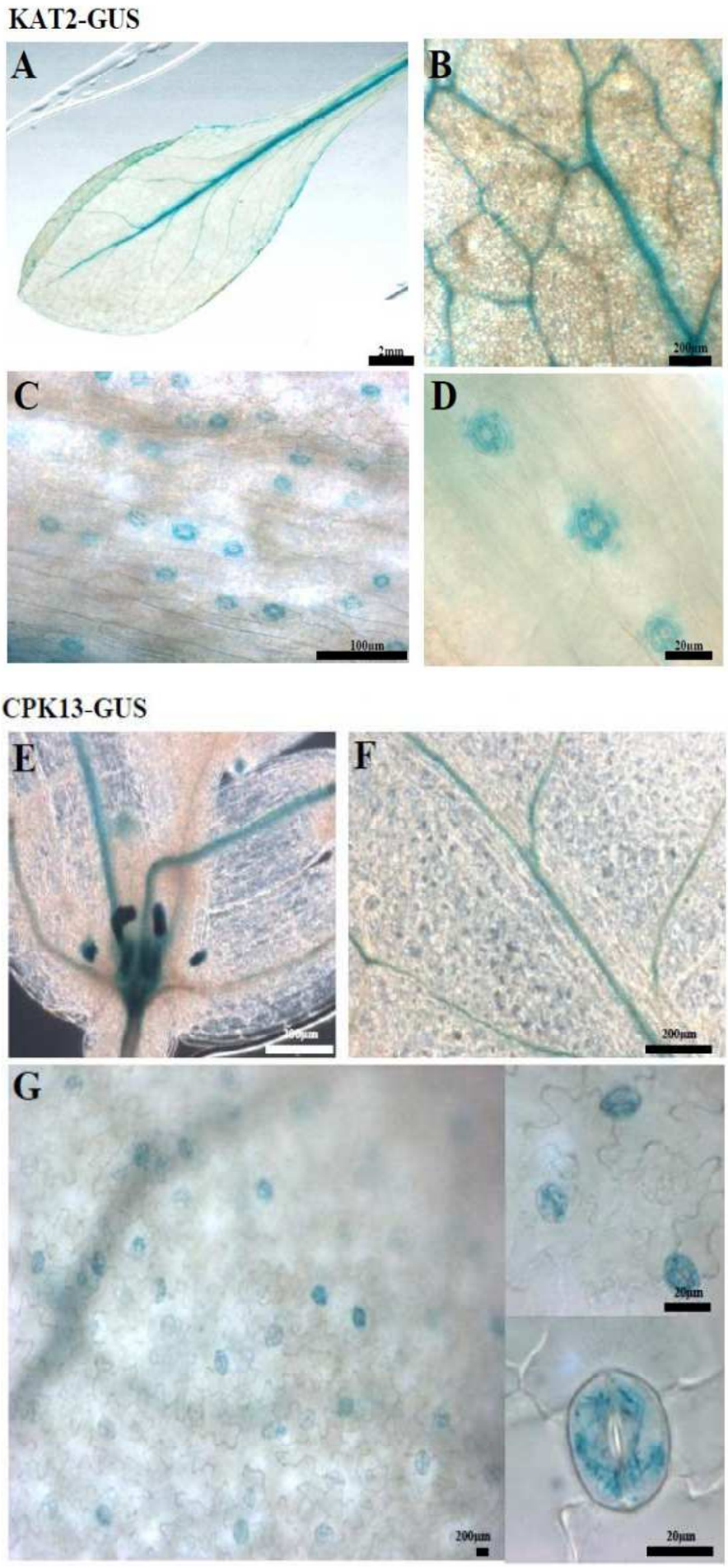


Figure IV.13: Colorations GUS avec les lignées pKAT2::GUS et pCPK13::GUS.
Les colorations sont réalisées à partir de plantes âgées de 4 à 5 semaines appartenant aux lignées pKAT2::GUS (A, B, C et D) et pCPK13::GUS (E, F et G). Coloration GUS obtenue dans les tissus vasculaires (A, B et F), dans les stomates (C, D et G) et dans les étamines (E).

Comme attendu, une forte activité du promoteur de KAT2 est retrouvée dans les tissus vasculaires des feuilles (Figures IV.13A-B) et également dans les cellules de garde (Figures IV.13C-D). Concernant l'activité du promoteur de CPK13, elle est fortement retrouvée dans les stomates (Figures IV.13G) corroborant les données publiées par Leonhardt et ses collègues (Leonhardt et al. 2004). Elle est également retrouvée dans les tissus vasculaires des feuilles (Figures IV.13F) et dans les étamines (Figures IV.13E). L'expression de CPK13 dans les stomates n'avait jamais été mise en évidence in planta. Ces résultats mettent en évidence que KAT2 et CPK13 sont exprimés dans les mêmes types cellulaires chez Arabidopsis thaliana.

D'après ce panel de données, CPK13 est co-exprimée dans la cellule de garde avec le canal potassique KAT2. Il a été montré que CPK13 inhibe, en système hétérologue, à 60 % l'activité de ce canal impliqué dans l'ouverture stomatique. Il a été fait l'hypothèse que CPK13 peut-être un régulateur négatif de l'ouverture stomatique à travers l'inhibition de KAT2. Pour mettre en évidence le rôle de CPK13 dans cette régulation négative de l'ouverture stomatique, il a été généré des lignées sur-exprimant CPK13.

IV.7 La surexpression de CPK13 induit un défaut d'ouverture stomatique

IV.7.1 Caractérisation des lignées sur-exprimant CPK13

Une lignée sur-exprimant CPK13 a été générée. Après génotypage, deux lignées homozygotes différentes ox#3 et ox#4 ont été obtenues. Fréderic Sanchez a réalisé une PCR quantitative sur 3 génotypes différents WT (Lignée sauvage Col-0), ox#4 et ox#3 afin de s'assurer du niveau d'expression de CPK13 dans chaque génotype.

Les deux lignées ox#4 et ox#3 sur-expriment CPK13 à des niveaux différents. Le taux de transcrit de CPK13 est 1,3 fois pour ox#4 et 2 fois pour ox#3 plus important que le taux de transcrit de CPK13 chez la lignée WT. Les résultats sont présentés en figure IV.14.

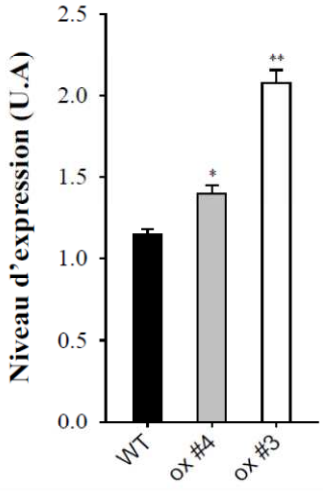


Figure IV.14: Evaluation du taux de transcrits de CPK13 pour les lignées WT, ox #4 et ox #3 par PCR quantitative.
La qPCR est réalisée à partir de plantules âgées de 15 jours (n=45 plantules par génotype). Le niveau d'expression de CPK13 est normalisé par rapport au niveau d'expression d'un gène de ménage (tubuline-4). Les tests statistiques ont été réalisés avec des t-test 'Student', ** avec $p \leq 0.01$ et * avec $p \leq 0.05$.

IV.7.2 CPK13 induit un défaut dans l'ouverture stomatique

(i) Mesures d'ouverture stomatique à partir d'épidermes pelés.

Pour ce faire, dans un premier temps, les ouvertures stomatiques (diamètres des ostioles) ont été mesurées pour les 3 lignées (WT, ox#4 et ox#3) en réponse à la lumière blanche. Dans un second temps, sur ces mêmes épidermes pelés, nous avons étudié l'induction de la fermeture stomatique par de l'ABA (Acide Abscissique). Les résultats sont présentés en figure IV.15.

Il est noté d'après la figure IV.15A que les deux lignées ox-CPK13 ont un défaut d'ouverture stomatique en réponse à la lumière dès 30 min d'exposition comparé à la lignée WT. La différence est d'autant plus importante, que l'exposition à la lumière est longue. Après 180 minutes d'exposition, les mesures moyennes d'ouvertures stomatiques sont respectivement de 2,12 µm ; 1,69 µm et 1.31 µm pour WT, ox #4 et ox #3. De façon intéressante, la capacité d'ouverture stomatique en réponse à la lumière blanche, est corrélée avec le niveau d'expression de CPK13. Plus l'expression de CPK13 est forte, plus l'ouverture des stomates en réponse à la lumière est inhibée.

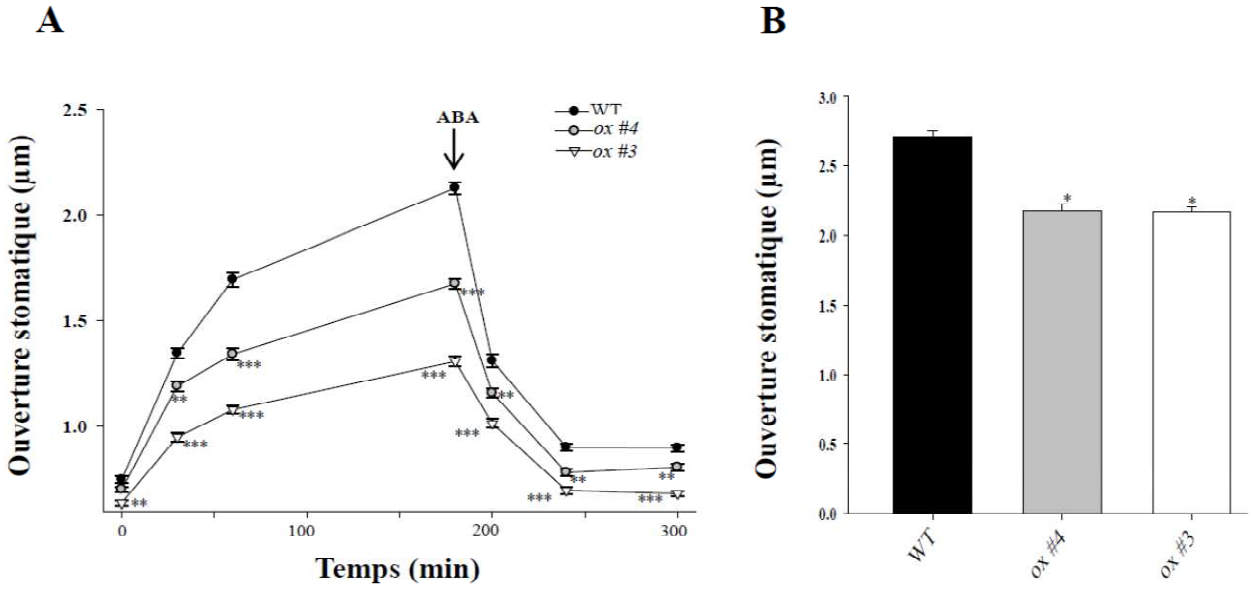


Figure IV.15: Cinétique d'ouverture stomatique induit par la lumière et la fusicoccine
A. Cinétiques d'ouverture stomatique en réponse à la lumière mesurées à partir d'épidermes pelés de plantes âgées de 4 semaines. L'induction de la fermeture stomatique a été faite par un traitement de 10 µM d'ABA. L'ouverture stomatique a été mesurée à t0, t30 min, t60 min et t180 min puis les épidermes ont été traités avec de l'ABA pendant 2 h. B Induction de l'ouverture stomatique à l'aide de 10 µM de fusicoccine après 180 minutes de traitement. Les tests statistiques ont été réalisés avec des t-test 'Student', *** avec p≤0,001 ; ** avec p≤0,01 et * avec p≤0,05.

Il est noté a contrario, que les 3 lignées répondent de façon semblable dans le cas de la fermeture induite par l'ABA. Les stomates se ferment, chez les 3 lignées, après l'application du traitement.

Les différences notées entre les valeurs des 3 lignées peuvent s'expliquer par les différences des niveaux d'ouverture stomatique, dû à un niveau d'ouverture différent, à 180 min, entre les lignées. Pour pouvoir les comparer de façon plus précise, il faut avoir suffisamment de données expérimentales pour ajuster la courbe de fermeture à une courbe de décroissance et y extraire les constantes de temps. Des constantes de temps voisines ou identiques nous permettraient de dire que l'induction de la fermeture stomatique par l'ABA n'est pas différente entre les trois lignées.

Dans cette partie, il est mis en évidence que les lignées sur-exprimant CPK13 possèdent un défaut dans l'ouverture stomatique en réponse à la lumière mais ne semble pas posséder de défauts dans la fermeture stomatique en réponse à l'ABA. Ces données montrent que l'ouverture et la fermeture stomatiques sont régulées par deux mécanismes indépendants. Il est intéressant de noter que ces résultats corroborent avec les données publiés par le groupe d'Assmann (Wang et al., 2001). Il est montré, pour une lignée mutante (gpa-1), une altération de l'inhibition de l'ouverture stomatique en réponse à l'ABA mais l'induction de la fermeture stomatique par l'ABA est tout de même maintenue. Ils mettent donc en évidence, pour l'ouverture et la fermeture stomatique, l'existence de deux mécanismes indépendants (Wang et al., 2001). D'après nos résultats, le mécanisme d'ouverture stomatique pour les trois lignées a été forcé en utilisant la fusicoccine qui active la pompe H^+/ATPase (avec modification du pH) et entraine une hyperpolarisation de la membrane (Assmann and Schwartz, 1992). Les ouvertures stomatiques ont été mesurées après 180 min d'exposition à la lumière en présence de fusicoccine. Le résultat est présenté en figure IV.15B. De façon intéressante, l'ouverture stomatique de la lignée WT après 180 min, est de 2,75 µm contre 2,17 µm pour ox#4 et 2,16 µm pour ox#3. De manière générale, les 2 lignées sur-exprimant CPK13 ne possèdent pas, après un traitement à la fusicoccine, une valeur d'ouverture stomatique aussi importante que le WT. Ces données confirment que CPK13 joue un rôle important dans la régulation négative d'ouverture stomatique mais surtout que cette régulation est indépendante du pH.

IV.7.3 Mesure de conductance stomatique sur plantes entières à l'aide d'un poromètre

Les conductances stomatiques d'une lignée sur-exprimant CPK13 et d'une lignée sauvage ont été mesurées sur plantes entière à l'aide d'un poromètre au cours d'une journée (8h d'éclairage/16 heures d'obscurité) (Figure IV.16). De manière générale, une plus faible conductance stomatique peut être observée pour la lignée sur-exprimant CPK13 par rapport à la lignée WT. Ces résultats confirment les résultats obtenus ci-dessus sur épidermes pelés. Les grands écarts types montrées sur la figure IV.16 peuvent s'expliquer par plusieurs facteurs : d'une part, il y a une grande

hétérogénéité de feuille à feuille pour une même plante et d'autre part, les mesures sont hétérogènes sur une même feuille en fonction de l'emplacement de la cellule de mesure. Malgré cela, de manière générale, la lignée sur-exprimant CPK13 a tendance à moins ouvrir ses stomates induisant une plus faible conductance stomatique. Ces données confirment donc les résultats obtenus ci-dessus. Les deux méthodes sont donc complémentaires.

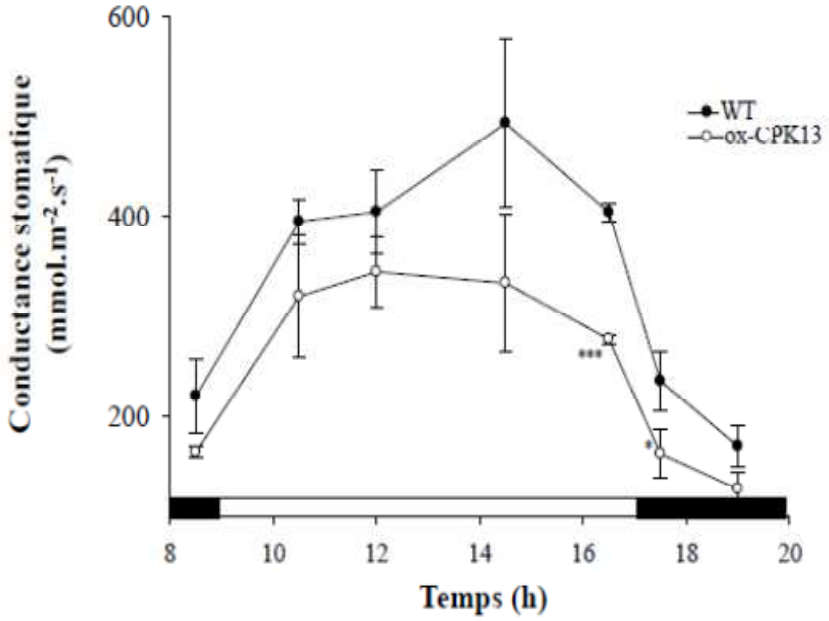


Figure IV.16: Conductances stomatiques en fonction de la photopériode
Les conductances stomatiques au cours d'une journée (jours court) ont été mesurées sur des plantes WT et sur-exprimant CPK13 âgées de 4 semaines. Les plantes sont éclairées de 9h à 17h (cadre blanc) et placées dans l'obscurité le reste de la journée (cadre noir). Les tests statistiques ont été réalisés avec des t-test 'Student', $p \leq 0{,}001$ avec *** et $p \leq 0{,}05$ avec *.

En conclusion de cette partie, il a été mis en évidence que l'induction de l'ouverture stomatique par la lumière est inhibée par la protéine CPK13. Plus l'expression de CPK13 est élevée, plus les stomates ont du mal à s'ouvrir, même en présence de fusicoccine. Ces résultats sont corrélés avec une possible inhibition de l'activité de KAT2 par CPK13 in planta, comme mis en évidence en système hétérologue. Cette partie apporte de nombreuses informations sur une éventuelle nouvelle voie de régulation des mouvements stomatiques. Cette dernière serait notamment indépendante du Ca^{2+}, de l'ABA et du pH.

A court terme, il est observé sur des lignées sur-exprimant CPK13, un défaut dans l'ouverture stomatique en réponse à la lumière. Il est donc possible, pour ces plantes, qu'à long terme ceci ait un impact sur la photosynthèse et donc affecte la biomasse.

IV.8 La surexpression de CPK13 induit un défaut dans la croissance de la plante en condition de stress lumineux

L'hypothèse suivante a alors été émise : un défaut dans l'ouverture stomatique après 180 min peut induire à plus long terme un défaut dans la croissance de la plante dans des conditions de stress lumineux. Il a donc été mis au point des conditions de culture avec une photopériode particulière. Les plantes sont cultivées pendant 20 jours dans des conditions particulières avec une photopériode de 8 h, selon le protocole suivant : 4× (2 h de lumière interrompue par 4 h d'obscurité) (Figure IV.17A). Ces périodes de 2 h de lumière ont été choisies en fonction des mesures initialement réalisées avec le poromètre montrant qu'un état d'ouverture stomatique stationnaire était maximal est généralement atteint dès 2 h d'éclairage.

Après 20 jours de culture dans ces conditions, la lignée ox#3 qui a un défaut d'ouverture stomatique important et présente également un défaut de croissance foliaire puisque nous obtenons une différence significative de biomasse de 17 % entre le WT et la lignée ox#3. Le défaut moindre d'ouverture stomatique de la lignée ox#4 n'impacte pas le développement de la rosette puisque la différence entre cette dernière et le WT n'est pas significative (figure IV.17B). Les aires occupées par les rosettes sont également mesurées (figure IV.17C). Les données sont cohérentes avec les résultats ci-dessus : ox#3 possède, de manière significative, une aire moyenne occupée plus faible par rapport aux deux autres lignées testées (WT, ox#4). Des photographies représentatives de ces résultats sont présentées dans la figure IV.17C.

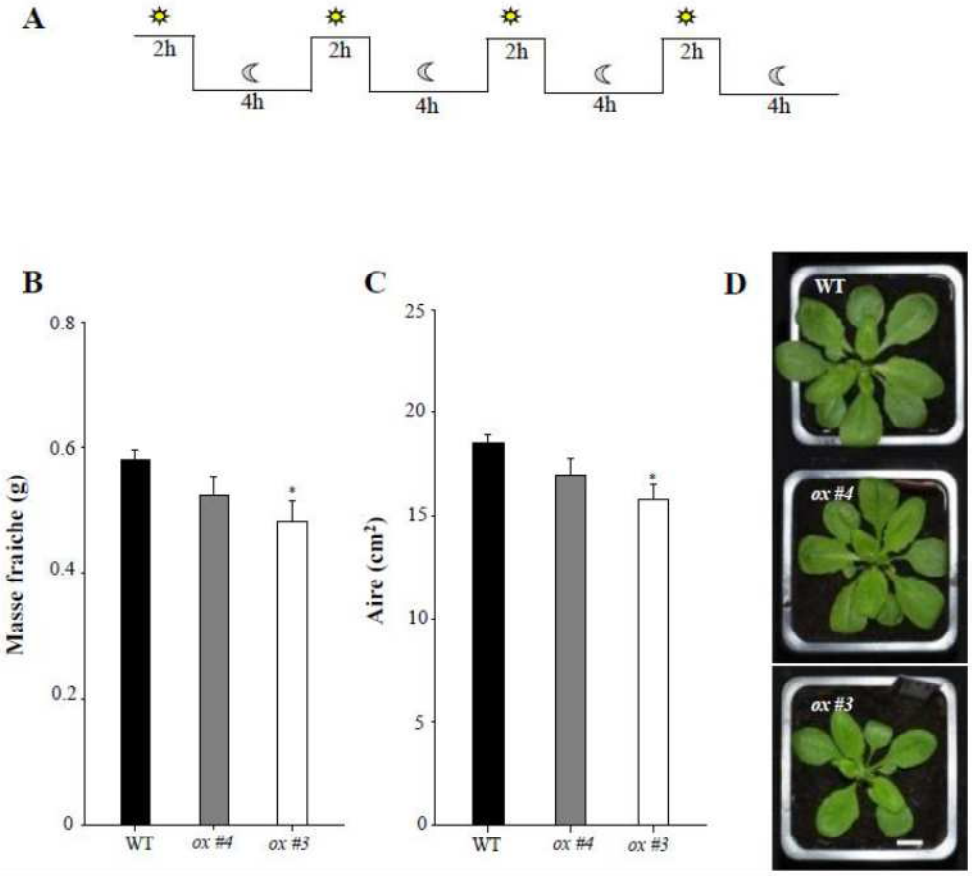


Figure IV.17: Application **d'u**n stress lumineux et impact sur la croissance des plantes.
A. Protocole journalier (24 h) de la photopériode appliqué aux plantules âgées de 10 jours et ceci durant 20 jours : 8 h de lumière réparties en 4 périodes de 2 h de lumières entrecoupées par 4 h d'obscurité. B. Les masses fraiches sont mesurées après 30 jours de culture au total. C. Les plantes sont photographiées et l'aire occupée pour chaque rosette est mesuré à l'aide du logiciel Image J. D. Photographies représentatives des plantes âgées de 30 jours ayant subit un stress lumineux pendant 20 jours. Les tests statistiques ont été réalisés avec des t-test 'Student', $p \leq 0,05$ avec *.

En conclusion, une légère sur-expression de CPK13 induit un défaut d'ouverture stomatique significatif mais pas de défaut de croissance de la plante à long terme. Un facteur de sur-expression ≥ 2 induit à court terme un défaut significatif de l'ouverture stomatique suffisant pour engendrer un défaut de croissance foliaire à long terme. D'après ces résultats, le défaut d'ouverture stomatique de la lignée ox#3 peut être estimé à 40 % (à 180 min : 2,12 µm pour le WT contre 1,31 µm pour ox#3) tandis que celui pour la lignée ox#4 est estimer à 20 % (2,12 µm pour le WT contre 1,9 µm pour ox#3). Seule une inhibition de 40 % de l'ouverture stomatique engendre un phénotype à long terme. Ces résultats mettent en évidence qu'un stomate peut être plus ou moins ouvert jusqu'à 20 % sans que ceci est un impact sur la biomasse permettant ainsi de limiter la perte en eau. Ces données montrent la flexibilité qu'a la plante pour ajuster au mieux la photosynthèse et la perte en eau en conditions de stress.

IV. 9 Conclusions et perspectives

En conclusion de ce travail, il a été montré que CPK13 inhibe à plus de 60 % l'activité de KAT2 en ovocytes. Il a également été mis en évidence, in planta, que ces deux protéines co-localisent et interagissent physiquement à la membrane plasmique. Le pattern d'expression de CPK13 est identique à celui de KAT2. CPK13 et KAT2 sont exprimés dans les tissus vasculaires des feuilles mais également dans les stomates. Enfin, la surexpression de CPK13 chez Arabidopsis thaliana induit un défaut d'ouverture stomatique, puis à long terme, dans des conditions de stress lumineux, un défaut dans la croissance foliaire.

Le rôle de CPK13 dans la régulation négative de l'ouverture stomatique à travers l'inhibition de KAT2 a été montré. Une nouvelle voie de régulation des mouvements stomatiques a été mise en évidence : cette voie est indépendante du Ca^{2+}, de l'ABA et du pH. En condition de stress, la protéine kinase CPK13 phosphorylerait plusieurs résidus de KAT2 avec en conséquence un blocage du canal KAT2. L'ouverture stomatique est alors diminuée et ceci même en présence de fusicoccine. Ce travail a fait l'objet d'un manuscrit soumis à la revue "Plant Physiology". Ce manuscrit est présenté en annexe 4.

La première perspective majeure de ce travail est de déterminer précisément le ou les résidus phosphorylés de KAT2 induisant une régulation négative de ce dernier par CPK13. Le but est de perdre totalement l'inhibition de KAT2. Les puces à peptides subissent actuellement une seconde analyse de manière à confirmer les premiers résultats obtenus. La réalisation d'un « super mutant KAT2 » combinant plusieurs mutants déjà réalisés dans le paragraphe IV.4 est également en projet. Son but est d'obtenir un canal KAT2 fonctionnel mais non-régulé par CPK13. La production des parties N-terminale et C-terminale cytoplasmique de KAT2 en bactérie Rosetta a été engagée afin

de montrer une possible interaction et/ou phosphorylation préférentielle de l'une des deux parties avec CPK13. Une analyse en spectrométrie de masse est discutée dans l'équipe pour compléter les données des puces à peptides ou bien apporter de nouvelles informations.

La seconde perspective de ce projet est d'identifier le stress environnemental à l'origine de cette nouvelle voie de signalisation. D'après la littérature, CPK13 n'est pas régulé de manière transcriptionnelle par un stress ABA (Leonhardt et al. 2004). Les premiers résultats transcriptionnels donnés par BAR (The Bio-Analytic Resource for Plant Biology), montrent que l'expression de CPK13 est induite par un stress froid ou oxydatif (Figure IV.18). Des tests pour confirmer cette affirmation devront être réalisés en utilisant la lignée. Pour ce faire, une lignée pCPK13-Luc dans laquelle l'expression du gène de la luciférase est sous le contrôle du promoteur de CPK13 a été générée dans l'équipe (Cf. §II.11.2). Les avantages de l'utilisation de cette lignée sont nombreux : (i) l'expression du gène luciférase peut être quantifié ; (ii) de l'imagerie in planta peut être réalisée ; (iii) la réponse de la plante peut être visualisée directement sur un écran d'ordinateur.

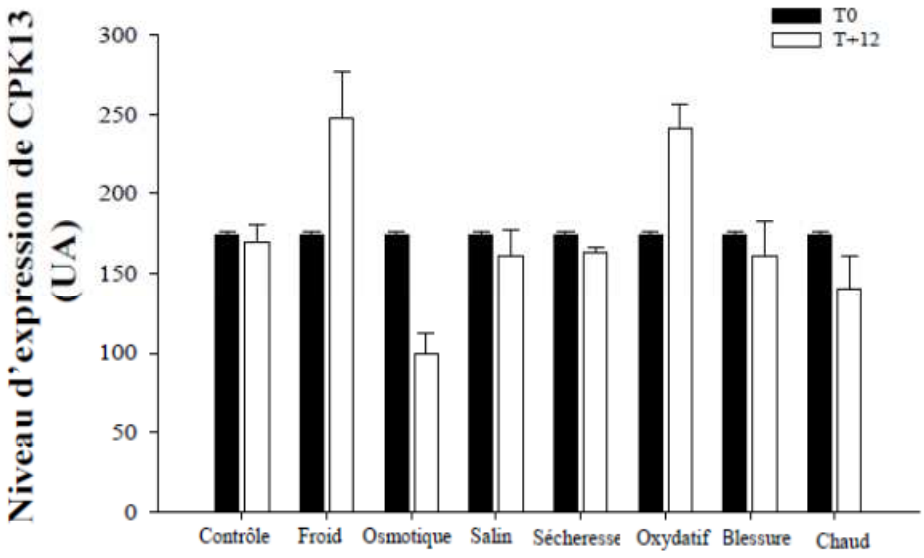


Figure IV.18: Niveau du taux de transcrits de CPK13 en fonction de stress environmentaux.
Le niveau d'expression de CPK13 est analysé sur des plantules de 18 jours après l'application de différents traitements (à t0 et t+12 h): froid (à 4°C), osmotique (300 mM mannitol), salin (150 mM NaCl), sécheresse (courant d'air), oxydatif (10 µM methyl viologen), blessure (aiguille) et chaud (38°C). L'expression de CPK13 est stimulée en réponse au froid et à un stress oxydatif et est inhibée en réponse à un stress osmotique. Données obtenus d'après www. http://bar.utoronto.ca.

Nous pouvons mettre en place avec une lignée luciférase, une étude systématique de l'expression de CPK13 en réponse à de nombreux autres stress (froid, chaud, oxydatif, hydrique, salin et osmotique) et ceci de façon rapide et localisé au niveau des tissus en complément de PCR

quantitatives. Une lignée pCPK13::LUC a été générée dans l'équipe et les expériences ont été réalisées en réponse au stress froid. En parallèle de ces expériences de luciférase, les conductances stomatiques de plantes subissant un stress froid ont été réalisées à l'aide d'un poromètre.

Les résultats sont présentés dans les figures IV.19 et 20. Il est mis en évidence dans cette expérience préliminaire que la conductance stomatique diminue en réponse à un stress froid. Les stomates se ferment très vite puisqu'à t+30 minutes de traitement, la conductance n'est plus que de 60 mmol.m^{-2}.s^{-1} contre 160 à t0. Chez A. thaliana, le froid induit de façon très rapide la fermeture des stomates et cette fermeture est maintenue dans le temps.

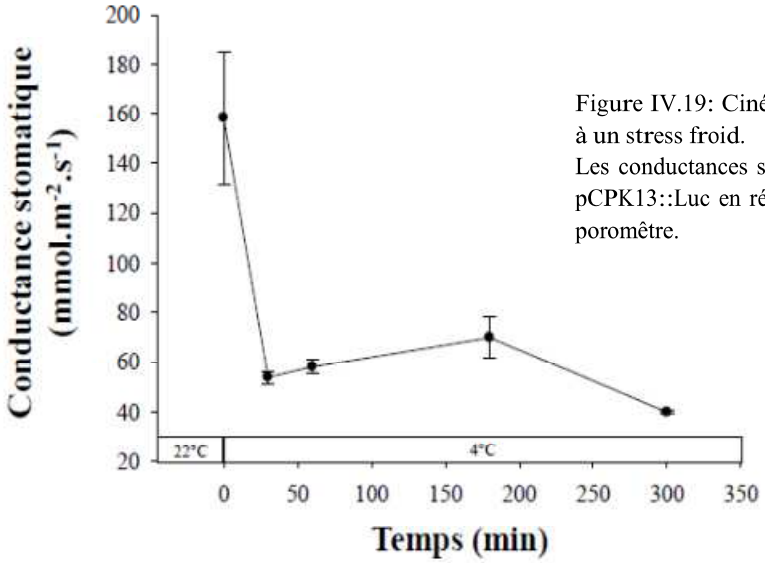


Figure IV.19: Cinétique de fermeture stomatique en réponse à un stress froid.
Les conductances stomatiques ont été mesurées sur des plantes pCPK13::Luc en réponse à un traitement au froid à l'aide d'un poromètre.

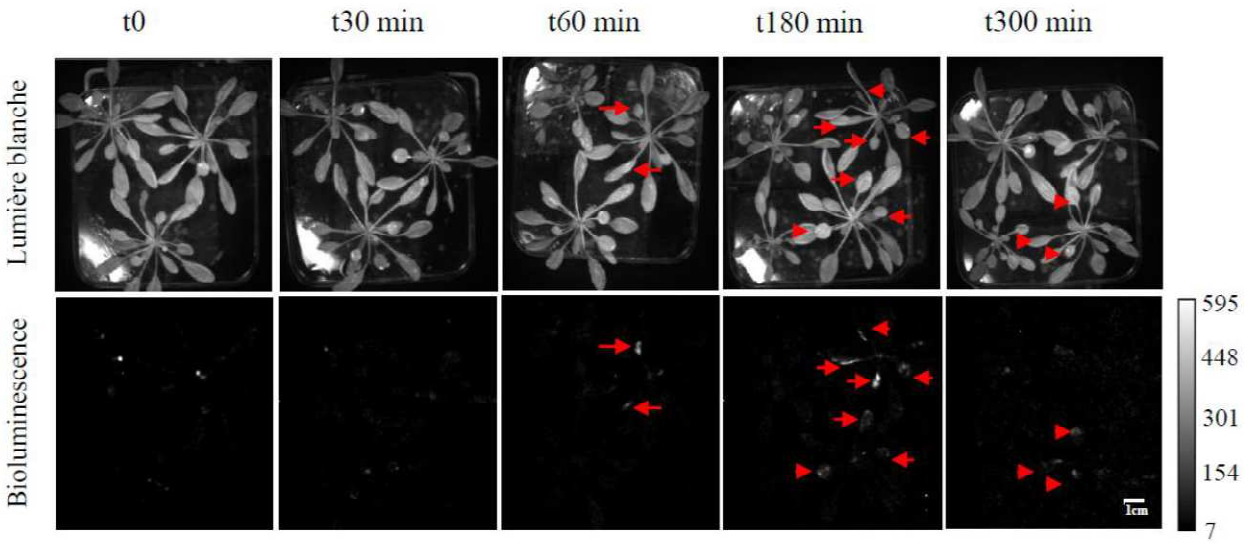


Figure IV.20: Visualisation de l'activité du promoteur de CPK13 **lors d'un stress froid.**
Les plantes âgées de 4 à 5 semaines sont mises en condition de stress froid (4°C) pendant 5 h. L'activité de la luciférase est mesuré à t0, t+30 min, t+60min, t+180 min et t+300 minutes de traitement. Une solution de luciférine est pulvérisée sur les feuilles et les images en lumière blanche (panel haut) et en bioluminescence (panel bas) sont mesurées avec une caméra CCD.

Des signaux sont détectés dans les feuilles dès 60 minutes. À 180 min, le niveau d'expression semble être maximal. Ces résultats préliminaires laissent suggérer qu'une régulation transcriptionnelle est mise en place à partir de 60 minutes. Les stomates se fermant dès 30 min au froid (données poromêtre), nous pouvons alors imaginer que la réponse de la plante à ce stress, se fait en deux temps. Premièrement, le niveau basal de protéines CPK13 présentes dans les stomates à t0 suffit pour une inhibition instantanée de l'activité des canaux KAT2 dès les premières minutes après l'exposition au froid. Puis, cet état fermé pourrait être maintenu grâce à l'activation du promoteur de CPK13 révélée par nos expériences avec la luciférase. Dans ces expériences, il est intéressant de remarquer que la bioluminescence (ie. l'activité du promoteur CPK13) est visible surtout dans les jeunes feuilles.

Enfin, pour compléter ce travail une analyse du promoteur de CPK13 est en cours. Il est recherché, sur ce dernier, des séquences connues (boites) fixant des facteurs de transcription pouvant être impliqués dans la réponse à certains stress. Une première étude bioinformatique met en évidence la présence des boites reconnues spécifiquement par des facteurs de transcription impliqués dans la réponse au stress froid : CRT/DRE et CBFHV.

V. Rôle de CPK6 dans la tolérance au stress salin chez Arabidopsis thaliana à travers le canal Shaker KAT2

La salinisation est une accumulation de sel (NaCl) dans les sols, ceci peut conduire à une stérilité des sols lorsque ces derniers sont saturés en sels. La salinisation des sols est donc un réel problème pour l'écosystème mais aussi pour l'agriculture. En effet, à forte concentration, le sel est toxique pour les végétaux puisqu'il entraîne une augmentation de l'osmolarité chez ces derniers. 80 % de la salinisation est dite « primaire », la concentration en sel dans le sol provient de mécanismes naturels comme l'érosion des roches. Par contre, 20% de la salinisation est dite « secondaire », elle est causée par des mécanismes non naturels (source www.fao.org). En effet, l'irrigation des terres agricoles est l'une des principales causes de l'augmentation de la concentration de sel dans le sol. Le réchauffement climatique ne peut arranger la situation puisque l'irrigation des terres va devoir s'intensifier. De plus, le défrichage intense ne permet pas l'élimination, par les plantes, des eaux de pluies contenant les sels océaniques. À l'échelle de la planète, 6 % des terres sont touchées par la salinisation.

Chez les plantes, une salinisation des sols engendre l'absorption de fortes concentrations en sodium (Na^+) et en Chlorure (Cl^-). Ceci entraine des modifications d'osmolarité, et un changement dans la turgescence des cellules. D'après la littérature, il y a une forte corrélation entre la capacité à retenir les ions K^+ dans les cellules et la tolérance au stress salin (Shabala et al., 2005; Shabala et al., 2006). En condition de stress salin, un excès d'ions Na^+ tend à s'accumuler dans les cellules, ce qui tend à diminuer le rapport K^+/Na^+ avec des effets néfastes à court terme sur la synthèse de sucres et donc sur le développement et la croissance des plantes (West et al., 2004). Un des principaux mécanismes de résistance au sel consiste pour la plante à maintenir un fort ratio K^+/Na^+ (Chen et al., 2007 ; Shabala and Cuin, 2008 ; Demidchik et al., 2010). Par leur forte sélectivité pour K^+ contre Na^+, les canaux Shakers comme KAT1 et KAT2 pourrait contribuer à maintenir le ratio K^+/Na^+ élevé pour lutter contre le stress salin.

Il est décrit dans la littérature que les protéines senseur de Ca^{2+} sont impliquées dans la résistance au stress salin (Liu and Zhu, 1998). Plus récemment, il a été montré par Xu et ses collègues en 2010 que la surexpression du gène CPK6 confère une tolérance aux stress salin et hydrique chez Arabidopsis thaliana (Xu et al., 2010). Après 48 h d'application d'une solution saline à 250 mM, seulement 20 % des plantes sauvages et des plantes knock-out-cpk6 ont survécu. A contrario, plus de 70 % des plantes sur-exprimant CPK6 ont survécu à ce traitement. Dans ce contexte, il est intéressant de comprendre les mécanismes moléculaires de résistances au stress salin mis en place chez ces plantes.

Dans la partie III de ce manuscrit, il a été montré que CPK6 stimule l'activité des canaux entrants KAT1 et KAT2 sélectifs du K^+. Il a également était mis en évidence dans cette même partie, que l'activité kinase de la protéine CPK6 est dépendante du Ca^{2+}. Nous avons donc émis l'hypothèse que cette tolérance au stress salin par la protéine CPK6 passe par une régulation de l'activité des canaux Shaker KAT1 et KAT2 à travers une signalisation calcique.

Dans un premier temps, la dépendance au Ca^{2+} de CPK6 a été confirmée. Dans une seconde partie, il a été mis en évidence qu'un stress salin induit, chez la plante, des vagues calciques dans les tissus vasculaires. En parallèle, Il a été montré qu'en cas de stress salin, il y a induction de l'expression de CPK6 dans ces mêmes tissus. En voltage-clamp, CPK6 est capable d'augmenter la conductance potassique de KAT2 permettant l'entrée massive d'ions K^+ dans la cellule. Une co-expression de CPK6 et de KAT2 est montrée dans les tissus vasculaires des feuilles. Enfin, l'utilisation de puces à peptides a permis d'étudier la phosphorylation de KAT2 par CPK13.

V.1 Test de l'activité kinase de CPK6 est fonction de la concentration en Ca^{2+}.

V.1.1 Test de l'activité kinase de CPK6 avec le kit de phosphorylation in vitro (Kinase Glo® Luminescent kinase Assays) utilisant de l'ATP froid

L'activité kinase de la CPK6 recombinante a été testée en faisant varier la concentration en Ca^{2+} libre afin de caractériser sa dépendance au Ca^{2+}. Une gamme de concentrations en Ca^{2+} libre de 0 ; 0,1 ; 2 ; 5 et 25 µM de Ca^{2+} a été testée. L'estimation de la concentration en Ca^{2+} libre a été faite avec le logiciel Maxchelator (http://www.stanford.edu/~cpatton/downloads.htm). Les résultats sont présentés dans la figure V.1. Lorsque la concentration de Ca^{2+} est nulle, l'activité de CPK6 est faible, elle est de $3{,}8.10^4$ UA (Unité Arbitraire). Dès lors que la concentration libre est de 0,1 µM de Ca^{2+} (niveau basal dans le cytosol), l'activité de la kinase est de $6{,}8.10^4$ UA soit 1,8 fois plus importante qu'en absence de Ca^{2+}. À 2 µM, l'activité maximale de CPK6 est atteinte, pour des concentrations plus fortes, l'activité est stable. À cette concentration, l'activité kinase de CPK6 est augmentée au maximum d'un facteur 4 par rapport à la condition en absence de Ca^{2+}. Au-delà de 5 µM, l'activité kinase de la CPK6 est stable. L'activité kinase de CPK6 est dépendante du Ca^{2+}. Rappelons que dans la partie III, la protéine CPK6 avait été caractérisée comme étant fortement dépendante au Ca^{2+}. Deux situations bien différentes avaient été testées : absence de Ca^{2+} (0 µM) et excès de Ca^{2+} (830 µM libre). La première approche nous permet de valider que la protéine CPK6 est fortement dépendante du Ca^{2+}. Les résultats présentés dans ce chapitre, il est montré qu'avec un niveau basal de Ca^{2+} (100 nM), l'activité kinase de CPK6 est déjà à environ 50 % (100% d'activité est atteint à 2 µM de Ca^{2+} libre). Un pic calcique de l'ordre de 2 µM dans une cellule, stimulerait l'activité kinase de CPK6 au maximum.

Ici, l'activité kinase de CPK6 a été testé en réponse à une gamme allant de 0 à 25 µM de Ca^{2+} afin d'affiner sa caractérisation et de rester dans des conditions physiologiques. En effet, en cas de pic calcique dans la cellule, la concentration cytosolique passe de 100 nM à quelques µM.

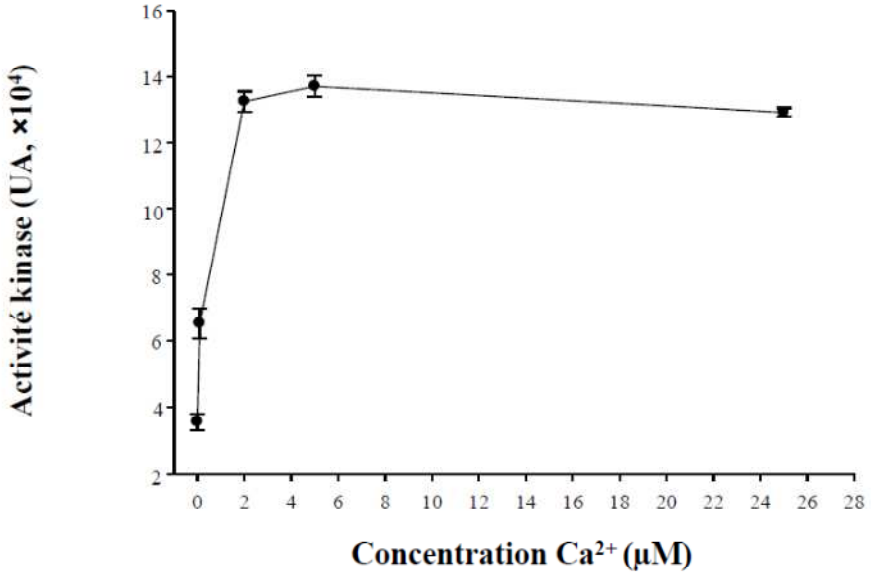


Figure V.1 : Mesure de l'activité kinase de CPK6 recombinante en fonction de la concentration en Ca2+ par phosphorylation in vitro.
L'activité kinase de CPK6 a été testée avec un kit de phosphorylation in vitro (Kinase Glo® Luminescent Kinase Assays, Promega) en utilisant un peptide cible (Synthide-2, Sigma, 25 µM) en présence de 25 µM d'ATP. Seule la concentration en calcium varie de 0 à 25 µM. La réaction de phosphorylation est arrêtée après 15 minutes d'incubation en ajoutant le réactif « Kinase Glo® reagent ». La luminescence émise est mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque (Victor, Perkin Elmer).

V.1.2 Test de l'activité kinase de CPK6 en utilisant de l'ATP radioactif.

Pour cette méthode, la kinase est remise en solution avec le peptide cible (Syntide-2, 1 mM), 830 µM de calcium libre, 10 µM d'ATP froid et 1,2 µCi d'ATP radioactif ($ATP^{-}{}_{i}{}^{32}P$) et ce mélange est incubé pendant 1 h. Le mélange est déposé sur un papier de cellulose retenant spécifiquement les phosphopeptides et phosphoprotéines. Le papier est lavé plusieurs fois avec une solution d'acide phosphorique. Le comptage de la radioactivité sur le papier correspond au niveau de phosphorylation du peptide ou de la protéine seule (Figure V.2). Plusieurs contrôles sont réalisés : le contrôle « Syntide-2 seul » permet de quantifier le bruit de fond (absorption non spécifique de l'ATP radioactif) qu'il convient de soustraire des autres mesures ; et le contrôle « CPK6 seule » est réalisé dans le but de quantifier l'auto-phosphorylation de la kinase qui doit être soustraite de la mesure totale afin d'estimer seulement la phosphorylation du peptide cible. Les valeurs obtenues avec ces deux contrôles sont respectivement de 600 et 2000 cpm (coups par min). Dans ces conditions, il est possible de conclure que la protéine CPK6 est capable de s'auto-phosphoryler et que le niveau de radioactivité est à hauteur de 1400 cpm (2000-600cpm). Les valeurs de

l'autophosphorylation et du bruit de fond, correspondante à 2000 cpm, est à soustraire des autres mesures. Le niveau de radioactivité au-delà de 2000 cpm correspond spécifiquement à la phosphorylation du substrat. Lorsque l'activité kinase de CPK6 est mesurée en présence du peptide cible Syntide-2 et de Ca^{2+}, la valeur obtenue est de 6000 cpm, ce qui suggère une phosphorylation du peptide par CPK6 à hauteur 4000 cpm. Ces tests de phosphorylation ont été réalisés avec la protéine CPK6-KM, la valeur de radioactivité obtenue dans ce cas est de 1000 cpm. Cette valeur est inférieure au seuil de spécificité (2000 cpm). Cette méthode confirme, également, que la protéine CPK6-KM est dépourvue d'activité kinase.

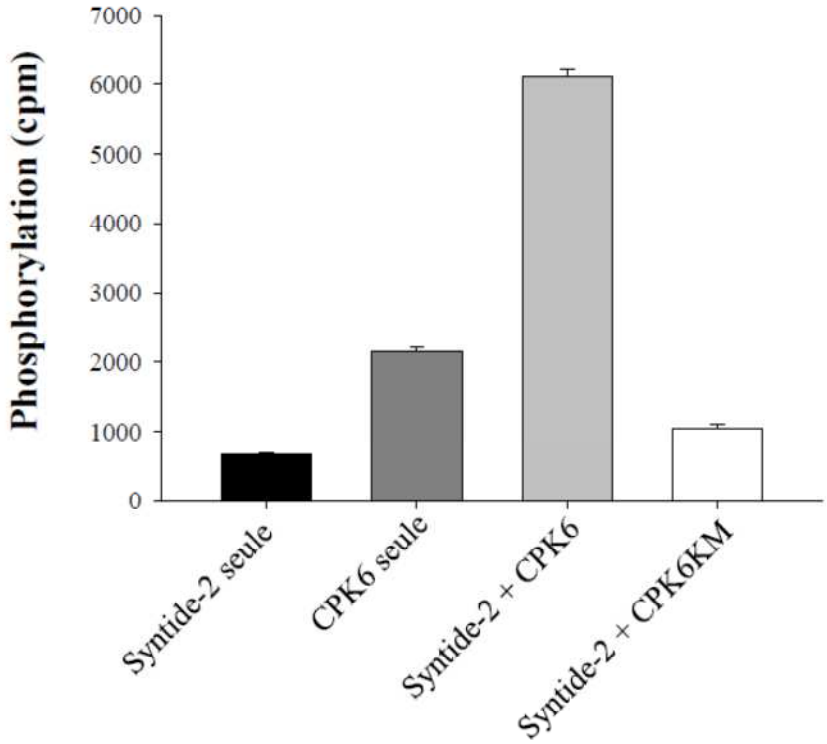


Figure V.2 : Mesure de l'activité kinase de CPK6 recombinante par phosphorylation in vitro en utilisant de la radioactivité. L'activité kinase de CPK6 a été testée, en présence 830 µM de Ca^{2+} libre, à l'aide d'une phosphorylation in vitro avec de l'ATP radioactif (ATP-γ-^{32}P) après 1 h d'incubation avec 1 mM de peptide cible (Syntide-2, Sigma), en présence de 20 µM d'ATP froid et 1,2 µCi d'ATP-γ-^{32}P. Le mélange est déposé sur un papier cellulose retenant spécifiquement les phosphopeptides et les phosphoprotéines. Le papier est rincé 4 fois avec une solution d'acide phosphorique et la radioactivité restante sur le papier est comptée au compteur à scintillation, les résultats sont présentés en cpm (coups par minutes).

Le rôle de CPK6 dans la tolérance au stress salin, sera étudié en corrélation avec des fluctuations de Ca^{2+} dans la plante en réponse à un stress salin.

V.2. Activité du promoteur de CPK6 en réponse à un stress salin

L'expression du gène CPK6 est connue pour être stimulée par un signal calcique spécifique (Whalley et al., 2011). En effet, ces auteurs ont montré que seul un signal calcique transitoire stimule l'expression du gène, alors qu'un signal oscillatoire n'a pas d'effet (Whalley et al. 2011). Le stress salin provoque une augmentation transitoire du niveau de Ca^{2+} dans les nervures des feuilles (Figure III.11), suggérant que ce signal calcique pourrait stimuler non seulement l'activité de la CPK6 mais également l'expression de cette kinase. Une lignée pCPK6::Luc a été construite dans l'équipe par Fréderic Sanchez (schéma de la construction pCPK::Luc et principe de la Luciférase Fig. III.10). Cette lignée a été utilisée par Sophie Lanciano et Elza Onorati pour étudier les variations spatio-temporelles de l'expression de CPK6 lors d'un stress salin sur plante entière.

Les plantes pCPK6::Luc sont incubées avec le co-facteur luciférine (Cf. §II.9.2) puis sont placées dans une chambre noire sous une caméra CCD (Cf. Figure II.6). Une solution saline (NaCl 200 mM) est appliquée aux racines. En parallèle, une application d'eau constitue le contrôle négatif de cette expérience. Les signaux bioluminescents de la luciférase provenant des parties aériennes de la plante, sont collectés par la caméra CCD. Les images après t0, à t+3 h et t+5 h suivant l'application d'eau ou de la solution saline (notées respectivement H_2O ou NaCl) sont présentées dans la figure V.3A.

Une grande différence est observée entre les signaux calciques mesurés chez les plantes stressées (NaCl, Figure V.3A, panel haut) par rapport aux plantes non stressées (H_2O, Figure V.3A, panel haut). L'intensité de bioluminescence est mesurée dans les nervures principales, indiquées par un flèche orange pour les plantes stressées (NaCl), et par une flèche bleue pour les plantes non stressées (H_2O), à t0, t+3h et à t+5h après le traitement. Des agrandissements d'une feuille stressée sont présentés dans la figure V.3A (panel bas). Pour une plante non stressée, le niveau de bioluminescence tend à baisser (Figure V.3A, flèches bleues), ce qui suggère que le niveau d'expression de CPK6 diminue légèrement. Pour une plante stressée, le niveau de bioluminescence augmente de façon significative en fonction du temps. L'effet du stress salin sur le niveau d'expression de CPK6 est quantifié par le ratio d'intensité de bioluminescence d'une feuille stressée (NaCl) sur l'intensité de bioluminescence d'une plante non stressée (H_2O). Le résultat est présenté en figure V.3B. À t0, le ratio NaCl/H_2O est proche de 1, par contre dès 3 h après le traitement, nous notons le signal de bioluminescence dans les nervures primaires de la plante stressée est 4 fois plus important que dans la plante non stressée. Après 5 h, un signal est observé jusque dans les nervures secondaires et le ratio NaCl/H_2O est approximativement égal à 11.

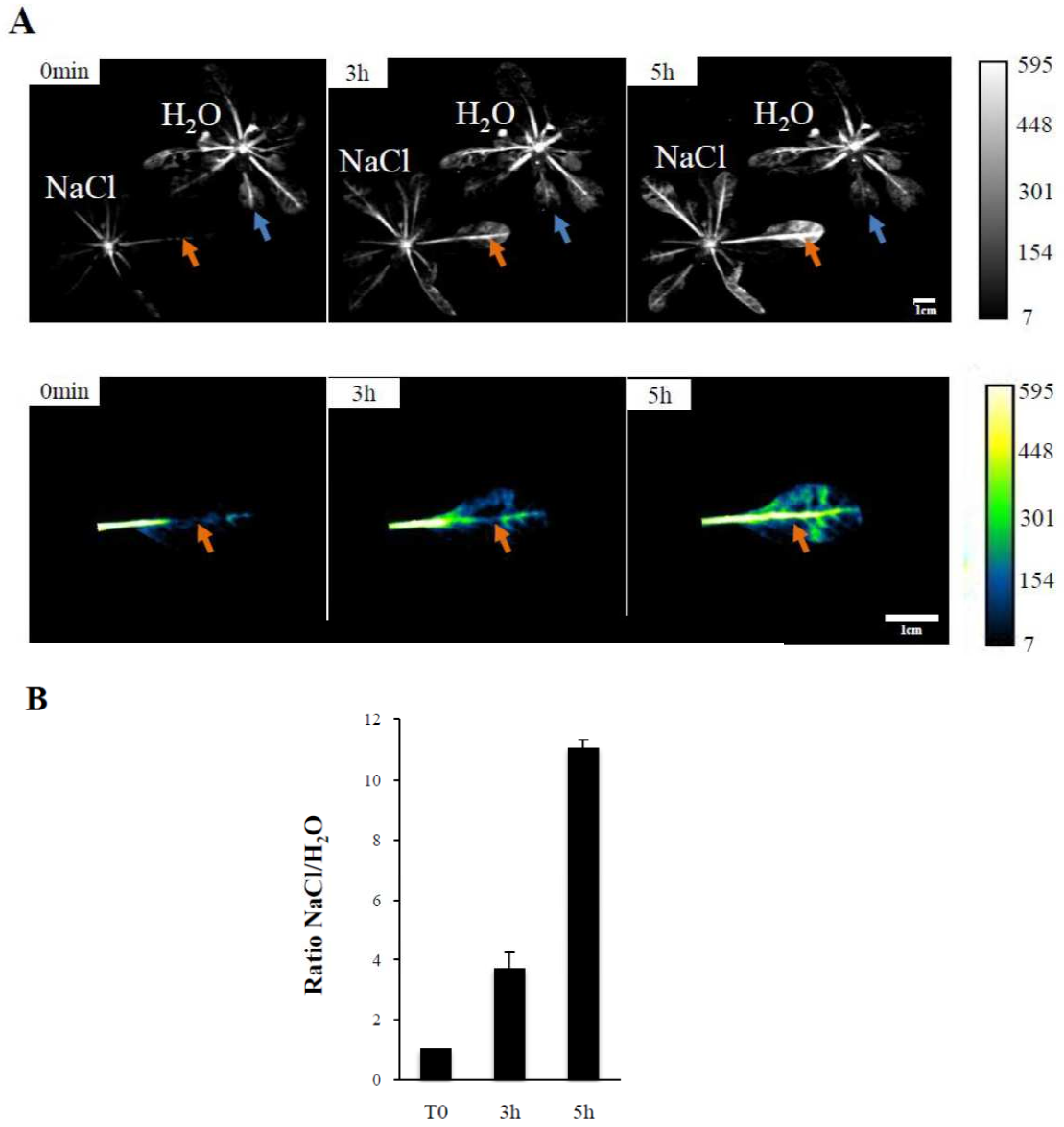


Figure V.3 : Mesure de l'activité du promoteur de CPK6 en réponse à un stress sa**lin à l'aide de la lignée** pCPK6-Luciférase. L'activité du promoteur de CPK6 est mesurée par bioluminescence sur des plantes âgées de 4 semaines auxquelles un stress salin (200 mM de NaCl) est appliqué uniquement au niveau des racines. A. L'expression du gène CPK6 sur plantes entières est mesurée à t0, t+ 3 h et t+ 5 h après l'application de la solution saline (NaCl, 200 mM finale) au niveau des racines. Expression du gène CPK6 dans les nervures principales et secondaires en réponse à un stress salin (flèches oranges) ou à une simple injection d'eau (flèches bleues). B. Quantification du signal bioluminescent représentée par le ratio des signaux feuilles traitées NaCl / feuilles traitées H_2O au niveau des nervures principales.

Ces résultats indiquent que le stress salin stimule l'expression de CPK6 et suggère qu'une surexpression artificielle dans une lignée (comme celle utilisée par Xu et al.), permettrait de conférer une meilleure tolérance pour la plante (Xu et al., 2010). L'avantage de notre approche luciférase avec la lignée pCPK6::Luc est que l'expression d'un gène est localisable et est quantifiable. La variation de l'expression du gène CPK6 est majoritairement localisée dans les tissus vasculaires des feuilles en appliquant un stress salin au niveau des racines.

Les cibles potentielles de la protéine kinase CPK6 sont donc recherchées en priorité dans les tissus vasculaires de la feuille.

V.3. Analyse de l'expression de CPK6 in planta à l'aide d'une lignée GUS

Des données préliminaires en ovocytes de xénope (présentées dans la figure III.1), montrent qu'une des cibles de CPK6 est le canal potassique KAT2. De façon intéressante, l'expression de KAT2 avait été étudié avec une lignée pKAT2::GUS par Pilot et ses collègues (Pilot et al., 2001). L'expression de KAT2 est retrouvée alors au niveau des feuilles dans les stomates, les tissus vasculaires. KAT2 pourrait donc être une cible potentielle de CPK6.

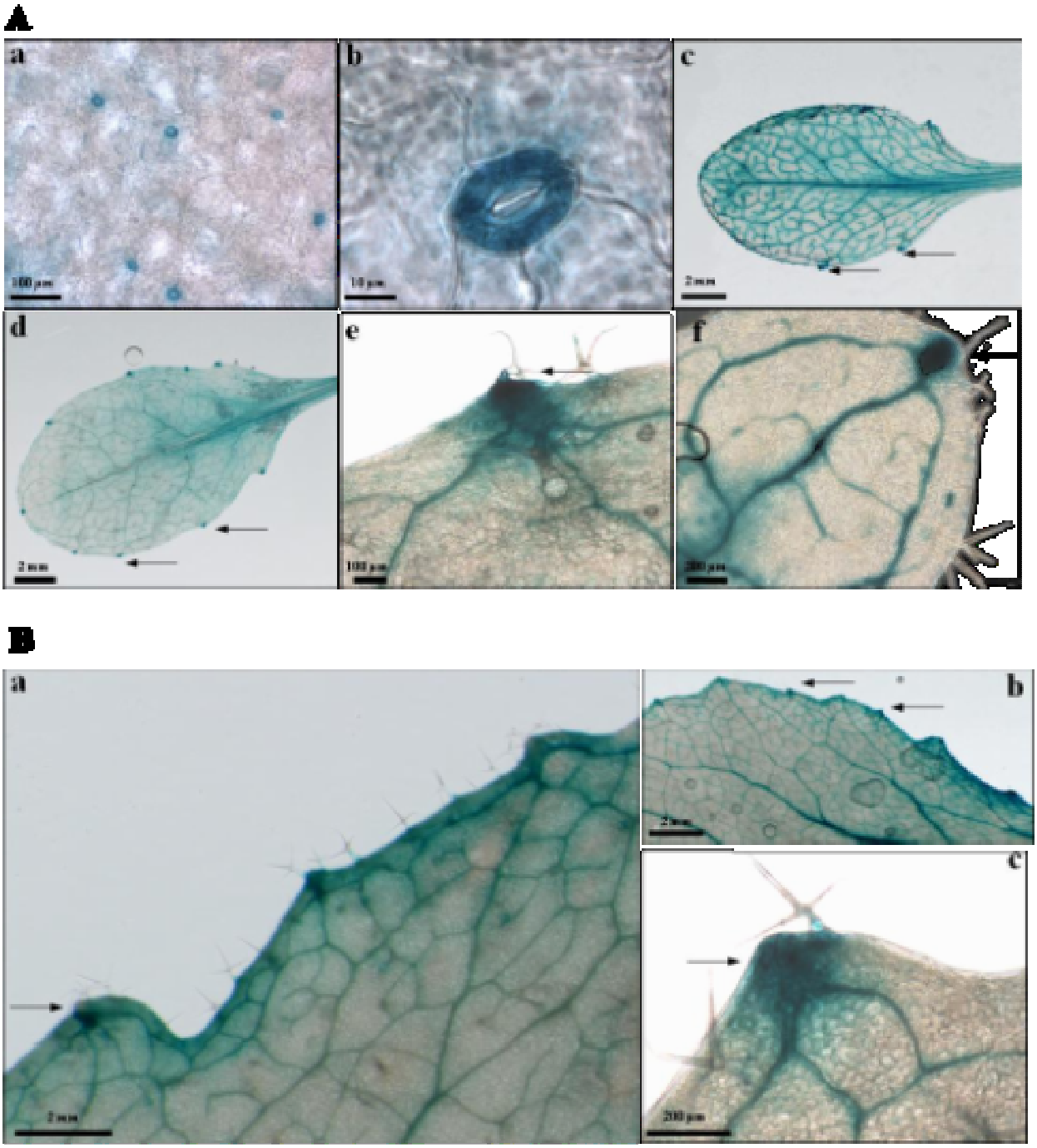


Figure V.4: Colorations GUS avec les lignées pCPK6::GUS et pKAT2::GUS.
Colorations GUS obtenues sur des plantes de 3 semaines. A. Une coloration GUS est présente dans les stomates (a-b), dans les tissus vasculaires et dans les hydathodes (c, d, e, f, notés par les flèches) pour la lignée pCPK6::GUS. B. Coloration GUS dans les nervures et les hydathodes pour la lignée pKAT2::GUS (a, b, c).

Pour étudier précisément la localisation de l'expression de CPK6, une lignée pCPK6::GUS à été générée dans l'équipe. Cette lignée exprime le gène GUS (β-glucoronidase) sous le contrôle du promoteur de CPK6. La coloration GUS a été réalisée sur des plantes pCPK6::GUS. Les images sont présentées dans la figure V.4A. L'expression du gène rapporteur est retrouvée dans les stomates (a-b) et fortement dans les nervures primaires et secondaires (c) ainsi que, de façon intéressante, dans les hydathodes (d, c, f). Un profil d'expression similaire est retrouvé, avec une très nette expression dans les nervures foliaires pour le canal Shaker KAT2 (Figure V.4B, voir également Figures. IV.13A et B). Le gène KAT2 est également exprimé dans les stomates (Figure IV.13C et D) et fortement dans les hydathodes (Figure V.4B, indiqués par les flèches).

Les résultats obtenus avec les lignées pCPK6::GUS et pKAT2::GUS indiquent donc que ces deux protéines sont co-exprimées dans les mêmes tissus foliaires chez Arabidopsis thaliana.

V.4. Etude de l'interaction, in planta, de CPK6 avec le canal Shaker KAT2.

In planta, la régulation du canal KAT2 par CPK6 implique éventuellement une interaction physique entre les deux partenaires. Cela a été testé par une méthode analogue à celle employée pour le couple CPK13/KAT2 (FRET-FLIM). Pour cela, deux souches d'Agrobacterium tumefaciens (GV3101::pMP90) ont été construites, l'une possédant le plasmide pEarley-Gate 101-CPK6 et l'autre le plasmide pEarley-Gate 102-KAT2. La co-localisation des deux protéines dans des feuilles de Nicotiana benthamiana infiltrées par ces deux souches d'agrobacteries a été vérifiée. Les images sont présentées dans la figure V.5A. Ces résultats montrent que les deux protéines sont co-localisées à la membrane plasmique. A noter que CPK6 est aussi localisé dans le noyau. Dans ces mêmes feuilles, des mesures de FRET-FLIM ont été réalisées (par Christian Brière, LRSV Toulouse).

La décroissance de la CFP est mesurée, dans un premier temps, sur un tissu agro-infiltré simplement avec Agrobacterium p102-KAT2. Dans un second temps, la décroissance de la CFP est mesurée sur un tissu co-exprimant les deux protéines KAT2-CFP et CPK6-YFP. Les courbes de décroissance de la fluorescence normalisées sont présentées dans la figure V.5B en fonction du temps et les paramètres d'une décroissance exponentielle ajustés à la cinétique observée. Une constante de temps de 2,23 ± 0.02 ns est mesurée pour KAT2-CFP exprimé seule et une constante de temps de 2.05 ± 0.03 ns pour KAT2-CFP co-exprimée avec CPK6-YFP. Sur cette base, une efficacité de FRET de 8.9 % (Tableau V.1) peut être calculée et peut être considéré comme une probable interaction physique entre KAT2-CFP et CPK6-YFP, à la membrane plasmique. Cette efficacité de FRET est faible mais elle est significative, elle suggère que l'interaction entre les deux partenaires est très rapide et transitoire. Pour ce type d'interaction, il serait sans doute intéressant de réaliser des co-immunoprécipitations (co-IP) soit avec un anticorps anti-CPK6 ou soit anti-YFP.

Lors d'une co-IP, les interactions protéines-protéines sont fixées à l'aide de formaldéhyde. Cette technique nous permettrait peut-être de confirmer les résultats obtenus avec le FRET-FLIM.

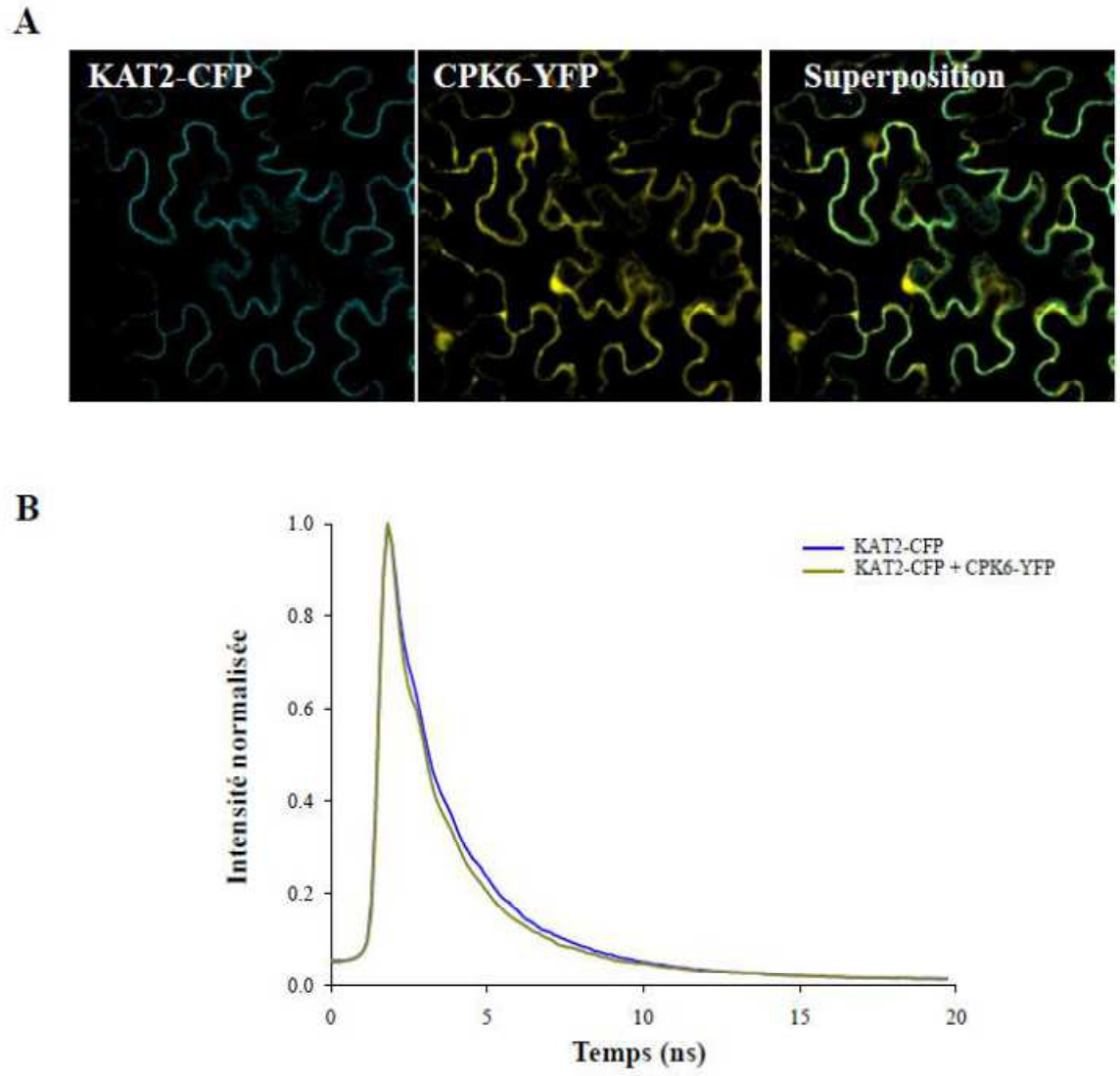


Figure V.5: Courbe de décroissance de la fluorescence de la CFP.
A. Images de cellules épidermique de N. benthamiana exprimant des protéines de fusions KAT2-CFP, CPK6-YFP et la superposition des deux images. B. Les temps de vie de la fluorescence (τ) de la CFP sont mesurés dans des cellules épidermiques exprimant juste la protéine fusion KAT2-CFP (courbe bleue, n=22) puis dans des cellules exprimant KAT2-CFP en présence de CPK6-YFP (courbe verte, n=22).

Tableau V.1: Mesure du temps de vie de la fluorescence de la CFP par la technique de FRET-FLIM.
Les temps de vie de la fluorescence (τ) de la CFP sont mesurés à partir des courbes de décroissance de la fluorescence de la CFP. Une efficacité de FRET est déterminée à partir des ces mesures de (τ) (voir figure IV.12). n représente le nombre de mesures réalisées.

	Temps de vie de la fluorescence (τ) (ns)	Efficacité de FRET (%)	n
KAT2	2,23 ± 0,02	---	22
KAT2 +CPK6	2.05 ± 0,03	8.9	22

L'identification d'une cible de la protéine kinase CPK6 peut permettre de mieux comprendre les mécanismes de tolérance au stress salin. Grâce aux données préliminaires présentées dans la figure

III.1, il est montré que la protéine CPK6 active les conductances des canaux entrants tels que KAT2. De plus, les profils d'expression de KAT2 et CPK6 sont similaires (tissus vasculaires et hydathodes) (figure V.4). Il est donc légitime de penser que KAT2 est une cible potentielle pour CPK6. Par ailleurs, le maintien d'un fort ratio K^+/Na^+ est un facteur de tolérance au stress salin. Une relation entre la protéine CPK6 et les transporteurs de K^+ (tel que KAT2) semble être une piste intéressante à suivre.

V.5 Effet de CPK6 sur l'activité du canal KAT2 en ovocytes

L'effet de CPK6 sur l'activité de KAT2 a donc été étudié en ovocyte de xénope. Des mesures sont réalisées pour comparer les courants potassiques entrants enregistrés dans des ovocytes exprimant KAT2 seul ou KAT2 et CPK6 (Figure V.6A). Avec KAT2 seul, le courant potassique est de 9 µA à -145 mV, mais avec KAT2 et CPK6 co-exprimés, ce courant atteint en moyenne de 15 µA au même potentiel (Figure V.6B). Il est intéressant d'observer sur la figure V.6C que CPK6 n'a pas d'effet sur le canal AKT2, autre canal potassique entrant. Cette régulation positive de KAT2 par CPK6 est donc plutôt spécifique. L'augmentation du courant KAT2 par CPK6 peut s'expliquer par quatre hypothèses : (i) la présence d'un nombre de canaux plus important à la membrane et (ii) une modification de l'activité des canaux présents sur la membrane plasmique. (iii) une conductance unitaire augmentée ; (iv) ou bien une probabilité de l'état ouvert plus grand (temps moyen d'ouverture plus long).

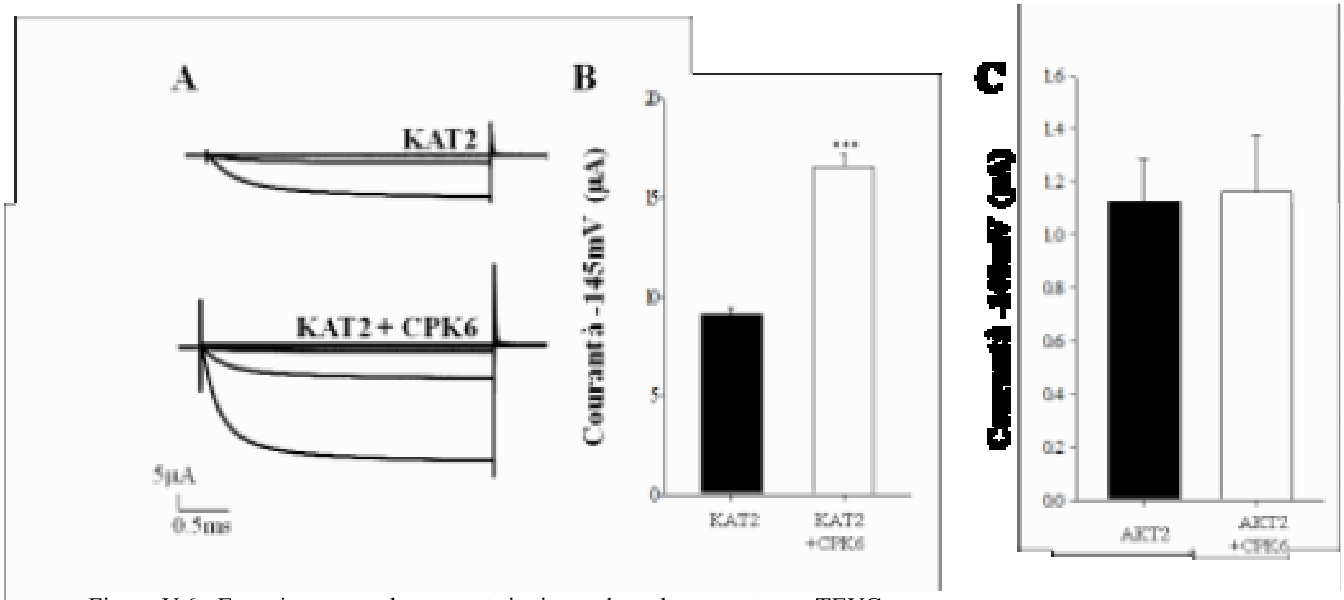


Figure V.6 : Enregistrement de courants ioniques dans des ovocytes en TEVC.

A. Courants potassiques entrants enregistrés avec les ovocytes expriment simplement KAT2 (haut) ou en co-exprimant KAT2 et CPK6 (bas). B. Histogramme représentant le niveau de courant enregistré de KAT2 à un potentiel de -145 mV en présence (barre blanche, n = 17) ou en absence de CPK6 (barre noire, n = 19). C. Niveau de courant pour le canal AKT2 seul (barre noire) ou en co-expression avec CPK6 (barre blanche).

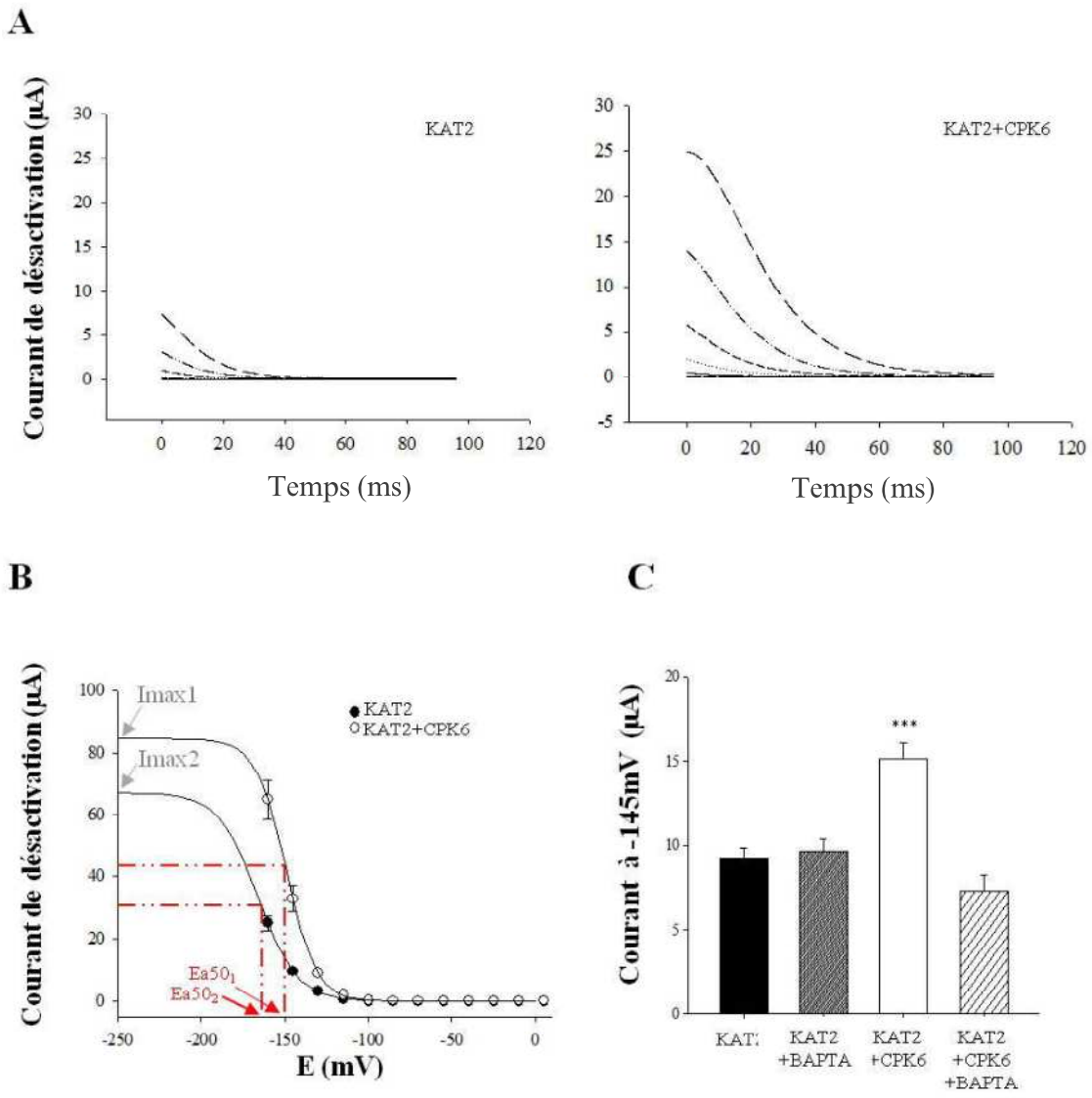


Figure V.7 **: Analyses électrophysiologiques des effets de CPK6 sur l'activité des canaux KAT2.**

A. Exemple de courants de queues obtenus avec des ovocytes exprimant seulement KAT2 (haut) et avec CPK6 (bas). B Courants de désactivation des canaux KAT2 avec ou sans CPK6 enregistrés en fonction du potentiel des membranes allant de 0 à -160 mV. Les courants obtenus de -160 mV à -250 mV proviennent d'un ajustement de la courbe obtenue depuis les résultats expérimentaux, grâce à l'équation de Boltzmann. A partir de cette ajustement, les paramètres Imax (courant maximal à -250 mV), z (pente de la courbe, charge apparente de « gating ») et Ea50 (schématisé en rouge, potentiel de demi-activation des canaux) sont déterminés. C. Histogrammes représentant le courant enregistré à un potentiel de -145 mV à partir d'ovocytes injectés avec KAT2 avant l'injection de BAPTA (barre noire, n = 6), 15 minutes après l'injection de BAPTA (barre quadrillée, n = 5), des ovocytes co-injectés avec KAT2+CPK6 avant l'injection de BAPTA (barre blanche, n = 6) et ces mêmes ovocytes après l'injection de BAPTA (barre grise hachurées, n = 5). Avec n représentant le nombre d'ovocytes.

Dans la première hypothèse, plusieurs mécanismes peuvent être impliqués : une augmentation de l'adressage à la membrane, une durée de vie à la membrane plus longue ou une augmentation de la traduction de la protéine. Des analyses en spectrométrie de masse sur ovocytes pourraient être utiles pour quantifier le nombre de canaux à la membrane. Des approches utilisant des tags fluorescents

fusionnés aux parties N-terminal ou C-terminal du canal peuvent être envisagées en s'assurant que le tag n'entraîne ni de problème d'adresse à la membrane ni de problème d'activité du canal.

Dans la deuxième hypothèse, 3 mécanismes sont potentiellement impliqués : (a) une modification du seuil d'activation des canaux entrainant donc moins de courant pour un même potentiel ; (b) une conductance unitaire réduite ; (c) ou bien une probabilité de l'état ouvert plus faible (temps moyen d'ouverture plus court). Pour répondre à l'hypothèse (a), une analyse des courants de désactivation a été faite sur ces mêmes ovocytes, les courbes de désactivation sont présentées dans la figure V.7A-B. A partir de ces résultats, il est possible de calculer la pente (z) et le paramètre Ea50 représentant le potentiel à atteindre pour avoir 50 % des canaux activés. Les Ea50 calculés sont différents pour les ovocytes exprimant KAT2 et ceux exprimant KAT2+CPK6, ils sont respectivement de -166 mV et -149 mV (Tableau V.1).Ces résultats mettent en évidence que le seuil d'activation des canaux KAT2 est modifié en présence de la protéine kinase CPK6. En présence de cette dernière, les canaux KAT2 commencent à s'ouvrir à un potentiel moins négatif. Il est donc très probable que la protéine kinase CPK6 est l'actrice d'une modification post-traductionnelle du canal par exemple de type phosphorylation. En effet, la régulation par phosphorylation des protéines suppose qu'elle soit rapide et réversible. Il a été réalisé des mesures de courants sur des ovocytes exprimant soit KAT2 seul soit KAT2+CPK6 en présence ou non de BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane -N,N,N',N'-tetraacetic acid). Le BAPTA est un puissant chélateur de Ca^{2+} capable de bloquer les processus Ca^{2+}-dépendants dans l'ovocyte comme l'activation de la protéine kinase CPK6.

Tableau V.2 : Paramètres électrophysiologiques des canaux KAT2 en présence de CPK6.
Les paramètres Imax (courant maximal à -250 mV), z (pente de la courbe, charge apparente de « gating ») et Ea50 (potentiel de demi-activation des canaux) sont montrés dans ce tableau, ils sont calculé pour chaque ajustement. Les valeurs des erreurs standard de

	Ajustement courbe KAT2	Ajustement courbe KAT2 + CPK6	Ajustement commun KAT2 et KAT2+CPK6
z	2.164	2.819	2.732
Ea50	-166 mV	-149 mV	-150 mV
Imax	67.078	84.519	32.5694 (KAT2) et 88.5774 (KAT2+CPK6)
Erreur standard de l'ajustement	0.169	0.160	0.595

Les courants des ovocytes exprimant seulement KAT2 ou co-exprimant KAT2 et CPK6, ont été mesurés avant l'injection de BAPTA puis quelques minutes (≈ 15 min) après l'injection de BAPTA (Figure V.7C). Pour les ovocytes simplement injectés avec KAT2, l'injection de BAPTA ne change pas les courants potassiques, la valeur obtenue à -145 mV est de 9 µA. À l'opposé, dans les ovocytes co-injectés avec KAT2+CPK6, on mesure un courant potassique de 15 µA à -145 mV avant l'injection de BAPTA, et de 8 µA après l'injection de BAPTA. Ce résultat nous permet de conclure que CPK6 augmente l'activité de KAT2 en ovocyte de manière dépendante du calcium. Ce résultat démontre que l'augmentation de l'activité de KAT2 est bien due à CPK6 et surtout que cet effet est réversible par le BAPTA. La stimulation positive de KAT2 par CPK6 est dépendante du Ca^{2+} et est engendrée par une modification post-traductionnelle de type phosphorylation puisque il est possible de lever cette stimulation de manière rapide (≈ 15 min). En effet, cette fenêtre de temps est petite, il est donc peu probable que cette stimulation fasse intervenir un mécanisme d'adressage du canal à la membrane. Néanmoins, l'activité d'une phosphatase endogène présente dans l'ovocyte est fort probable pour expliquer la perte de l'effet de CPK6 sur KAT2 (en présence de BAPTA) en 15 minutes. A ce jour, aucune phosphatase n'a encore été identifiée. Enfin, les expériences faites avec le BAPTA montrent, de plus, que le niveau basal de calcium dans l'ovocyte (proche de 100 nM) est suffisamment pour activer la protéine kinase CPK6. Il est envisageable d'injecter une quantité de Ca^{2+} directement dans l'ovocyte afin d'obtenir une concentration en Ca^{2+} de l'ordre du µM pour vérifier si l'activité de CPK6 est plus importante et si l'effet sur KAT2 est amplifié.

Les hypothèses (iii) et (iv) nécessitent des mesures de single-channel patch-clamp soit sur ovocyte soit sur protoplastes de mésophile ou de cellule de garde en comparant les courants K^+ entrants chez des plantes sauvages et des plantes sur-exprimant la kinase CPK6.

V.6 Etude de la phosphorylation de KAT2 par CPK6

Pour valider l'hypothèse que la stimulation de KAT2 par CPK6 passe par une phosphorylation du canal, il a été réalisé des puces à peptides (comme présentées dans la figure III.5 et Cf. autoradiographie de la puce en figure III.6). L'analyse de la phosphorylation des peptides de KAT2 par CPK6 a été faite à l'aide du logiciel Image J.

Puisque CPK6 est une CPK "canonique" montrant une dépendance au Ca^{2+} (contrairement à l'atypique CPK13), la phosphorylation in vitro a été réalisée dans deux conditions : l'une avec un tampon contenant 830 µM de Ca^{2+} libre et l'autre avec un tampon sans Ca^{2+} (présence d'EGTA). Les résultats sont présentés dans la figure V.8. Les autoradiographies sont présentées dans la figure V.8A. Pour une même quantité de kinase (5 µg) et un même temps d'exposition (15 min) des puces aux films autoradiographiques, le Ca^{2+} stimule fortement l'activité de la protéine kinase CPK6.

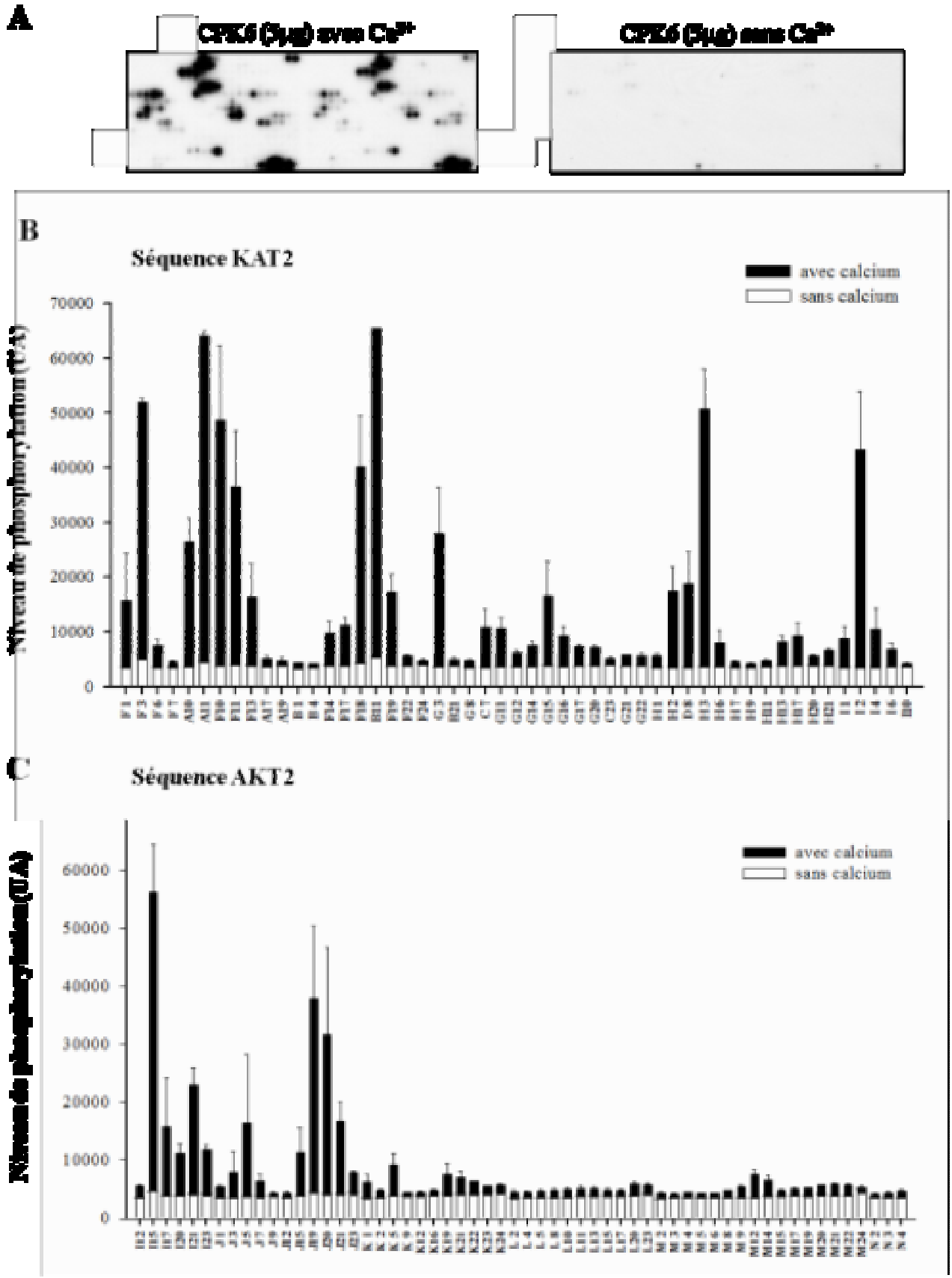


Figure V.8 : Phosphorylation des puces à peptide réalisées avec CPK6 avec ou sans Ca^{2+}.

A. Autoradiographies des puces à peptides réalisées avec 5 µg de CPK6 recombinantes en présence (puce gauche) ou en absence de Ca^{2+} (puce droite). B. Quantification du niveau de phosphorylation pour les peptides de KAT2 par la protéine CPK6 avec (barres noires) et sans Ca^{2+} (barres blanches). C. Quantification du niveau de phosphorylation pour les peptides d'AKT2 par la protéine CPK6 avec (barres noires) et sans Ca^{2+} (barres blanches).

L'autoradiographie de la puce réalisée en présence de Ca^{2+} présente beaucoup de spot très marqués (Figure V.8A, puce de gauche). Au contraire la puce réalisée en absence de Ca^{2+} n'en présente que quelques spots faiblement marqués, proches du bruit de fond (Figure V.8A, puce de droite). La quantification avec et sans Ca^{2+} des peptides a été réalisée en amont sur les peptides de KAT2 (présentée dans la figure V.8B) et sur les peptides sauvage d'AKT2 (présentée dans la figure V.8C). Comme avec CPK13, CPK6 est capable de phosphoryler plusieurs résidus Sérines/Thréonine de KAT2.

(i) Analyse des peptides de KAT2

Nous observons que beaucoup de peptides de KAT2 semblent être phosphorylés de manière significative par CPK6 (Figure V.8B). En effet, 68 peptides de KAT2 sont phosphorylés, dont 33 peptides sauvages et 35 peptides mutants. Deux critères ont été définis pour sélectionner, parmi ces 33 peptides sauvages, ceux susceptibles d'être impliqués dans la régulation fonctionnelle de KAT2 par CPK13. Ces critères sont les suivants : (i) le niveau de phosphorylation déterminé doit être bien au-dessus du bruit de fond (à la fois du côté gauche et du côté droit) et (ii) la position prédite dans la structure du canal KAT2 (sont exclus les peptides dont les résidus Ser/Thr supposément phosphorylés se trouveraient dans la partie extracellulaire. Les analyses préliminaires montrent que 24 résidus Ser/Thr (17 Sérines et 7 Thréonines) de KAT2 potentiellement phosphorylés par CPK16 : S13 ; S15 ; T17 ; S55 ; T56 ; S64 ; S179 ; S190 ; S191 ; S253 ; S256 ; T314 ; S315 ; T317 ; S346 ; T354 ; S482 ; S485 ; S564 ; T565 ; S570 ; S573 ; T642 et S647.

(ii) Analyse des peptides d'AKT2

L'analyse de l'autoradiographie réalisée avec le logiciel Image J est présentée dans la figure IV.8C. Elle nous permet de montrer que seulement 10 peptides d'AKT2 sont phosphorylés par CPK6. Ces peptides regroupent 19 résidus Ser/Thr (17 Sérines et 2 Thréonine). Ces résidus sont exclusivement placés dans la région N-terminale cytoplasmique du canal. En conclusion de cette partie, CPK6 est capable de phosphoryler de nombreux résidus appartenant à la séquence de KAT2 comprenant des résidus placés en région N-terminale, dans le segment S4, dans le pore et en région C-terminale de la protéine. La phosphorylation in vitro, met en évidence également que CPK6 phosphoryle 19 résidus appartenant à AKT2, rappelons que ce dernier n'est pas régulé par CPK6 en système hétérologue (Figure V.6C). La phosphorylation d'AKT2 se fait principalement en région N-terminale. L'homologie entre la partie N-ter de KAT2 et celle d'AKT2 est plus importante que l'homologie entre les deux parties C-terminales. Les hypothèses posées pour CPK13 dans le paragraphe IV.3.ii sont valables pour CPK6 et le jeu de données présentées ci-dessous.

Plusieurs "hot spots" de phosphorylation ont été trouvés. Plusieurs des peptides de KAT2 phosphorylés par CPK6 sont communs avec CPK13 : résidus S13/S15/T17 ; S179 ; S314/S315/T317 ; S354 ; S482/S485 et S647. La recherche des résidus S/T cibles de CPK6 à l'aide de canaux mutants sur ces positions repérées sur la puce (selon un principe analogue à celui utilisé pour la recherche des sites ciblés par CPK13 au chapitre IV) est actuellement en cours.

V.7 Conclusions et perspectives

Dans cette partie, nous avons confirmé que l'activité kinase de CPK6 est dépendante du Ca^{2+}. Une concentration de Ca^{2+} faible, proche du niveau basale dans le cytosol (100 nM de Ca^{2+} libre) est suffisante pour activité la protéine CPK6 à 50 %, Nous avons trouvé que le profil d'expression de CPK6 dans les nervures, dans les stomates et dans les hydathodes est concordant avec celui de KAT2. Ce dernier est sans doute une cible potentielle de CPK6 dans les tissus vasculaires. Nous avons également mis en évidence une interaction physique entre ces deux partenaires. De façon très intéressante, il a été montré en ovocyte de xénope que CPK6, en présence de Ca^{2+} (probablement de l'ordre de 100 nM), induit un changement du seuil d'activation du canal KAT2. Il est donc montré que CPK6 a un effet direct et réversible sur le canal, par exemple en le phosphorylant. Effectivement, à la fin de cette partie, il a été mis en évidence que la protéine est capable de phosphoryler plusieurs résidus Sérine/Thréonine de KAT2 et ceci de façon dépendant du Ca^{2+}.

L'ensemble de ces résultats obtenus, nous permettent d'affirmer que la stimulation de l'activité de KAT2 par CPK6, en situation de stress salin, représente un élément de défense.

Le modèle hypothétique suggéré par nos résultats est le suivant : en cas de stress salin, une vague calcique se propage dans les tissus vasculaires jusqu'aux hydathodes de la plante et stimule la transcription et l'activité kinase de CPK6. Une des cibles serait le canal potassique KAT2. La stimulation du canal entrant KAT2 dans les tissus vasculaires privilégie la recapture dans les cellules et le transfert de K^+, plutôt que celui de Na^+, vers les autres tissus.

Les pistes de recherche suggérées par ce travail sont nombreuses. Il est nécessaire dans un premier temps de déterminer le ou les résidus Ser/Thr de KAT2 phosphorylés par CPK6 permettant la régulation du canal par cette dernière. Il est possible de cribler de façon systématique, en ovocytes de xénopes, les effets de CPK6 sur les canaux KAT2 mutés puisque nous disposons des ARNc corespondants.

De plus, l'étude menée par Pilot et ses collègues en 2003, avait montré que l'expression d'AtKC1, sous unité régulatrice des canaux Shaker entrants, est présente dans les hydathodes (Pilot et al, 2003). En cas de stress salin, l'expression d'AtKC1 est amplifiée dans ces organes, exutoires

de l'excès de sève xylémienne qui ont, de fait, une fonction exocrine. Plus récemment, il a été décrit dans la littérature par Jeanguenin et ses collègues qu'AtKC1 régule l'activité des canaux AKT1, KAT1 et KAT2 et modifie leurs propriétés électrophysiologiques (Jeanguenin et al. 2011). Dans cet article, les auteurs montrent que les canaux Shaker entrants sont co-localisés avec AtKC1 dans les hydathodes et ils émettent l'hypothèse que ceux-ci permettent de limiter la perte de K^+ par l'exsudation. En effet, les teneurs en K^+ dosées dans le liquide de guttation chez un mutant atkc1 et chez le sauvage sont respectivement de 0,6 et 0,2 $mmol.l^{-1}$. Ce résultat, présenté dans la thèse de Linda Jeanguenin en 2008, montre que la concentration en potassium dans le liquide de guttation de la lignée atkc1 est trois fois plus importante que dans celui de la plante sauvage. Nous pouvons mettre en parallèle ces données avec les résultats préliminaires obtenues dans les travaux présentés dans cette partie, ce qui nous permet de proposer l'hypothèse suivante : au niveau des hydathodes, une forte activité de KAT2 est de nature à favoriser un enrichissement relatif du liquide de guttation en Na^+ et une recapture de K^+ qui est ainsi conservé dans l'espace intracellulaire et peut être redistribué afin de maintenir un fort ratio K^+/Na^+. Il serait alors intéressant de démontrer l'hypothèse d'une recapture du K^+ dans les tissus par le canal entrant KAT2, contre une élimination massive du Na^+ par exsudation. Pour ce faire, il est envisageable de placer des plantes sauvages et des plantes sur-exprimant CPK6 en parallèle dans des conditions normales puis en condition de stress salin dans une atmosphère proche de 100 % d'hygrométrie. Il est possible dans ces conditions de prélever, au petit matin, les gouttelettes de guttation et de doser la quantité d'ions Na^+ et K^+ dans chacune des conditions à l'aide d'un spectromètre de flamme.

De façon similaire à l'article de Pilot et al. 2003, il est également possible de réaliser des colorations GUS avec les plantes pKAT2::GUS et pCPK6::GUS en condition contrôle et en condition de stress salin. Il serait intéressant de comparer les différences d'intensité de la coloration GUS dans les deux lignées et dans les deux conditions. Une lignée p35S::GUS pourrait être utilisée pour contrôle. Nous nous attendons à avoir une amplification significative des signaux pour les deux lignées en conditions de stress salin. Ces mêmes expériences peuvent être envisagées avec la lignée pCPK6::LUC afin de pouvoir quantifier ces différences d'expression.

Ces travaux pourront sans doute nous permettre de décrire les mécanismes moléculaires de résistance et de comprendre l'effet de CPK6 qui confère une tolérance au stress salin chez A. thaliana (Xu et al. 2010).

VI. Conclusion générale et perspectives

Les travaux décrits dans ce mémoire mettent en évidence la régulation post-traductionnelle du canal Shaker KAT2 par deux CPKs : CPK13 et CPK6, avec des effets fonctionnels opposés.

CPK13 est un régulateur négatif du canal KAT2

CPK13 est une kinase atypique puisque son activité enzymatique semble peu ou pas dépendante du calcium. En dehors de cette caractéristique déjà montrée (Kanchiswamy et al. 2010 ; Boudsocq et al. 2012), peu de données sont disponibles sur cette kinase. J'ai montré que cette kinase est pH indépendante (pH 6,5-8,5), suggérant que la régulation de CPK13 pourrait être au niveau transcriptionnel. Nous notons une intéressante sur-expression de CPK13 en cas de stress oxydatif ou froid (données "transcriptomiques" disponibles sur le site www.bar.utoronto.ca (Figure IV.18). Cependant, nous notons une intéressante sur-expression de CPK13 en cas de stress oxydatif ou froid (données "transcriptomiques" disponibles sur le site www.bar.utoronto.ca). En dépit du fait que cette kinase fait partie des quelques CPKs exprimées dans la cellule de garde, le rôle et les protéines-cibles de CPK13 dans les stomates sont essentiellement inconnus. Nous avons mis, ici, en évidence que CPK13 est capable de phosphoryler des peptides de KAT2 (une sous-unité constitutive des canaux Shaker exprimée dans la cellule de garde), avec un impact négatif fort sur l'activité des canaux potassiques impliquant cette sous-unité Shaker. Cet impact négatif pourrait, a priori, produire un phénotype stomatique. Dans la littérature, il a été montré que l'expression d'une sous-unité KAT2 dominante négative dans un fonds knock-out kat2$^-$ (lignée "kincless") avait, du fait de l'hétéromérisation préférentielle des sous-unités Shaker (Lebaudy et al. 2008a), un effet dominant négatif. Ce dernier est expliqué par une annulation de la conductance potassique entrante dans la cellule de garde, et un phénotype d'ouverture réduite des stomates (Lebaudy et al. 2008b). De fait, le phénotype d'une lignée que nous avons obtenue et qui surexprime CPK13 d'un facteur 2, montre un phénotype rappelant celui de la lignée kincless et même, sur le long terme, une croissance réduite en conditions d'éclairement intermittent. L'analyse de nos enregistrements électrophysiologiques suggère que l'effet de CPK13 sur KAT2 est un blocage de l'ouverture du canal (pas d'ouverture, au moins dans la gamme des potentiels physiologiques). Ce blocage des canaux KAT2 par CPK13 pourrait intervenir in planta dans les situations « stress » où le contrôle transcriptionel de CPK13 porte le niveau d'expression de ce gène au niveau de celui dans notre lignée mutante. Nous pouvons raisonnablement proposer que la fermeture stomatique observée en stress oxydatif ou froid puisse être en partie médiée par le blocage de KAT2 par CPK13. La vérification de cette hypothèse est une des perspectives immédiates de mon travail de thèse.

CPK6 stimule l'activité du canal KAT2

La surexpression de CPK6 chez les plantes augmente leur tolérance au stress salin (Xu et al. 2010). La réduction de l'ouverture stomatique (pour limiter la transpiration et l'appel de sève xylémienne chargée en sodium) n'est probablement qu'un des mécanismes sous-jacents à cette tolérance (Brandt et al., 2012). Toute amélioration de la sélectivité K^+/Na^+ des prélèvements ioniques effectués par les tissus vasculaires sur les sèves circulantes phloémienne et xylémienne est aussi susceptible d'améliorer la résistance au stress salin, ceci en limitant la dissémination du Na^+ dans les tissus (Jeanguenin et al., 2011). Plus particulièrement, l'amélioration de cette sélectivité au niveau des hydathodes (qui sont les exutoires foliaires du réseau xylémien) est un possible système de défense contre l'excès de Na^+. Nos travaux montrent (i) la superposition, précisément dans les tissus vasculaires et les hydathodes, de l'expression de KAT2 et CPK6 et (ii) et la stimulation, par CPK6 de KAT2, sous-unité constitutive de canaux d'influx hautement sélectifs de K^+ vis à vis de Na^+. Ces données supportent l'hypothèse que l'effet favorable de la surexpression de CPK6 sur la résistance au stress salin est en partie médiée par la stimulation de KAT2 par cette kinase. De plus, grâce à la "nouvelle" sonde calcique G5A exprimée dans une lignée que nous avons générée, nous avons établi qu'une vague calcique est rapidement propagée à tout le réseau vasculaire foliaire peu après l'application d'un stress salin aux racines. Cette spectaculaire signalisation calcique à longue distance pourrait expliquer la surexpression de CPK6 dans les tissus vasculaires et les hydahthodes en situation de stress salin.

Deux kinases différentes, une cible commune et des effets opposés

Non seulement les effets de CPK13 et CPK6 sont opposés (respectivement inhibition et stimulation de KAT2, Figure VI.1A) mais ils ne résultent pas d'un même mécanisme. Ceci peut être mis en évidence par une analyse des données électrophysiologiques obtenues en ovocyte de xénope. Le courant KAT2 résiduel en présence de CPK13 présente la même dépendance au voltage que celui en absence de la kinase (Figure VI.1B). L'effet de CPK6 sur KAT2 est différent, puisque les paramètres z et Ea50 sont significativement modifiés par la kinase (par la phosphorylation du canal) (Figure VI.1C et Tableau VI.1). Le calcul de ces paramètres en mélangeant les données avec et sans kinase donne un mauvais ajustement avec de mauvais résultats (indiqués en rouge, Tableau VI.1). La phosphorylation par CPK6 permet aux canaux KAT2 de s'ouvrir pour des potentiels moins négatifs (Ea50 passe de -166 mV à -149 mV en présence de la kinase, avec une augmentation de la valeur de z, qui va dans le même sens), ce qui explique l'augmentation du courant. D'une manière intéressante, le BAPTA (chélateur de Ca^{2+}, dont l'injection dans un ovocyte permet d'abaisser presque instantanément le Ca^{2+} libre dans cette cellule) est capable de supprimer rapidement l'effet activateur de CPK6 sur le courant KAT2. En effet, après injection de BAPTA, des ovocytes

exprimant KAT2+CPK6 ont le même niveau de courant que des ovocytes du même lot n'exprimant que KAT2 (Figure VI.1A). De plus, le BAPTA est sans effet sur le courant KAT2 des ovocytes exprimant le canal sans la kinase. Enfin, les paramètres de gating des canaux KAT2 après injection de BAPTA dans les ovocytes exprimant le canal avec CPK6 sont semblables à ceux des canaux KAT2 exprimés seuls (Cf. courbes de gating de la figure VI.1B et valeurs des paramètres du Tableau VI.1). Ces résultats sont intéressants à plusieurs titres. Tout d'abord, ils montrent que l'effet de CPK6 sur KAT2 correspond bien à une modification post-traductionnelle rapidement réversible, comme une phosphorylation, et non comme un effet sur l'adressage du canal. Si on admet cette hypothèse (la plus logique) comme très probablement juste, nous tirons la conclusion que la coexpression avec CPK6 ne modifie pas le niveau d'expression du canal; ce qui est généralement une supposition implicite de ce genre d'expérience, supposition qu'il est rare de pouvoir vérifier.

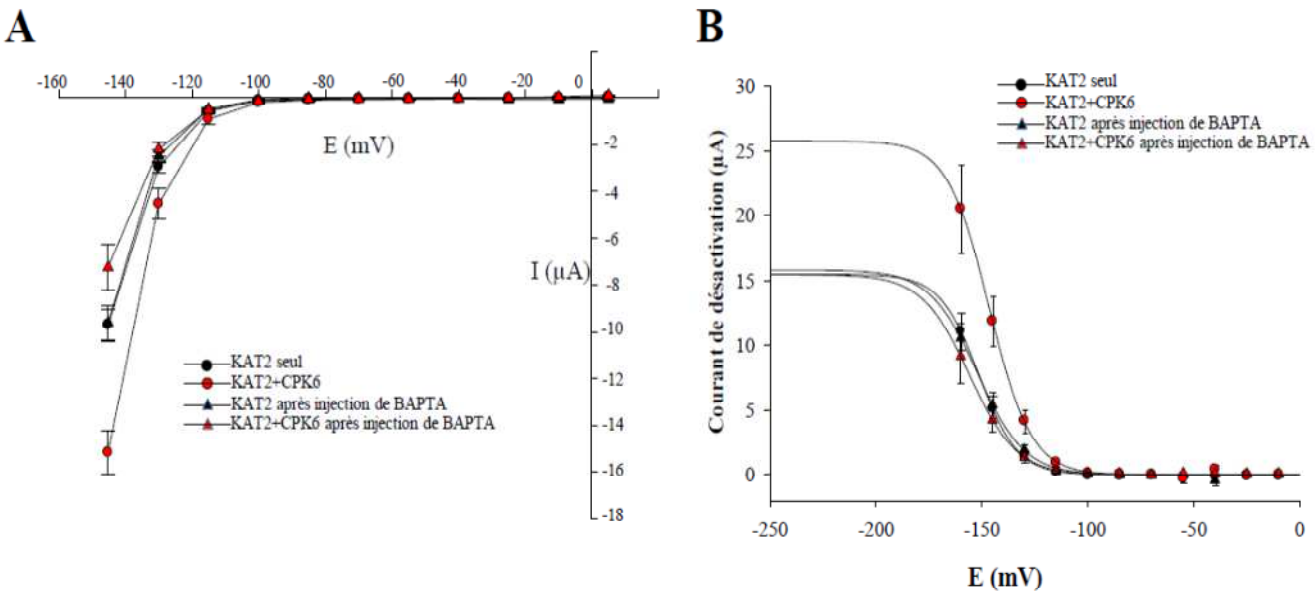


Figure VI.1 : Analyses des paramètres électrophysiologiques des canaux KAT2 en présence de CPK6 en réponse au BAPTA.
A. Courbe IV enregistrés avec les ovocytes expriment simplement KAT2 (cercles noirs) avant l'injection de BAPTA ou (triangles noirs) après l'injection de BAPTA, en co-exprimant KAT2 et CPK6 (cercles rouges) avant l'injection de BAPTA ou (triangles rouges) après l'injection de BAPTA. B. Courants de désactivation des canaux KAT2 avec ou sans CPK13 enregistrés en fonction du potentiel des membranes allant de 0 à -160 mV. Les courants obtenus de -160 mV à -250 mV proviennent d'un ajustement de la courbe obtenue depuis les résultats expérimentaux, grâce à l'équation de Boltzmann. A partir de cet ajustement, les paramètres Imax (courant maximal à -250 mV), z (pente de la courbe, charge apparente de « gating ») et Ea50 (potentiel de demi-activation des canaux) sont déterminés.

Tableau VI.1 : Paramètres électrophysiologiques des canaux KAT2 en présence de CPK6 en réponse au BAPTA.
Les paramètres Imax (courant maximal à -250 mV), z (pente de la courbe, charge apparente de « gating ») et Ea50 (potentiel de demi-activation des canaux) sont montrés dans ce tableau, ils sont calculé pour chaque ajustement. Les valeurs de l'erreur standard de chaque ajustement sont également présentées dans ce tableau

	Ajustement courbe KAT2	Ajustement courbe KAT2 + BAPTA	Ajustement courbe KAT2+CPK6	Ajustement courbe KAT2+CPK6+BAPTA
z	2.3079	2.8061	2.5895	2.3045
Ea50	-152.1700	-151.4000	-146.4700	-155.8000
Imax	15.8186	15.4884	25.7784	15.4793
Erreur standard de l'ajustement	0.1470	0.0947	0.3071	0.0933

Nous ignorons si CPK13 agit également sur les canaux à la membrane en les bloquant par phosphorylation, mais nous supposerons cela. Dans ces conditions, le fait que les deux kinases aient sur une même cible des effets opposés suggère que les sites de phosphorylation par lequel elles produisent ces effets contraires sont différents. Les données obtenues avec les puces (Figures. IV.6B et V.8B, respectivement pour CPK13 et CPK6) montrent de nombreux peptides de KAT2 qui semblent des cibles communes à ces deux kinases (Figure VI.2). Nous avons tenté sans succès de repérer des cibles propres à l'une ou l'autre de ces kinases. Ceci ne pourrait se fonder que sur une comparaison du "marquage" des spots sur les autoradiographies disponibles. Il nous semble hasardeux de procéder à une telle analyse quantitative sur des autoradiographies obtenues après des expériences indépendantes pour lesquelles le bruit de fond est différent et dont les temps de révélation étaient différents. Pour procéder à une telle analyse et espérer l'identification de spots différentiellement marqués par CPK13 et CPK6, il conviendrait de construire un protocole expérimental adapté. Dans l'immédiat, la similitude des listes de cibles des deux kinases parmi les peptides de KAT2, listes parmi lesquelles nous notons plusieurs peptides comportant plusieurs sites de phosphorylation potentiels, suggère que peut-être des sites de phosphorylation différents au sein de ces peptides sont ciblés par les deux kinases. La phosphorylation de résidus différents pourrait expliquer les effets opposés des deux kinases.

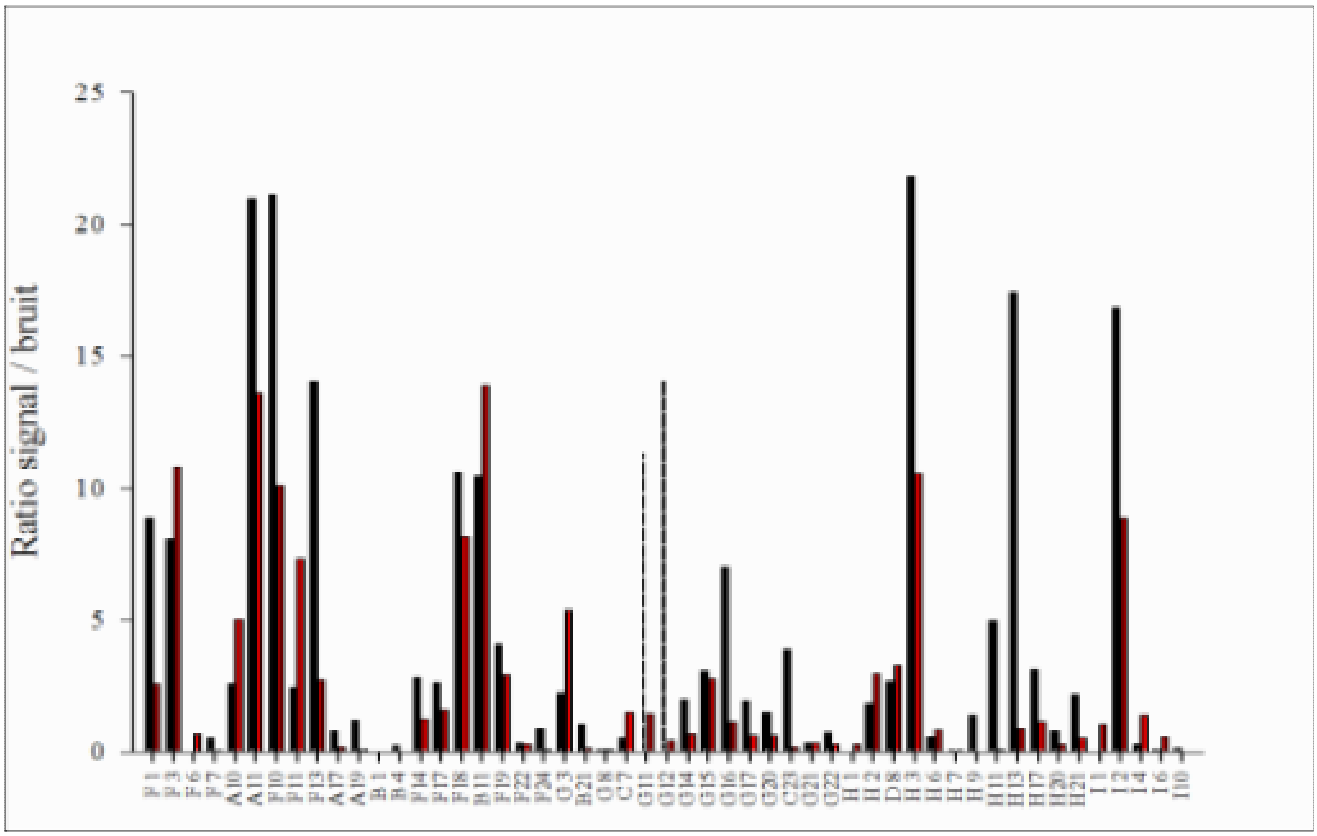


Figure VI.2 : Analyses comparatives des peptides de KAT2 phosphorylés par CPK13 et CPK6.
Ratio signal sur bruit de la phosphorylation des peptides de KAT2 par CPK13 (barres rouges) et par CPK6 (barres noires). Les faux signaux sont hachurés

D'autre part, il nous a semblé intéressant de tester l'effet de la co-expression des deux kinases en même temps sur le canal KAT2. Sur un même lot d'ovocytes, nous avons exprimé KAT2 seul ; KAT2 avec CPK6 ; KAT2 avec CK13 ou encore KAT2 avec CPK6+CPK13. Nos résultats (préliminaires) sont montrés dans la figure VI.3. Pour les trois premiers cas, nous retrouvons des résultats semblables à ceux des expériences précédentes (Figures IV.2 et V.6B), avec un blocage ou une stimulation nets de KAT2 par CPK13 ou CPK6. Logiquement, pour le dernier cas, la kinase bloqueuse l'emporte sur la kinase stimulatrice, confirmant CPK13 comme effecteur négatif puissant, tel que l'indiquaient les observations des stomates en présence de fusicoccine (Tableau IV.15B).

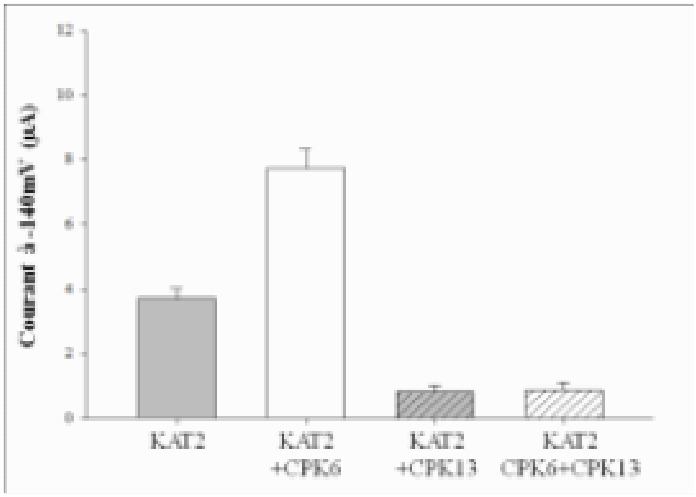


Figure VI.3 : Courants enregistrés en TEVC sur des ovocytes co-exprimant KAT2 et les deux CPKs.
Courants ioniques enregistrés à -140 mV sur des ovocytes exprimant simplement KAT2 (barre grise), co-exprimant KAT2+CPK6 (barre blanche), co-exprimant KAT2+CPK13 (barre grise hachurée) ou co-exprimant KAT2+CPK6+CPK13 (barre blanche hachurée).

De plus, des expériences de PCR quantitatives sur les lignées surexprimant CPK13 et CPK6 indiquent que l'expression de CPK6 est augmentée dans la lignée ox-CPK13 alors que l'expression de CPK13 est inchangée dans la lignée ox-CPK6 (Figure VI.4). Ces données confirment l'hypothèse que le contrôle de l'expression de CPK13 mais aussi celui de son activité sont très robuste. Une légère modification de l'expression de CPK13 peut donc suffire suffit à engendrer un effet significatif puisque cette kinase n'est ni régulée par le Ca^{2+} ni par le pH. Pour CPK6, les fluctuations de l'expression, à elles seules, auraient peut-être moins d'impact sur les cibles de cette kinase, puisqu'elle nécessite du Ca^{2+} pour être active. L'augmentation de l'expression de CPK6 dans la lignée ox-CPK13 suggère une certaine compensation pour contre balancer l'effet CPK13.

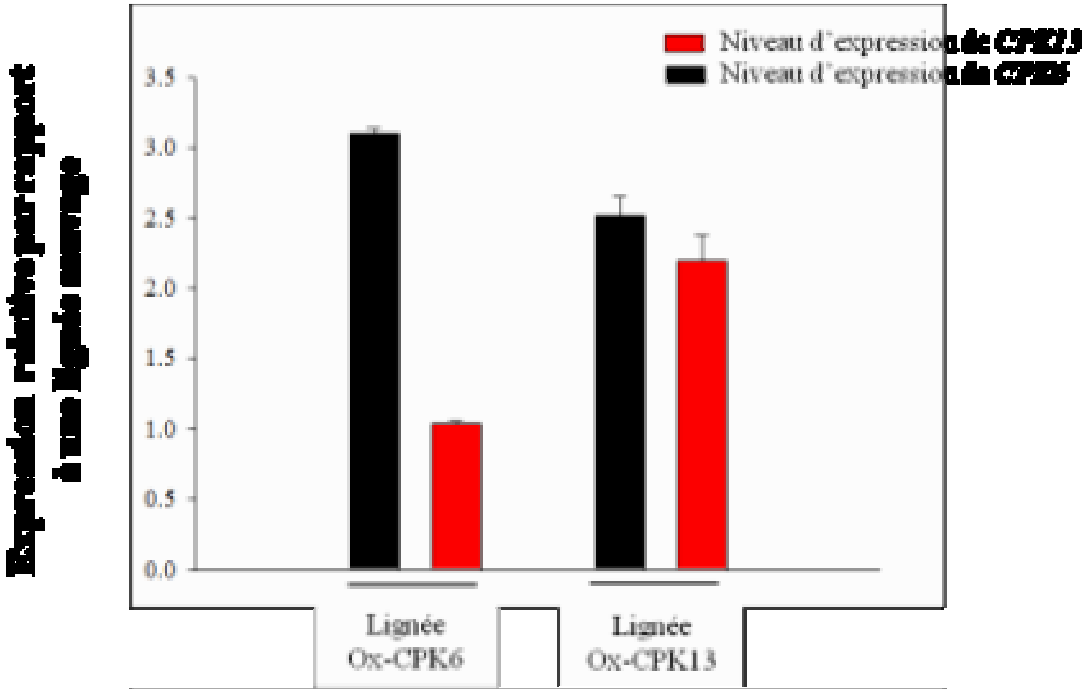


Figure VI. 4 : Expression de CPK6 et CPK13 dans les deux lignées sur-expresseurs ox-CPK6 et ox-CPK13.
L'expression relative de CPK13 et CPK6 est estimée par PCR quantitative réalisée sur feuille de plantes âgées de 3 à 4 semaines appartenant aux lignées ox-CPK6, ox-CPK13 et une lignée sauvage. L'expression relative correspond au ratio de l'expression de CPK6 ou CPK13 dans les lignées sur-expresseurs par rapport à la lignée sauvage.

Les perspectives à long terme, de ce travail comprennent évidemment la détermination du (ou des) site(s) de phosphorylation chez KAT2 par chacune des deux kinases CPK13 et CPK6. Ceci pourra éventuellement mettre en jeu de nouvelles puces à peptides construites exclusivement autour des peptides de KAT2 repérés comme phosphorylés sur notre première série de puces. La matrice de 384 spots offrirait, a priori, la possibilité de fixer sur la lame, en plus des peptides de séquence native, tous les peptides mutants nécessaires à lever les ambiguïtés (pour les peptides comportant plusieurs résidus phosphorylables). Une automatisation (analyse d'image informatisée) de l'analyse des autoradiogrammes serait à envisager. En dépit des difficultés dues notamment aux imperfections de la fabrication des lames à peptides et à la structure dénaturée des peptides fixés sur la lame (inhérente à cette méthode), nous pensons que cette méthode reste plus la accessible et la

plus fructueuse. En effet, s'agissant de protéines membranaires naturellement peu abondantes comme les canaux KAT2, des analyses de phosphoprotéomique seraient peut-être moins fructueuses.

Un autre objectif qui pourrait être fixé à la suite de ce travail serait l'identification d'une phosphatase responsable in planta de la réversion des effets de ces kinases sur KAT2. Dans l'ovocyte, nous savons qu'une activité phosphatase endogène parvient à cibler KAT2 : ceci est montré par la perte rapide de courant KAT2 après injection de BAPTA dans les ovocytes exprimant CPK6, perte de courant qui provient logiquement d'une déphosphorylation. On se doute qu'in planta, une phosphatase est probablement capable de réverser l'effet des kinases CPK13 et CPK6, et son identification serait intéressante. On notera que CPK6, mais pas CPK13, est capable de phosphoryler la phosphatase AtPP2CA (analyse des autoradiogrammes de la figure III.6). Rappelons que AtPP2CA est un régulateur négatif de voies ABA dépendantes (Brandt et al., 2012).

S'agissant de CPK13, les données sur son contrôle transcriptionnel restent très insuffisantes et le même constat peut-être fait pour la régulation post-traductionnelle de cette CPK atypique insensible au Ca^{2+} et au pH. Il conviendrait de rechercher (outre une phosphatase comme mentionné ci-dessus) des facteurs de régulation de l'activité de cette kinase.

En conclusion, ce projet a été l'occasion de la mise en place de nombreux outils (collection de constructions et de lignées, introduction de méthodologies nouvelles…) parmi lesquels l'imagerie "rapide" d'événements calciques sur plantes entières (sonde G5A) apparaît comme très prometteuse. Ce travail de thèse a permis, de manière originale, d'identifier une protéine-cible (KAT2) pour deux kinases d'une même famille (CPKs) ayant des effets opposés (CPK13 et CPK6) avec des indications d'effets physiologiques, notamment en situation de stress. Ce travail ouvre donc d'intéressantes perspectives de recherche.

Références

-A-

Ache, P., Becker, D., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M.R., and Hedrich, R. (2000). GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of Arabidopsis thaliana, is a K(+)-selective, K(+)-sensing ion channel. FEBS Lett 486:93-98.

Anderson, J.A., Huprikar, S.S., Kochian, L.V., Lucas, W.J., and Gaber, R.F. (1992). Functional expression of a probable Arabidopsis thaliana potassium channel in Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci U S A 89:3736-3740.

Anil, V.S., Harmon, A.C., and Rao, K.S. (2000). Spatio-temporal accumulation and activity of calcium-dependent protein kinases during embryogenesis, seed development, and germination in sandalwood. Plant Physiol 122:1035-1043.

Arimura, G., and Maffei, M.E. (2010). Calcium and secondary CPK signaling in plants in response to herbivore attack. Biochem Biophys Res Commun 400:455-460.

Asano, T., Hayashi, N., Kikuchi, S., and Ohsugi, R. (2012). CDPK-mediated abiotic stress signaling. Plant Signal Behav 7:817-821.

Assmann, S.M., and Zeiger, E. (1985). Stomatal Responses to CO(2) in Paphiopedilum and Phragmipedium: Role of the Guard Cell Chloroplast. Plant Physiol 77:461-464.

Assmann, S.M., and Schwartz, A. (1992). Synergistic effect of light and fusicoccin on stomatal opening : epidermal peel and patch clamp experiments. Plant Physiol 98:1349-1355.

Assmann, S.M., and Haubrick, L.L. (1996). Transport proteins of the plant plasma membrane. Current Opinion in Cell Biology 8:458-467.

-B-

Baizabal-Aguirre, V.M., Clemens, S., Uozumi, N., and Schroeder, J.I. (1999). Suppression of inward-rectifying K^+ channels KAT1 and AKT2 by dominant negative point mutations in the KAT1 alpha-subunit. J Membr Biol 167:119-125.

Batistic, O., and Kudla, J. (2012). Analysis of calcium signaling pathways in plants. Biochim Biophys Acta 1820:1283-1293.

Baubet V., Le Mouellic H., Campbell AK., Lucas-Meunier E., Fossier P., Brulet P. (2000). Chimeric green luorescent protein-aequorin as bioluminescent Ca^{2+} reporters at the single-cell level. Proc Natl Acad Sci U S A 97(13):7260-5.

Benetka, W., Mehlmer, N., Maurer-Stroh, S., Sammer, M., Koranda, M., Neumuller, R., Betschinger, J., Knoblich, J.A., Teige, M., and Eisenhaber, F. (2008). Experimental testing of predicted myristoylation targets involved in asymmetric cell division and calcium-dependent signalling. Cell Cycle 7:3709-3719.

Berkowitz, G., Zhang, X., Mercie, R., Leng, Q., and Lawton, M. (2000). Co-expression of calcium-dependent protein kinase with the inward rectified guard cell K^+ channel KAT1 alters current parameters in Xenopus laevis oocytes. Plant Cell Physiol 41:785-790.

Berridge, M.J. (1997). Elementary and global aspects of calcium signalling. J Exp Biol 200:315-319.

Besson-Bard, A., Courtois, C., Gauthier, A., Dahan, J., Dobrowolska, G., Jeandroz, S., Pugin, A., and Wendehenne, D. (2008). Nitric oxide in plants: production and cross-talk with Ca^{2}+ signaling. Mol Plant 1:218-228.

Bezanilla, F., and Perozo, E. (2003). The voltage sensor and the gate in ion channels. Adv Protein Chem 63:211-241.

Blatt, M. (1988). Potassium-dependent, bipolar gating of K^+ channels in guard cells. J Membr Biol 102:235-246.

Bose, J., Pottosin, II, Shabala, S.S., Palmgren, M.G., and Shabala, S. (2011). Calcium efflux systems in stress signaling and adaptation in plants. Front Plant Sci 2:85.

Boudsocq, M., Droillard, M.J., Regad, L., and Lauriere, C. (2012). Characterization of Arabidopsis calcium-dependent protein kinases: activated or not by calcium? Biochem J 447:291-299.

Boudsocq, M., and Sheen, J. (2013). CDPKs in immune and stress signaling. Trends Plant Sci 18:30-40.

Brandt, B., Brodsky, D.E., Xue, S., Negi, J., Iba, K., Kangasjarvi, J., Ghassemian, M., Stephan, A.B., Hu, H., and Schroeder, J.I. (2012). Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action. Proc Natl Acad Sci U S A 109:10593-10598.

Butt, A.D., Blatt, M.R., and Ainsworth, C.C. (1997). Expression, evolution and genomic complexity of potassium ion channel genes of Arabidopsis thaliana. J Plant Physiol 150:652-660.

-C-

Cao, Y., Ward, J.M., Kelly, W.B., Ichida, A.M., Gaber, R.F., Anderson, J.A., Uozumi, N., Schroeder, J.I., and Crawford, N.M. (1995). Multiple genes, tissue specificity, and expression-dependent modulation contribute to the functional diversity of potassium channels in Arabidopsis thaliana. Plant Physiol 109:1093-1106.

Camomi L., Harper JF., Palmgren MG. (1998). 14-3-3 proteins activate a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK). Febs Letters 430:381-384.

Chen, Z., Pottosin, I.I., Cuin, T.A., Fuglsang, A.T., Tester, M., Jha, D., Zepeda-Jazo, I., Zhou, M., Palmgren, M.G., Newman, I.A., et al. (2007). Root Plasma Membrane Transporters Controlling K^+/Na^+ Homeostasis in Salt-Stressed Barley. Plant Physiol 145:1714-1725.

Cheng, S.H., Willmann, M.R., Chen, H.C., and Sheen, J. (2002). Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family. Plant Physiol 129:469-485.

Cherel, I. (2004). Regulation of K^+ channel activities in plants: from physiological to molecular aspects. J Exp Bot 55:337-351.

Clarkson, and Hanson. (1980). The mineral nutrition of higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol 31:239-298.

Clarkson, D.T. (1993). Roots and the Delivery of Solutes to the Xylem. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences 341:5-17.

-D-

Daram, P., Urbach, S., Gaymard, F., Sentenac, H., and Cherel, I. (1997). Tetramerization of the AKT1 plant potassium channel involves its C-terminal cytoplasmic domain. Embo J 16:3455-3463.

Day, I., Reddy, V., Shad Ali, G., and Reddy, A. (2002). Analysis of EF-hand-containing proteins in Arabidopsis. Genome Biology 3:research0056.0051 - research0056.0024.

Deeken, R., Sanders, C., Ache, P., and Hedrich, R. (2000). Developmental and light-dependent regulation of a phloem-localised K+ channel of Arabidopsis thaliana. Plant J 23:285-290.

Deeken, R., Geiger, D., Fromm, J., Koroleva, O., Ache, P., Langenfeld-Heyser, R., Sauer, N., May, S.T., and Hedrich, R. (2002). Loss of the AKT2/3 potassium channel affects sugar loading into the phloem of Arabidopsis. Planta 216:334-344.

Demidchik, V., Cuin, T.A., Svistunenko, D., Smith, S.J., Miller, A.J., Shabala, S., Sokolik, A., and Yurin, V. (2010). Arabidopsis root K^+-efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. J Cell Sci 123:1468-1479.

Dietrich, P., Sanders, D., and Hedrich, R. (2001). The role of ion channels in light-dependent stomatal opening. J Exp Bot 52:1959-1967.

Dixit, A.K., and Jayabaskaran, C. (2012). Phospholipid mediated activation of calcium dependent protein kinase 1 (CaCDPK1) from chickpea: a new paradigm of regulation. PLoS One 7:e51591.

Dodd, A.N., Kudla, J., and Sanders, D. (2010). The language of calcium signaling. Annu Rev Plant Biol 61:593-620.

Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (1998). The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K^+ Conduction and Selectivity. Science 280:69-77.

Dreyer, I., Michard, E., Lacombe, B., and Thibaud, J.B. (2001). A plant Shaker-like K^+ channel switches between two distinct gating modes resulting in either inward-rectifying or "leak" current. FEBS Lett 505:233-239.

Duby, G., Hosy, E., Fizames, C., Alcon, C., Costa, A., Sentenac, H., and Thibaud, J.B. (2008). AtKC1, a conditionally targeted Shaker-type subunit, regulates the activity of plant K^+ channels. Plant J 53:115-123.

Dumont, J.N. (1972). Oogenesis in Xenopus laevis (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. Journal of Morphology 136:153-179.

-E-

Ehrhardt, T., Zimmermann, S., and Muller-Rober, B. (1997). Association of plant K^+(in) channels is mediated by conserved C-termini and does not affect subunit assembly. FEBS Lett 409:166-170.

Estruch, J.J., Kadwell, S., Merlin, E., and Crossland, L. (1994). Cloning and characterization of a maize pollen-specific calcium-dependent calmodulin-independent protein kinase. Proc Natl Acad Sci U S A 91:8837-8841.

-F-

Felle, H.H., Hanstein, S., Steinmeyer, R., and 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.

Fischer, R.A., and Hsiao, T.C. (1968). Stomatal Opening in Isolated Epidermal Strips of Vicia faba. II. Responses to KCl Concentration and the Role of Potassium Absorption. Plant Physiol 43:1953-1958.

-G-

Gajdanowicz, P., Michard, E., Sandmann, M., Rocha, M., Correa, L.G., Ramirez-Aguilar, S.J., Gomez-Porras, J.L., Gonzalez, W., Thibaud, J.B., van Dongen, J.T., et al. (2011). Potassium (K^+) gradients serve as a mobile energy source in plant vascular tissues. Proc Natl Acad Sci U S A 108:864-869.

Galon, Y., Finkler, A., and Fromm, H. (2010). Calcium-regulated transcription in plants. Mol Plant 3:653-669.

Gandhi, C.S., Clark, E., Loots, E., Pralle, A., and Isacoff, E.Y. (2003). The Orientation and Molecular Movement of a K^+ Channel Voltage-Sensing Domain. Neuron 40:515-525.

Ganguly, S., and Singh, M. (1999). Purification and characterization of a protein phosphatase from winged bean. Phytochemistry 52:239-246.

Gaymard, F., Cerutti, M., Horeau, C., Lemaillet, G., Urbach, S., Ravallec, M., Devauchelle, G., Sentenac, H., and 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-Ferriere, N., Thibaud, J.B., and 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.

Geiger, D., Becker, D., Lacombe, B., and Hedrich, R. (2002). Outer pore residues control the H(+) and K(+) sensitivity of the Arabidopsis potassium channel AKT3. Plant Cell 14:1859-1868.

Geiger, D., Becker, D., Vosloh, D., Gambale, F., Palme, K., Rehers, M., Anschuetz, U., Dreyer, I., Kudla, J., and Hedrich, R. (2009). Heteromeric AtKC1{middle dot}AKT1 channels in Arabidopsis roots facilitate growth under K+-limiting conditions. J Biol Chem 284:21288-21295.

Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Marten, I., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Wellmann, C., Al-Rasheid, K.A., Grill, E., et al. (2010). Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca2+ affinities. Proc Natl Acad Sci U S A 107:8023-8028.

Grabov, A., and Blatt, M.R. (1998). Membrane voltage initiates Ca^{2+} waves and potentiates Ca^{2}+ increases with abscisic acid in stomatal guard cells. Proc Natl Acad Sci U S A 95:4778-4783.

-H-

Hamada, H., Kurusu, T., Okuma, E., Nokajima, H., Kiyoduka, M., Koyano, T., Sugiyama, Y., Okada, K., Koga, J., Saji, H., et al. (2012). Regulation of a Proteinaceous Elicitor-induced Ca^{2+} Influx and Production of Phytoalexins by a Putative Voltage-gated Cation Channel, OsTPC1, in Cultured Rice Cells. J Biol Chem 287:9931-9939.

Harmon, A.C., Gribskov, M., and Harper, J.F. (2000). CDPKs - a kinase for every Ca^{2+} signal? Trends Plant Sci 5:154-159.

Harper, J.F., Breton, G., and Harmon, A. (2004). Decoding Ca(2+) signals through plant protein kinases. Annu Rev Plant Biol 55:263-288.

Harper, J.F., Huang, J.-F., and Lloyd, S.J. (1994). Genetic Identification of an Autoinhibitor in CDPK, a Protein Kinase with a Calmodulin-like Domain. Biochemistry 33:7267-7277.

Harper, J.F., Sussman, M.R., Schaller, G.E., Putnam-Evans, C., Charbonneau, H., and Harmon, A.C. (1991). A calcium-dependent protein kinase with a regulatory domain similar to calmodulin. Science 252:951-954.

Hashimoto, K., Eckert, C., Anschutz, U., Scholz, M., Held, K., Waadt, R., Reyer, A., Hippler, M., Becker, D., and Kudla, J. (2012). Phosphorylation of calcineurin B-like (CBL) calcium sensor proteins by their CBL-interacting protein kinases (CIPKs) is required for full activity of CBL-CIPK complexes toward their target proteins. J Biol Chem 287:7956-7968.

Hashimoto, K., and Kudla, J. (2011). Calcium decoding mechanisms in plants. Biochimie 93:2054-2059.

Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., and MacKinnon, R. (1994). Mutations in the K^{+} channel signature sequence. Biophys J 66:1061-1067.

Held, K., Pascaud, F., Eckert, C., Gajdanowicz, P., Hashimoto, K., Corratge-Faillie, C., Offenborn, J.N., Lacombe, B., Dreyer, I., Thibaud, J.B., et al. (2011). Calcium-dependent modulation and plasma membrane targeting of the AKT2 potassium channel by the CBL4/CIPK6 calcium sensor/protein kinase complex. Cell Res 21:1116-1130.

Hepler, P.K., Kunkel, J.G., Rounds, C.M., and Winship, L.J. (2012). Calcium entry into pollen tubes. Trends Plant Sci 17:32-38.

Hirsch, R.E., Lewis, B.D., Spalding, E.P., and Sussman, M.R. (1998). A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. Science 280:918-921.

Ho, C.-H., Lin, S.-H., Hu, H.-C., and Tsay, Y.-F. (2009). CHL1 Functions as a Nitrate Sensor in Plants. Cell 138:1184-1194.

Hosoi, S., Iino, M., and Shimazaki, K.-i. (1988). Outward-Rectifying K+ Channels in Stomatal Guard Cell Protoplasts. Plant and Cell Physiology 29:907-911.

Hosy, E., Vavasseur, A., Mouline, K., Dreyer, I., Gaymard, F., Poree, F., Boucherez, J., Lebaudy, A., Bouchez, D., Very, A.A., et al. (2003a). The Arabidopsis outward K^{+} channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. Proc Natl Acad Sci U S A 100:5549-5554.

Hosy, E., Vavasseur, A., Mouline, K., Dreyer, I., Gaymard, F., Poree, F., Boucherez, J., Lebaudy, A., Bouchez, D., Very, A.A., et al. (2003b). The Arabidopsis outward K^+ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. Proc Natl Acad Sci U S A 100:5549-5554.

Hoth, S., and Hedrich, R. (1999). Distinct Molecular Bases for pH Sensitivity of the Guard Cell K^+ Channels KST1 and KAT1. J Biol Chem 274:11599-11603.

Hubbard, K.E., Siegel, R.S., Valerio, G., Brandt, B., and Schroeder, J.I. (2012). Abscisic acid and CO_2 signalling via calcium sensitivity priming in guard cells, new CDPK mutant phenotypes and a method for improved resolution of stomatal stimulus-response analyses. Ann Bot 109:5-17.

-J-

Jammes, F., Hu, H.C., Villiers, F., Bouten, R., and Kwak, J.M. (2011). Calcium-permeable channels in plant cells. Febs J 278:4262-4276.

Jeanguenin, L., Alcon, C., Duby, G., Boeglin, M., Chérel, I., Gaillard, I., Zimmermann, S., Sentenac, H., and Véry, A.-A. (2011). AtKC1 is a general modulator of Arabidopsis inward Shaker channel activity. Plant J 67:570-582.

Joshi-Saha, A., Valon, C., and Leung, J. (2011). A brand new START: abscisic acid perception and transduction in the guard cell. Sci Signal 4:re4.

-K-

Kader, M.A., and Lindberg, S. (2010). Cytosolic calcium and pH signaling in plants under salinity stress. Plant Signal Behav 5:233-238.

Kanchiswamy CN., Takahashi H., Quadro S., Maffei ME., Bossi S., Bertea C., Zebelo SA., Muroi A., Ishihama N., Yoshioka H., Boland W., Takabayashi J., Endo Y., Sawasaki T., Arimura GI.,. (2010) Regulation of Arabidopsis defense responses against Spodoptera littoralis by CPK-mediated calcium signaling. BMC Plant Biology 10:97

Ketchum, K.A., and Slayman, C.W. (1996). Isolation of an ion channel gene from Arabidopsis thaliana using the H5 signature sequence from voltage-dependent K+ channels. FEBS Lett 378:19-26.

Kim, M.C., Chung, W.S., Yun, D.J., and Cho, M.J. (2009). Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants. Mol Plant 2:13-21.

Kim, T.H., Bohmer, M., Hu, H., Nishimura, N., and Schroeder, J.I. (2010). Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO_2, and Ca^{2+} signaling. Annu Rev Plant Biol 61:561-591.

Kolukisaoglu, Ü., Weinl, S., Blazevic, D., Batistic, O., and Kudla, J. (2004). Calcium Sensors and Their Interacting Protein Kinases: Genomics of the Arabidopsis and Rice CBL-CIPK Signaling Networks. Plant Physiol 134:43-58.

Konrad, K.R., Wudick, M.M., and Feijo, J.A. (2011). Calcium regulation of tip growth: new genes for old mechanisms. Curr Opin Plant Biol 14:721-730.

Kudla, J., Batistic, O., and Hashimoto, K. (2010). Calcium signals: the lead currency of plant information processing. Plant Cell 22:541-563.

Kurusu, T., Kuchitsu, K., Nakano, M., Nakayama, Y., and Iida, H. (2013). Plant mechanosensing and Ca^{2+} transport. Trends Plant Sci 18:227-233.

-L-

Lacombe, B., Pilot, G., Gaymard, F., Sentenac, H., and Thibaud, J.B. (2000a). pH control of the plant outwardly-rectifying potassium channel SKOR. FEBS Lett 466:351-354.

Lacombe, B., Pilot, G., Michard, E., Gaymard, F., Sentenac, H., and Thibaud, J.B. (2000b). A shaker-like K(+) channel with weak rectification is expressed in both source and sink phloem tissues of Arabidopsis. Plant Cell 12:837-851.

Lagarde, D., Basset, M., Lepetit, M., Conejero, G., Gaymard, F., Astruc, S., and Grignon, C. (1996). Tissue-specific expression of Arabidopsis AKT1 gene is consistent with a role in K^+ nutrition. Plant J 9:195-203.

Landy, A. (1989). Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of lambda Site-Specific Recombination. Ann Rev Bioch 58:913-941.

Latz, A., Mehlmer, N., Zapf, S., Mueller, T.D., Wurzinger, B., Pfister, B., Csaszar, E., Hedrich, R., Teige, M., and Becker, D. (2013a). Salt Stress Triggers Phosphorylation of the Arabidopsis Vacuolar K^+ Channel TPK1 by Calcium-Dependent Protein Kinases (CDPKs). Mol Plant 6:1274-1289.

Lebaudy, A., Hosy, E., Simonneau, T., Sentenac, H., Thibaud, J.B., and Dreyer, I. (2008a). Heteromeric K^+ channels in plants. Plant J 54:1076-1082.

Lebaudy, A., Vavasseur, A., Hosy, E., Dreyer, I., Leonhardt, N., Thibaud, J.B., Very, A.A., Simonneau, T., and Sentenac, H. (2008b). Plant adaptation to fluctuating environment and biomass production are strongly dependent on guard cell potassium channels. Proc Natl Acad Sci U S A 105:5271-5276.

Lebaudy, A., Véry, A.-A., and Sentenac, H. (2007). K^+ channel activity in plants: Genes, regulations and functions. FEBS Lett 581:2357-2366.

Lebaudy, A., Pascaud, F., Very, A.A., Alcon, C., Dreyer, I., Thibaud, J.B., and Lacombe, B. (2010). Preferential KAT1-KAT2 heteromerization determines inward K^+ current properties in Arabidopsis guard cells. J Biol Chem 285:6265-6274.

Leigh, R., and Jones, R.W. (1984). A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. New Phytol 97:1-13.

Leonhardt, N., Kwak, J.M., Robert, N., Waner, D., Leonhardt, G., and Schroeder, J.I. (2004). Microarray expression analyses of Arabidopsis guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. Plant Cell 16:596-615.

Li, J., Julie Lee, Y.-R., and Assmann, S.M. (1998). Guard Cells Possess a Calcium-Dependent Protein Kinase That Phosphorylates the KAT1 Potassium Channel. Plant Physiol 116:785-795.

Li, L., Kim, B.-G., Cheong, Y.H., Pandey, G.K., and Luan, S. (2006). A Ca^{2+} signaling pathway regulates a K^+ channel for low-K response in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences 103:12625-12630.

Liu, J., and Zhu, J.-K. (1998). A Calcium Sensor Homolog Required for Plant Salt Tolerance. Science 280:1943-1945.

Lohse, G., and Hedrich, R. (1992). Characterization of the plasma-membrane H^+-ATPase from Vicia faba guard cells. Planta 188:206-214.

Luan, S. (2009). The CBL–CIPK network in plant calcium signaling. Trends Plant Sci 14:37-42.

-M-

Ma, S.Y., and Wu, W.H. (2007). AtCPK23 functions in Arabidopsis responses to drought and salt stresses. Plant Mol Biol 65:511-518.

Ma, W., Smigel, A., Verma, R., and Berkowitz, G.A. (2009). Cyclic nucleotide gated channels and related signaling components in plant innate immunity. Plant Signal Behav 4:277-282.

Ma, W. (2011). Roles of Ca^{2+} and cyclic nucleotide gated channel in plant innate immunity. Plant Sci 181:342-346.

MacRobbie, E.A. (1998). Signal transduction and ion channels in guard cells. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 353:1475-1488.

Marten, I., Hoth, S., Deeken, R., Ache, P., Ketchum, K.A., Hoshi, T., and Hedrich, R. (1999). AKT3, a phloem-localized K^+ channel, is blocked by protons. Proc Natl Acad Sci U S A 96:7581-7586.

Martin JR., Rogers KL., Chagneau C. Brulet P. (2007). In vivo bioluminescence imaging of Ca^{2+} signalling in the brain of Drosophila. Plos One 2(3):e275.

Mäser, P., Thomine, S., Schroeder, J.I., Ward, J.M., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I.N., Amtmann, A., Maathuis, F.J.M., Sanders, D., et al. (2001). Phylogenetic Relationships within Cation Transporter Families of Arabidopsis. Plant Physiol 126:1646-1667.

Mazars, C., Thuleau, P., Lamotte, O., and Bourque, S. (2010). Cross-Talk between ROS and Calcium in Regulation of Nuclear Activities. Mol Plant 3:706-718.

Mazars, C., Briere, C., Bourque, S., and Thuleau, P. (2011). Nuclear calcium signaling: an emerging topic in plants. Biochemistry 93:2068-2074.

McAinsh, M.R., and Pittman, J.K. (2009). Shaping the calcium signature. New Phytol 181:275-294.

Michard, E., Lacombe, B., Poree, F., Mueller-Roeber, B., Sentenac, H., Thibaud, J.B., and Dreyer, I. (2005). A unique voltage sensor sensitizes the potassium channel AKT2 to phosphoregulation. J Gen Physiol 126:605-617.

Monshausen, G.B., and Gilroy, S. (2009). Feeling green: mechanosensing in plants. Trends Cell Biol 19:228-235.

Mori, I.C., Murata, Y., Yang, Y., Munemasa, S., Wang, Y.F., Andreoli, S., Tiriac, H., Alonso, J.M., Harper, J.F., Ecker, J.R., et al. (2006). CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca(2+)-permeable channels and stomatal closure. PLoS Biol 4:e327.

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

Munemasa, S., Hossain, M.A., Nakamura, Y., Mori, I.C., and Murata, Y. (2011). The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase, CPK6, functions as a positive regulator of methyl jasmonate signaling in guard cells. Plant Physiol 155:553-561.

-O-

Obrdlik, P., El-Bakkoury, M., Hamacher, T., Cappellaro, C., Vilarino, C., Fleischer, C., Ellerbrok, H., Kamuzinzi, R., Ledent, V., Blaudez, D., et al. (2004). K^+ channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane protein interactions. Proc Natl Acad Sci U S A 101:12242-12247.

-P-

Peiter, E. (2011). The plant vacuole: emitter and receiver of calcium signals. Cell Calcium 50:120-128.

Perochon, A., Aldon, D., Galaud, J.P., and Ranty, B. (2011). Calmodulin and calmodulin-like proteins in plant calcium signaling. Biochemistry 93:2048-2053.

Pilot, G., Lacombe, B., Gaymard, F., Cherel, I., Boucherez, J., Thibaud, J.B., and Sentenac, H. (2001a). Guard cell inward K+ channel activity in Arabidopsis involves expression of the twin channel subunits KAT1 and KAT2. J Biol Chem 276:3215-3221.

Pilot, G., Gaymard, F., Mouline, K., Cherel, I., and Sentenac, H. (2003a). Regulated expression of Arabidopsis shaker K+ channel genes involved in K+ uptake and distribution in the plant. Plant Mol Biol 51:773-787.

Price, M.B., Jelesko, J., and Okumoto, S. (2012). Glutamate receptor homologs in plants: functions and evolutionary origins. Front Plant Sci 3:235.

-R-

Ranty, B., Cotelle, V., Galaud, J.P., and Mazars, C. (2012). Nuclear calcium signaling and its involvement in transcriptional regulation in plants. Adv Exp Med Biol 740:1123-1143.

Raschke, K. (1975). Stomatal Action. Annual Review of Plant Physiology 26:309-340.

Reintanz, B., Szyroki, A., Ivashikina, N., Ache, P., Godde, M., Becker, D., Palme, K., and Hedrich, R. (2002). AtKC1, a silent Arabidopsis potassium channel alpha -subunit modulates root hair K^+ influx. Proc Natl Acad Sci U S A 99:4079-4084.

Rodriguez Milla, M.A., Uno, Y., Chang, I.F., Townsend, J., Maher, E.A., Quilici, D., and Cushman, J.C. (2006). A novel yeast two-hybrid approach to identify CDPK substrates: characterization of the interaction between AtCPK11 and AtDi19, a nuclear zinc finger protein. FEBS Lett 580:904-911.

Roelfsema, M.R.G., and Hedrich, R. (2010). Making sense out of Ca^{2}+ signals: their role in regulating stomatal movements. Plant Cell Environ 33:305-321.

Rogers KL., Martin JR., Renaud O., Karplus E., Nicola MA., Nguyen M., Picaud S., Shorte SL. Brulet P. (2008). Electron-multiplying charge-coupled detector-based bioluminescence recording of single-cell Ca^{2+}. J Biomed 13(3):031211.

-S-

Sawinski, K., Mersmann, S., Robatzek, S., and Bohmer, M. (2013). Guarding the green: pathways to stomatal immunity. Mol Plant Microbe Interact 26:626-632.

Schachtman, D.P., Schroeder, J.I., Lucas, W.J., Anderson, J.A., and Gaber, R.F. (1992). Expression of an inward-rectifying potassium channel by the Arabidopsis KAT1 cDNA. Science 258:1654-1658.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to Image J: 25 years of image analysis. Nat Methods 9:671-675.

Schroeder, J.I., Hedrich, R., and Fernandez, J.M. (1984). Potassium-selective single channels in guard cell protoplasts of Vicia faba. Nature 312:361-362.

Schroeder, J.I. (1988). K+ transport properties of K+ channels in the plasma membrane of Vicia faba guard cells. J Gen Physiol 92:667-683.

Schroeder, J.I., and Fang, H.H. (1991). Inward-rectifying K^+ channels in guard cells provide a mechanism for low-affinity K^+ uptake. Proc Natl Acad Sci U S A 88:11583-11587.

Schroeder, J.I., Raschke, K., and Neher, E. (1987). Voltage dependence of K^+ channels in guard-cell protoplasts. Proc Natl Acad Sci U S A 84:4108-4112.

Schulz, P., Herde, M., and Romeis, T. (2013). Calcium-Dependent Protein Kinases: Hubs in Plant Stress Signaling and Development. Plant Physiol 163:523-530.

Sentenac, H., Bonneaud, N., Minet, M., Lacroute, F., Salmon, J.M., Gaymard, F., and Grignon, C. (1992). Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. Science 256:663-665.

Serrano, E.E., Zeiger, E., and Hagiwara, S. (1988). Red light stimulates an electrogenic proton pump in Vicia guard cell protoplasts. Proc Natl Acad Sci U S A 85:436-440.

Shabala, L., Cuin, T.A., Newman, I.A., and Shabala, S. (2005). Salinity-induced ion flux patterns from the excised roots of Arabidopsis sos mutants. Planta 222:1041-1050.

Shabala, S., and Cuin, T.A. (2008). Potassium transport and plant salt tolerance. Physiol Plant 133:651-669.

Shabala, S., Shabala, L., Gradmann, D., Chen, Z., Newman, I., and Mancuso, S. (2006). Oscillations in plant membrane transport: model predictions, experimental validation, and physiological implications. J Exp Bot 57:171-184.

Shao, H.-B., Chu, L.-Y., and Shao, M.-A. (2008). Calcium as a versatile plant signal transducer under soil water stress. Bioessays 30:634–641.

Shao, J., and Harmon, A.C. (2003). In vivo phosphorylation of a recombinant peptide substrate of CDPK suggests involvement of CDPK in plant stress responses. Plant Mol Biol 53:691-700.

Song, W., Zhang, Z., Shao, H., Guo, X., Cao, H., Zhao, H., and Fu ZY, H.X. (2008). Relationship between calcium decoding elements and plant abiotic-stress resistance. Int J Biol Sci 4(2):116-25.

Spalding, E.P., and Harper, J.F. (2011). The ins and outs of cellular Ca(2+) transport. Curr Opin Plant Biol 14:715-720.

Stael, S., Wurzinger, B., Mair, A., Mehlmer, N., Vothknecht, U.C., and Teige, M. (2012). Plant organellar calcium signalling: an emerging field. J Exp Bot 63:1525-1542.

Steinhorst, L., and Kudla, J. (2013). Calcium - a central regulator of pollen germination and tube growth. Biochim Biophys Acta 1833:1573-1581.

Steudle, E. (2000). Water uptake by roots: effects of water deficit. J Exp Bot 51:1531-1542.

Steudle, E., and Peterson, C.A. (1998). How does water get through roots? J Exp Bot 49:775-788.

Suntio, T., and Makinen, K. (2012). Abiotic stress responses promote Potato virus A infection in Nicotiana benthamiana. Mol Plant Pathol 13:775-784.

Szyroki, A., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M.R., Ache, P., Reintanz, B., Deeken, R., Godde, M., Felle, H., Steinmeyer, R., et al. (2001). KAT1 is not essential for stomatal opening. Proc Natl Acad Sci U S A 98:2917-2921.

-T-

Tallman, G., and Zeiger, E. (1988). Light quality and osmoregulation in vicia guard cells: evidence for involvement of three metabolic pathways. Plant Physiol 88:887-895.

Tebar, F., Villalonga, P., Sorkina, T., Agell, N., Sorkin, A., and Enrich, C. (2002). Calmodulin regulates intracellular trafficking of epidermal growth factor receptor and the MAPK signaling pathway. Mol Biol Cell 13:2057-2068.

-V-

Van Kirk, C.A., and Raschke, K. (1978). Release of Malate from Epidermal Strips during Stomatal Closure. Plant Physiol 61:474-475.

Vavasseur, A., and Raghavendra, A.S. (2005). Guard cell metabolism and CO2 sensing. New Phytologist 165:665-682.

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

Very, A.A., and Sentenac, H. (2003). Molecular mechanisms and regulation of K^+ transport in higher plants. Annu Rev Plant Biol 54:575-603.

-W-

Wang, X.Q., Ullah, H., Jones, A.M., and Assmann, S.M. (2001). G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in Arabidopsis guard cells. Science 292:2070-2072.

Ward, J.M., Maser, P., and Schroeder, J.I. (2009). Plant ion channels: gene families, physiology, and functional genomics analyses. Annu Rev Physiol 71:59-82.

Watterson, D.M., Sharief, F., and Vanaman, T.C. (1980). The complete amino acid sequence of the Ca2+-dependent modulator protein (calmodulin) of bovine brain. J Biol Chem 255:962-975.

Weinl, S., and Kudla, J. (2009). The CBL-CIPK Ca(2+)-decoding signaling network: function and perspectives. New Phytol 184:517-528.

Weinman, S. (1991). Calcium-binding proteins: an overview. J Biol Buccale 19:90-98.

Wernimont, A.K., Artz, J.D., Finerty, P., Jr., Lin, Y.H., Amani, M., Allali-Hassani, A., Senisterra, G., Vedadi, M., Tempel, W., Mackenzie, F., et al. (2010). Structures of apicomplexan calcium-dependent protein kinases reveal mechanism of activation by calcium. Nat Struct Mol Biol 17:596-601.

West, G., Inze, D., and Beemster, G.T. (2004). Cell cycle modulation in the response of the primary root of Arabidopsis to salt stress. Plant Physiol 135:1050-1058.

Whalley, H.J., Sargeant, A.W., Steele, J.F.C., Lacoere, T., Lamb, R., Saunders, N.J., Knight, H., and Knight, M.R. (2011). Transcriptomic Analysis Reveals Calcium Regulation of Specific Promoter Motifs in Arabidopsis. The Plant Cell Online 23:4079-4095.

Wheeler, G.L., and Brownlee, C. (2008). Ca^{2+} signalling in plants and green algae--changing channels. Trends Plant Sci 13:506-514.

-X-

Xicluna, J., Lacombe, B., Dreyer, I., Alcon, C., Jeanguenin, L., Sentenac, H., Thibaud, J.-B., and Chérel, I. (2007). Increased functional diversity of plant K^+ channels by preferential heteromerization of the shaker-like subunits AKT2 and KAT2. J Biol Chem 282:486-494.

Xiong, T.C., Bourque, S., Lecourieux, D., Amelot, N., Grat, S., Briere, C., Mazars, C., Pugin, A., and Ranjeva, R. (2006). Calcium signaling in plant cell organelles delimited by a double membrane. Biochim Biophys Acta 1763:1209-1215.

Xu, J., Li, H.D., Chen, L.Q., Wang, Y., Liu, L.L., He, L., and Wu, W.H. (2006). A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K^+ transporter AKT1 in Arabidopsis. Cell 125:1347-1360.

Xu, J., Tian, Y.-S., Peng, R.-H., Xiong, A.-S., Zhu, B., Jin, X.-F., Gao, F., Fu, X.-Y., Hou, X.-L., and Yao, Q.-H. (2010). AtCPK6, a functionally redundant and positive regulator involved in salt/drought stress tolerance in Arabidopsis. Planta 231:1251-1260.

Yool, A.J., and Schwarz, T.L. (1991). Alteration of ionic selectivity of a K^+ channel by mutation of the H5 region. Nature 349:700-704.

-Z-

Zhao, Z., Zhang, W., Stanley, B.A., and Assmann, S.M. (2008). Functional proteomics of Arabidopsis thaliana guard cells uncovers new stomatal signaling pathways. Plant Cell 20:3210-3226.

Zimmermann, U., Meinker, F., Zhu, J., Schneider, H., Goldstein, G., Kuchenbrod, E., and Haase, A. (1994). Xylem water transport: is the available evidence consistent with the cohesion theory? Plant Cell Env 17: p1169 -1181

Zimmermann, S., Hartje, S., Ehrhardt, T., Plesch, G., and Mueller-Roeber, B. (2001). The K+ channel SKT1 is co-expressed with KST1 in potato guard cells--both channels can co-assemble via their conserved KT domains. Plant J 28:517-527.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Amorces utilisées en biologie moléculaire au cours de ma thèse.

Nom	Sequence	Utilisation
DNR5	ctggcagttccctactctcg	Primer Gateway (pDONR207)
DNR3	gatggtcggaagaggcataa	Primer Gateway (pDONR207)
U5	ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggcttcgaaggagatagaaccatg	Primer Gateway (pour attB1)
U3	agattggggaccactttgtacaagaaagctgggtctccacctccggatc	Primer Gateway (pour attB2)
CPK3 FL sense	ggagatagaaccatgggccacagacacagcaa	Clonage CPK3 FL
CPK3 FL anti-sense	tccacctccggatcacattctgcgtcggtttgg	Clonage CPK3 FL
CPK3 (end) KM sense	caggtcgcttgcatgtcaatccctacgc	Clonage CPK3 sans codon stop
CPK3 KM anti-sense	gtccagcgaacgtacagttagggatgcg	Clonage CPK3 KM
CPK3 (end) anti-sense	tccacctccggatcccccgggcattctgcgtcggtttgg	Clonage CPK3 KM
CPK3 AC sense	ggagatagaaccatgggccacagacacagc	Clonage CPK3-AC
CPK3 AC anti-sense	tccacctccggatcactccccatcttctctaat	Clonage CPK3-AC
CPK4 FL sense	ggagatagaaccatggagaaaccaaaccctagaaga	Clonage CPK4 FL
CPK4 FL anti-sense	tccacctccggatcactttggtgaatcatcagatttagc	Clonage CPK4 FL
CPK4 KM sense	gctaattacgcttgcatgtcaatcccaaaacg	Clonage CPK4 sans codon stop
CPK4 KM anti-sense	cgattaatgcgaacgtacagttagggttttgc	Clonage CPK4 KM
CPK4 (end) anti-sense	tccacctccggatcccttggtgaatcatcagatttagc	Clonage CPK4 KM
CPK4 AC sense	ggagatagaaccatggagaaaccaaaccct	Clonage CPK4-AC
CPK4 AC anti-sense	ggagatagaaccatgggccacagacacagc	Clonage CPK4-AC
CPK6 FL sense	ggagatagaaccatgggcaattcatgtcgtggt	Clonage CPK6 FL
CPK6 FL anti-sense	tccacctccggatcacacatctctcatgctgatgtttag	Clonage CPK6 FL
CPK6 (end) anti-sense	tccacctccggatcccccgggcacatctctcatgctgatgtttag	Clonage CPK6 KM sans codon stop
CPK6 AC sense	ggagatagaaccatgggcaattcatgtcgt	Clonage CPK6-AC
CPK6 AC anti-sense	tccacctccggatcaaactccattctcacagat	Clonage CPK6-AC
CPK7 FL sense	ggagatagaaccatggggaattgttgtggcaat	Clonage CPK7 FL
CPK7 FL anti-sense	tccacctccggatcaggtctcgccttctaattgc	Clonage CPK7 FL
CPK7 AC sense	ggagatagaaccatggggaattgttgtgg	Clonage CPK7-AC
CPK7 AC anti-sense	tccacctccggatcacttctttgcattcagtatcc	Clonage CPK7-AC
CPK11 FL sense	ggagatagaaccatggagacgaagccaaaccc	Clonage CPK11 FL
CPK11 FL anti-sense	tccacctccggatcagtcatcagatttttcaccatcaac	Clonage CPK11 FL
CPK11 KM sense	taattacgcctgcatgtcgatcccgaagc	Clonage CPK11 KM
CPK11 KM anti-sense	attaatgcggacgtacagctagggcttcg	Clonage CPK11 KM
CPK11 AC sense	ggagatagaaccatggagacgaagccaaac	Clonage CPK11-AC
CPK11 AC anti-sense	tccacctccggatcatgcttgttcatcgacaat	Clonage CPK11-AC
CPK13 FL sense	ggagatagaaccatgggaaactgttgcagatctcc	Clonage CPK13 FL
CPK13 FL anti-sense	tccacctccggatcattcgttgcctaggttcaaagac	Clonage CPK13 FL
CPK13 (end) anti-sense	tccacctccggatcccccgggttcgttgcctaggttcaaagac	Clonage CPK13 FL sans codon stop
CPK13 AC sense	ggagatagaaccatgggaaactgttgcaga	Clonage CPK13-AC
CPK13 AC anti-sense	tccacctccggatcatttctttgcgttctgaat	Clonage CPK13-AC
CPK13-G2A sense	ttcgaaggagatagaaccatggcaaactgttgcagatctccc	Mutant CPK13-G2A
CPK13-G2A anti-sense	gggagatctgcaacagtttgccatggttctatctccttcgaa	Mutant CPK13-G2A
CPK13-ϕBindingATP sense	gaaggcggcggcggcgggggtggtgtcact	Mutant CPK13-ϕBindingATP
CPK13-ϕBindingATP anti-sense	agtgacaccacccccgccgccgccgccttc	Mutant CPK13-ϕBindingATP
CPK33 FL sense	ggagatagaaccatggggaattgcttagccaaga	Clonage CPK33FL
CPK33 FL anti-sense	tccacctccggatcagaacaatcttggttgttgtgga	Clonage CPK33 FL
CPK33 (end) anti-sense	tccacctccggatccgaacaatcttggttgttgtgga	Clonage CPK33 sans codon stop

CPK33 KM sense	agattcgcttgcatgtcgatttccaagaaga	Clonage CPK33 KM
CPK33 KM anti-sense	tctaagcgaacgtacagctaaaggttcttct	Clonage CPK33 KM
CPK33 AC sense	ggagatagaaccatggggaattgcttagc	Clonage CPK33-AC
CPK33 AC anti-sense	tccacctccggatcattctccaccttctcttagc	Clonage CPK33-AC
KAT1 sense	ggagatagaaccatgtcgatctcttggactcg	clonage KAT1 FL
KAT1 anti-sense	tccacctccggatcaatttgatgaaaaatacaaat	clonage KAT1 FL
KAT1 (end) anti-sense	tccacctccggatccatttgatgaaaaatacaaat	clonage KAT1 FL sans codon stop
KAT2 sense	agaccaatggcaatcgcttgtaccaga	Clonage KAT2 FL
KAT2 anti-sense	tccacctccggatccagagttttcattgatgagaatatacaa	clonage KAT2 FL
KAT2 (end) anti-sense	tccacctccggatccagagttttcattgatgagaatatacaa	clonage KAT2 FL sans codon stop
KAT2 S13A/S15A/T17A sense	aacacaagaccaatggcaatcgcttgtgccagaaacttcttcaaac	Mutant KAT2 n°1
KAT2 S13A/S15A/T17A anti-sense	gtttgaagaagtttctggcacaagcgattgccattggtcttgtgtt	Mutant KAT2 n°1
KAT2 S55A/T56A sense	ggagctagaataaaccaagcagctaagctccgtaaacacatc	Mutant KAT2 n°2
KAT2 S55A/T56A anti-sense	gatgtgtttacggagcttagctgcttggtttattctagctcc	Mutant KAT2 n°2
KAT2 S64A sense	cgtaaacacatcatcgctcctttcgatccacgt	Mutant KAT2 n°3
KAT2 S64A anti-sense	acgtggatcgaaaggagcgatgatgtgtttacg	Mutant KAT2 n°3
KAT2 S179A sense	ggattcagagttcttgctatgctaaggctctgg	Mutant KAT2 n°4
KAT2 S179A anti-sense	ggattcagagttcttgctatgctaaggctctgg	Mutant KAT2 n°4
KAT2 S190A/S191A sense	tggcgtctcagacgagttgccgcgctgtttgcaaggcttgag	Mutant KAT2 n°5
KAT2 S190A/S191A anti-sense	ctcaagccttgcaaacagcgcggcaactcgtctgagacgcca	Mutant KAT2 n°5
KAT2 T314A/S315A/T317A sense	cttgtggttcactgggctgcccgcgccagaaactttagagatac	Mutant KAT2 n°6
KAT2 T314A/S315A/T317A anti-sense	gtatctctaaagtttctggcgcgggcagcccagtgaaccacaag	Mutant KAT2 n°6
KAT2 T354A sense	tgcttaaagtttaaagcagagggtctgaaacaacaagaagc	Mutant KAT2 n°7
KAT2 T354A anti-sense	gcttcttgttgtttcagaccctctgctttaaactttaagca	Mutant KAT2 n°7
KAT2 S482A/S485A sense	cagatactacggatagccaaaaaagctctaatgagtgctatgcgagc	Mutant KAT2 n°8
KAT2 S482A/S485A anti-sense	gctcgcatagcactcattagagctttttggctatccgtagtatctg	Mutant KAT2 n°8
KAT2 S564A/S565A sense	tcagaaaatattgatatgggggcagctgaatggagagattcaag	Mutant KAT2 n°9
KAT2 S564A/S565A anti-sense	cttgaatctctccattcagctgcccccatatcaatattttctga	Mutant KAT2 n°9
KAT2 S570A/S573A sense	actgaatggagagatgcaagaaaagctggttatggcgaaacgaaaag	Mutant KAT2 n°10
KAT2 S570A/S573A anti-sense	cttttcgtttcgccataaccagcttttcttgcatctctccattcagt	Mutant KAT2 n°10
KAT2 S647A sense	accatccacttgaaggcccgggacaaagatttg	Mutant KAT2 n°11
KAT2 S647A anti-sense	caaatctttgtcccgggccttcaagtggatggt	Mutant KAT2 n°11
Nter-KAT2 sense	gcggccgcatgtcaatct cttgtacc	Clonage partie Nter cytoplasmique de KAT2
Nter-KAT2 anti-sense	gcggccgcctcccatcccctgaaacg	Clonage partie Nter cytoplasmique de KAT2
Cter-KAT2 sense	gcggccgcatatgaccaacctt	Clonage partie Cter cytoplasmique de KAT2
Cter-KAT2 anti-sense	gcggccgcttaagagttttcattgatg	Clonage partie Cter cytoplasmique de KAT2

Annexe 2 : Liste des 384 peptides présents sur la puce à peptide

Numéro	Position sur la puce	Séquence	Nom
1	A 1	MSISWTRNFFERFCVE	KAT1
2	A 2	MAISWTRNFFERFCVE	KAT1
3	A 3	MSIAWTRNFFERFCVE	KAT1
4	A 4	RFCVEEYNIDTIKQSSFL	KAT1
5	A 5	RFCVEEYNIDAIKQSSFL	KAT1
6	A 6	RFCVEEYNIDTIKQASFL	KAT1
7	A 7	IKQSSFLSADLLP	KAT1
8	A 8	IKQSAFLSADLLP	KAT1
9	A 9	IKQSSFLAADLLP	KAT1
10	A10	ADLLPSLGARINQ	KAT1
11	A11	LGARINQSTKLRKHI	KAT1
12	A12	LGARINQATKLRKHI	KAT1
13	A13	KLRKHISPFNPRYRAWE	KAT1
14	A14	MWLVLLVIYSAWICPFQF	KAT1
15	A15	MWLVLLVIYAAWICPFQF	KAT1
16	A16	CPFQFAFITYKKDAIFI	KAT1
17	A17	GFFAIDILTFFVAYLD	KAT1
18	A18	GFFAIDILAFFVAYLD	KAT1
19	A19	FFVAYLDSHSYLLVD	KAT1
20	A20	FFVAYLDAHSYLLVD	KAT1
21	A21	FFVAYLDSHAYLLVD	KAT1
22	A22	FFVAYLDSHSALLVD	KAT1
23	A23	LLVDSPKKIAIRYLPK	KAT1
24	A24	LLVDAPKKIAIRYLPK	KAT1
25	B 1	KKIAIRYLSTWFAFDVC	KAT1
26	B 2	KKIAIRYLATWFAFDVC	KAT1
27	B 3	KKIAIRYLSAWFAFDVC	KAT1
28	B 4	WFAFDVCSTAPFQPL	KAT1
29	B 5	WFAFDVCATAPFQPL	KAT1
30	B 6	APFQPLSLLFNYNG	KAT1
31	B 7	APFQPLALLFNYNG	KAT1
32	B 8	LLFNYNGSELGFRIL	KAT1
33	B 9	LLFNYNGAELGFRIL	KAT1
34	B10	ELGFRILSMLRLWRLRRV	KAT1
35	B11	RLWRLRRVSSLFARLEKD	KAT1
36	B12	RLWRLRRVASLFARLEKD	KAT1
37	B13	FWIRCTKLISVTLFAIHC	KAT1
38	B14	FWIRCAKLISVTLFAIHC	KAT1
39	B15	FWIRCTKLIAVTLFAIHC	KAT1
40	B16	ADRYPNPRKTWIGAVYPN	KAT1
41	B17	ADRYPNPRKAWIGAVYPN	KAT1
42	B18	PNFKEASLWNRYVTALYW	KAT1
43	B19	PNFKEAALWNRYVTALYW	KAT1
44	B20	PNFKEAALWNRYVAALYW	KAT1
45	B21	ALYWSITTLTTTGYGD	KAT1
46	B22	ALYWAITTLTTTGYGD	KAT1
47	B23	ALYWSIATLTTTGYGD	KAT1
48	B24	ALYWSITALTTTGYGD	KAT1
49	C 1	ALYWSITTLATTGYGD	KAT1
50	C 2	ALYWSITTLTATGYGD	KAT1
51	C 3	ALYWSITTLTTAGYGD	KAT1
52	C 4	ALYWSITTLTTAGAGD	KAT1
53	C 5	FMMFNLGLTAYLIGNM	KAT1
54	C 6	FMMFNLGLAAYLIGNM	KAT1
55	C 7	AYLIGNMTNLVVHW	KAT1
56	C 8	NLVVHWTSRTRTFRD	KAT1
57	C 9	NLVVHWASRTRTFRD	KAT1

58	C10	NLVVHWTARTRTFRD	KAT1
59	C11	NLVVHWTSRTRAFRD	KAT1
60	C12	FRDSVRAASEFASRNQL	KAT1
61	C13	FRDAVRAASEFASRNQL	KAT1
62	C14	FRDSVRAAAEFASRNQL	KAT1
63	C15	LPHDIEDQMLSHICLKFK	KAT1
64	C16	HICLKFKTEGLKQQE	KAT1
65	C17	EGLKQQETLNNLPKAIR	KAT1
66	C18	LNNLPKAIRSSIANYLFF	KAT1
67	C19	LNNLPKAIRASIANYLFF	KAT1
68	C20	LNNLPKAIRSAIANYLFF	KAT1
69	C21	HNIYLFQGVSRNFLFQLV	KAT1
70	C22	HNIYLFQGVARNFLFQLV	KAT1
71	C23	RNFLFQLVSDIDAEYFPP	KAT1
72	C24	RNFLFQLVADIDAEYFPP	KAT1
73	D 1	EDILQNEAPTDLYILV	KAT1
74	D 2	EDILQNEAPADLYILV	KAT1
75	D 3	LYILVSGAVDFTVYVDGH	KAT1
76	D 4	LYILVAGAVDFTVYVDGH	KAT1
77	D 5	LYILVSGAVDFAVYVDGH	KAT1
78	D 6	DQFQGKAVIGETFGEVGV	KAT1
79	D 7	LYYRPQPFTVRTTELSQIL	KAT1
80	D 8	PQPFTVRTTELAQILRI	KAT1
81	D 9	PQPFAVRTTELSQILRI	KAT1
82	D10	PQPFTVRATELSQILRI	KAT1
83	D11	PQPFTVRTAELSQILRI	KAT1
84	D12	QILRISRTSLMSAMHAHA	KAT1
85	D13	QILRIARTSLMSAMHAHA	KAT1
86	D14	QILRISRASLMSAMHAHA	KAT1
87	D15	QILRISRTALMSAMHAHA	KAT1
88	D16	MNNLFMKLRGQQSIAIDD	KAT1
89	D17	IAIDDSNTSGHENRDFK	KAT1
90	D18	IAIDDANTISGHENRDFK	KAT1
91	D19	IAIDDSNASGHENRDFK	KAT1
92	D20	GHENRDFKSMGWEEWRD	KAT1
93	D21	MGWEEWRDSRKDGYGLDV	KAT1
94	D22	MGWEEWRDARKDGYGLDV	KAT1
95	D23	GLDVTNPTSDTALMDAI	KAT1
96	D24	GLDVANPTSDTALMDAI	KAT1
97	E 1	GLDVTNPASDTALMDAI	KAT1
98	E 2	GLDVTNPTADTALMDAI	KAT1
99	E 3	MDAIHKEDTEMVKKILKE	KAT1
100	E 4	IERAKEERSSSESAGR	KAT1
101	E 5	IERAKEERASSESAGR	KAT1
102	E 6	IERAKEERSASESAGR	KAT1
103	E 7	IERAKEERSSAESAGR	KAT1
104	E 8	AGRSYANDSSKKDP	KAT1
105	E 9	AGRAYANDSSKKDP	KAT1
106	E10	AGRSYANDASKKDP	KAT1
107	E11	KKDPYCSSSNQIKPCKR	KAT1
108	E12	KKDPYCASSNQIKPCKR	KAT1
109	E13	KKDPYCSASNQIKPCKR	KAT1
110	E14	PCKREEKRVTIHMM	KAT1
111	E15	IHMMSESKNGKLILVP	KAT1
112	E16	IHMMAESKNGKLILVP	KAT1
113	E17	NGKLILVPSSIEELLRLA	KAT1
114	E18	NGKLILVPASIEELLRLA	KAT1
115	E19	IEELLRLASEKFGGCN	KAT1
116	E20	GGCNFTKITNADNAEIDD	KAT1
117	E21	GGCNFAKITNADNAEIDD	KAT1
118	E22	LNVIWDGDHLYFSSN	KAT1
119	E23	LNVIWDGDHLYFASN	KAT1

120	E24	LNVIWDGDHLYFSAN	KAT1
121	F 1	MLKRKHLNTRPMSI	KAT2
122	F 2	MLKRKHLNARPMSI	KAT2
123	F 3	RPMSISCTRNFFKRFC	KAT2
124	F 4	RPMAISCTRNFFKRFC	KAT2
125	F 5	RPMSIACTRNFFKRFC	KAT2
126	F 6	KRFCVEEYNMDTFKH	KAT2
127	F 7	FKHSSFLSADLLP	KAT2
128	F 8	FKHASFLSADLLP	KAT2
129	F 9	FKHSAFLSADLLP	KAT2
130	F10	KLRKHISPFDPRFRG	KAT2
131	F11	LVILVIYSAWICPFEFAF	KAT2
132	F12	LVILVIYAAWICPFEFAF	KAT2
133	F13	ICPFEFAFITYKKDALFI	KAT2
134	F14	APFQSLSLLFKYNG	KAT2
135	F15	APFQALSLLFKYNG	KAT2
136	F16	APFQSLALLFKYNG	KAT2
137	F17	LLFKYNGSEIGFRVL	KAT2
138	F18	EIGFRVLSMLRLWRLRRV	KAT2
139	F19	DIRFNYFWTRCTKLI	KAT2
140	F20	DIRFNYFWARCTKLI	KAT2
141	F21	DIRFNYFWTRCAKLI	KAT2
142	F22	KLISVTLFAVHCAGC	KAT2
143	F23	KLIAVTLFAVHCAGC	KAT2
144	F24	IADQYHDPTKTWIGAV	KAT2
145	G 1	IADQYHDPAKTWIGAV	KAT2
146	G 2	IADQYHDPTKAWIGAV	KAT2
147	G 3	VYPNFKETSVWSRYVTAL	KAT2
148	G 4	VYPNFKEASVWSRYVTAL	KAT2
149	G 5	VYPNFKETAVWSRYVTAL	KAT2
150	G 6	VYPNFKETSVWARYVTAL	KAT2
151	G 7	VYPNFKETSVWSRYVAAL	KAT2
152	G 8	FMLFNLGFTSYLIGNM	KAT2
153	G 9	FMLFNLGFASYLIGNM	KAT2
154	G10	FMLFNLGFTAYLIGNM	KAT2
155	G11	NLVVHWTSRTRNFRD	KAT2
156	G12	RNFRDTVRAASEFA	KAT2
157	G13	RNFRDTVRAAAEFA	KAT2
158	G14	EFASRNQLPPNIQD	KAT2
159	G15	NIQDQMLSHICLKFK	KAT2
160	G16	HICLKFKTEGLKQQEAL	KAT2
161	G17	NGLPKAIRSSIANYLFFP	KAT2
162	G18	NGLPKAIRASIANYLFFP	KAT2
163	G19	NGLPKAIRSAIANYLFFP	KAT2
164	G20	NVYLFHGVSRNFLFQLV	KAT2
165	G21	VILQNEAPTDLYILV	KAT2
166	G22	ILVSGAVDFTVYVGE	KAT2
167	G23	ILVAGAVDFTVYVGE	KAT2
168	G24	ILVSGAVDFAVYVGE	KAT2
169	H 1	AFGEIGVLCYTPQPF	KAT2
170	H 2	PQPFTVRTTELSQILRI	KAT2
171	H 3	QILRISKKSLMSAMRAHV	KAT2
172	H 4	QILRIAKKSLMSAMRAHV	KAT2
173	H 5	QILRISKKALMSAMRAHV	KAT2
174	H 6	FMKLRGQQSIAIDDPN	KAT2
175	H 7	IDDPNSEPESLLKEWLV	KAT2
176	H 8	IDDPNAEPESLLKEWLV	KAT2
177	H 9	LKEWLVGGSKTGEGNA	KAT2
178	H10	LKEWLVGGAKTGEGNA	KAT2
179	H11	GEGNASDQGHGHKYL	KAT2
180	H12	GHGHKYLQLHDSENIDMG	KAT2
181	H13	NIDMGSTEWRDSRKSGYG	KAT2

182	H14	NIDMGATEWRDSRKSGYG	KAT2
183	H15	NIDMGSAEWRDSRKSGYG	KAT2
184	H16	NIDMGSTEWRDARKSGYG	KAT2
185	H17	GYGETKRVREHTIEIEEG	KAT2
186	H18	GYGETKRVREHAIEIEEG	KAT2
187	H19	GYGEAKRVREHTIEIEEG	KAT2
188	H20	NKEFDGKGCSDADL	KAT2
189	H21	DADLTSFEFHSQEAYP	KAT2
190	H22	DADLASFEFHSQEAYP	KAT2
191	H23	DADLTAFEFHSQEAYP	KAT2
192	H24	DADLTSFEFHAQEAYP	KAT2
193	I 1	QEAYPYCRSNIQIKQHEA	KAT2
194	I 2	PKDKRVTIHLKSRDKDL	KAT2
195	I 3	PKDKRVAIHLKSRDKDL	KAT2
196	I 4	RDKDLSKLILPASIEEL	KAT2
197	I 5	RDKDLAKLILPASIEEL	KAT2
198	I 6	GEKFGYSFTKVTNAENAE	KAT2
199	I 7	GEKFGYAFTKVTNAENAE	KAT2
200	I 8	GEKFGYSFAKVTNAENAE	KAT2
201	I 9	GEKFGYSFTKVANAENAE	KAT2
202	I10	IRDGDHLYILINENS	KAT2
203	I11	IRDGDHLYILINENA	KAT2
204	I12	MDLKYSASHCNL	AKT2
205	I13	MDLKYAASHCNL	AKT2
206	I14	MDLKYSAAHCNL	AKT2
207	I15	HCNLSSDMKLRRFHQHRG	AKT2
208	I16	HCNLASDMKLRRFHQHRG	AKT2
209	I17	GKGREEEYDASSLSLNNL	AKT2
210	I18	GKGREEEYDAASLSLNNL	AKT2
211	I19	GKGREEEYDASALSLNNL	AKT2
212	I20	LNNLSKLILPPLGVA	AKT2
213	I21	KLILPPLGVASYNQNHIR	AKT2
214	I22	KLILPPLGVAAYNQNHIR	AKT2
215	I23	NQNHIRSSGWI	AKT2
216	I24	NQNHIRASGWI	AKT2
217	J 1	GWISPMDSRYRCWEFYM	AKT2
218	J 2	GWIAPMDSRYRCWEFYM	AKT2
219	J 3	MVLLVAYSAWVYPFEVAF	AKT2
220	J 4	MVLLVAYAAWVYPFEVAF	AKT2
221	J 5	PFEVAFLNSSPKRNLCI	AKT2
222	J 6	PFEVAFLNASPKRNLCI	AKT2
223	J 7	FFAVDIVLTFFVAYIDER	AKT2
224	J 8	FFVAYIDERTQLLVREPK	AKT2
225	J 9	PKQIAVRYLSTWFLMDVA	AKT2
226	J10	PKQIAVRYLATWFLMDVA	AKT2
227	J11	PKQIAVRYLSAWFLMDVA	AKT2
228	J12	WFLMDVASTIPFDAIGYL	AKT2
229	J13	WFLMDVAATIPFDAIGYL	AKT2
230	J14	WFLMDVASAIPFDAIGYL	AKT2
231	J15	IPFDAIGYLITGTSTLNI	AKT2
232	J16	IPFDAIGYLITGTATLNI	AKT2
233	J17	IPFDAIGYLITGASTLNI	AKT2
234	J18	IPFDAIGYLIAGTSTLNI	AKT2
235	J19	LNITCNLLGLLRFWRLRR	AKT2
236	J20	RLRRVKHLFTRLEKDIR	AKT2
237	J21	RLEKDIRYSYFWIRCFRL	AKT2
238	J22	RLEKDIRYAYFWIRCFRL	AKT2
239	J23	WIRCFRLLSVTLFLVHCA	AKT2
240	J24	WIRCFRLLAVTLFLVHCA	AKT2
241	K 1	LFLVHCAGCSYYLIADR	AKT2
242	K 2	DRYPHQGKTWTDAIPNF	AKT2
243	K 3	DRYPHQGKTWADAIPNF	AKT2

244	K 4	DRYPHQGKAWTDAIPNF	AKT2
245	K 5	DAIPNFTETSLSIRYIAA	AKT2
246	K 6	DAIPNFAETSLSIRYIAA	AKT2
247	K 7	DAIPNFTEASLSIRYIAA	AKT2
248	K 8	DAIPNFTETALSIRYIAA	AKT2
249	K 9	IRYIAAIYWSITTM	AKT2
250	K10	IRYIAAIYWAITTM	AKT2
251	K11	IRYIAAIYWSIATM	AKT2
252	K12	IAAIYWSITTMTTVGYGDL	AKT2
253	K13	IAAIYWAITTMTTVGYGDL	AKT2
254	K14	IAAIYWSIATMTTVGYGDL	AKT2
255	K15	IAAIYWSITAMTTVGYGDL	AKT2
256	K16	ITTMTTVGYGDLHA	AKT2
257	K17	ITTMATVGYGDLHA	AKT2
258	K18	ITTMTAVGYGDLHA	AKT2
259	K19	GDLHASNTIEMVFI	AKT2
260	K20	GDLHAANTIEMVFI	AKT2
261	K21	IEMVFITVYMLFNLGL	AKT2
262	K22	MLFNLGLTAYLIGNM	AKT2
263	K23	LIGNMTNLVVEG	AKT2
264	K24	NLVVEGTRRTMEFRN	AKT2
265	L 1	NLVVEGARRTMEFRN	AKT2
266	L 2	MEFRNSIEAASNFVNRNR	AKT2
267	L 3	MEFRNAIEAASNFVNRNR	AKT2
268	L 4	MCLRFKAESLNQQHLIDQ	AKT2
269	L 5	LIDQLPKSIYKSICQHLF	AKT2
270	L 6	LIDQLPKAIYKSICQHLF	AKT2
271	L 7	LIDQLPKSIYKAICQHLF	AKT2
272	L 8	ICQHLFLPSVEKVYLFKG	AKT2
273	L 9	ICQHLFLPAVEKVYLFKG	AKT2
274	L10	EKVYLFKGVSREILLLLV	AKT2
275	L11	REILLLLVSKMKAEYIPP	AKT2
276	L12	REILLLLVAKMKAEYIPP	AKT2
277	L13	IVSGEVEIDSEMERE	AKT2
278	L14	IVAGEVEIDSEMERE	AKT2
279	L15	EMERESVLGTLRCGDIFG	AKT2
280	L16	EMEREAVLGTLRCGDIFG	AKT2
281	L17	GEVGALCCRPQSYTFQTK	AKT2
282	L18	GEVGALCCRPQAYTFQTK	AKT2
283	L19	GEVGALCCRPQSYAFQTK	AKT2
284	L20	FQTKSLSQLLRLK	AKT2
285	L21	FQTKALSQLLRLK	AKT2
286	L22	FQTKSLAQLLRLK	AKT2
287	L23	QLLRLKTSFLIETMQIKQ	AKT2
288	L24	QLLRLKASFLIETMQIKQ	AKT2
289	M 1	QLLRLKTAFLIETMQIKQ	AKT2
290	M 2	MQIKQQDNATMLKNFLQH	AKT2
291	M 3	NFLQHHKKLSNLDIGDLK	AKT2
292	M 4	LKAQQNGENTDVVPPNIA	AKT2
293	M 5	DVVPPNIASNLIAVV	AKT2
294	M 6	NLIAVVTTGNAALLDELL	AKT2
295	M 7	NLIAVVATGNAALLDELL	AKT2
296	M 8	LLDELLKAKLSPDI	AKT2
297	M 9	PDITDSKGKTPLHVAA	AKT2
298	M10	PDITDAKGKTPLHVAA	AKT2
299	M11	PDITDSKGKAPLHVAA	AKT2
300	M12	PLHVAASRGYEDCVLVLL	AKT2
301	M13	PLHVAAARGYEDCVLVLL	AKT2
302	M14	NIHIRDVNGNSALWEAI	AKT2
303	M15	ALWEAISKHYEIFRIL	AKT2
304	M16	ALWEAIAKHYEIFRIL	AKT2
305	M17	RILYHFAAISDPHIAGDL	AKT2

306	M18	RILYHFAAIADPHIAGDL	AKT2
307	M19	KALLKQGLNVDTEDHHGV	AKT2
308	M20	EDHHGVTALQVAMAEDQM	AKT2
309	M21	QMDMVNLLATNGADVVCV	AKT2
310	M22	VCVNTHNEFTPLEKLRVV	AKT2
311	M23	VCVNAHNEFTPLEKLRVV	AKT2
312	M24	EEEEERGRVSIYRGHPLE	AKT2
313	N 1	EEEEERGRVAIYRGHPLE	AKT2
314	N 2	GHPLERRERSCNEAGKLI	AKT2
315	N 3	GKLILLPPSLDDLKKIAG	AKT2
316	N 4	GEKFGFDGSETMVTNEDG	AKT2
317	N 5	GEKFGFDGAETMVTNEDG	AKT2
318	N 6	GEKFGFDGSEAMVTNEDG	AKT2
319	N 7	NEDGAEIDSIEVIRDND	AKT2
320	N 8	AGICCGVVGETEPAAPVD	PP2CA
321	N 9	EPAAPVDSTSRASLRRRL	PP2CA
322	N10	EPAAPVDATSRASLRRRL	PP2CA
323	N11	EPAAPVDSASRASLRRRL	PP2CA
324	N12	EPAAPVDSTARASLRRRL	PP2CA
325	N13	LRRRLDLLPSIKIVAD	PP2CA
326	N14	IKIVADSAVAPPLENCRK	PP2CA
327	N15	RKRQKRETVVLSTLPGNL	PP2CA
328	N16	RKRQKREAVVLSTLPGNL	PP2CA
329	N17	RKRQKRETVVLATLPGNL	PP2CA
330	N18	GNLDLDSNVRSENKKAR	PP2CA
331	N19	GNLDLDANVRSENKKAR	PP2CA
332	N20	NKKARSAVTNSNSVTEAE	PP2CA
333	N21	NKKARAAVTNSNSVTEAE	PP2CA
334	N22	NKKARSAVANSNSVTEAE	PP2CA
335	N23	NKKARSAVTNANSVTEAE	PP2CA
336	N24	NKKARSAVTNSNAVTEAE	PP2CA
337	O 1	VTEAESFFSDVPKIG	PP2CA
338	O 2	VAEAESFFSDVPKIG	PP2CA
339	O 3	VTEAEAFFSDVPKIG	PP2CA
340	O 4	DVPKIGTTSVCGRRRDME	PP2CA
341	O 5	DVPKIGATSVCGRRRDME	PP2CA
342	O 6	DVPKIGTASVCGRRRDME	PP2CA
343	O 7	DMEDAVSIHPSFLQRN	PP2CA
344	O 8	DMEDAVAIHPSFLQRN	PP2CA
345	O 9	FLQRNSENHHFYGVFD	PP2CA
346	O10	FLQRNAENHHFYGVFD	PP2CA
347	O11	GVFDGHGCSHVAEKCRER	PP2CA
348	O12	KEVEVMASDEWTETMVK	PP2CA
349	O13	KEVEVMAADEWTETMVK	PP2CA
350	O14	KEVEVMASDEWAETMVK	PP2CA
351	O15	MVKSFQKMDKEVSQRECN	PP2CA
352	O16	MVKSFQKMDKEVAQRECN	PP2CA
353	O17	VVNGATRSMKNSCRCELQ	PP2CA
354	O18	VVNGAARSMKNSCRCELQ	PP2CA
355	O19	VVNGATRAMKNSCRCELQ	PP2CA
356	O20	RCELQSPQCDAVGSTAVV	PP2CA
357	O21	RCELQAPQCDAVGSTAVV	PP2CA
358	O22	RCELQSPQCDAVGATAVV	PP2CA
359	O23	AVVSVVTPEKIV	PP2CA
360	O24	AVVAVVTPEKIV	PP2CA
361	P 1	PEKIVSNCGDSRAVLCR	PP2CA
362	P 2	PEKIVANCGDSRAVLCR	PP2CA
363	P 3	RNGVAIPLSVDHKPDRPD	PP2CA
364	P 4	RVLGVLAMSRAIGDNYLK	PP2CA
365	P 5	RVLGVLAMARAIGDNYLK	PP2CA
366	P 6	IPDPEVTVTDRTDEDECL	PP2CA
367	P 7	IPDPEVAVTDRTDEDECL	PP2CA

368	P 8	IPDPEVTVADRTDEDECL	PP2CA
369	P 9	DEDECLILASDGLWDVVP	PP2CA
370	P10	DVVPNETACGVARMCLR	PP2CA
371	P11	RGAGAGDDSDAAHNAC	PP2CA
372	P12	AHNACSDAALLLTKLALA	PP2CA
373	P13	AHNACADAALLLTKLALA	PP2CA
374	P14	ALARQSSDNVSVVVVDLR	PP2CA
375	P15	ALARQASDNVSVVVVDLR	PP2CA
376	P16	ALARQSADNVSVVVVDLR	PP2CA
377	P17	VVVVDLRKRRNNQASS	PP2CA
378	P18	VVVVDLRKRRNNQAAS	PP2CA
379	P19	PLARTLSVAGLPGKK	Control peptides
380	P20	KKALRRQETVDAL	Control peptides
381	P21	AERHPTLTRSPTLRNIQPPC	Control peptides
382	P22	SGTNSTLSLLR	Control peptides
383	P23	RRLRRSRSAPRGDCMYND	Control peptides
384	P24	TEKIDTMAQDFNLNSRTSSSRK	Control peptides

Annexe 3 : Article soumis à Frontier In Plant Science

“Imaging long distance calcium signals in intact plant leaves with the BRET-based GFP-Aequorin reporter”

frontiers in
IN PLANT CELL BIOLOGY

Imaging long distance calcium signals in intact plant leaves with the BRET-based GFP-Aequorin reporter

Tou Cheu Xiong, Elsa Ronzier, Frédéric Sanchez, Claire Corratgé-faillie, Christian Mazars and Jean-Baptiste Thibaud

Journal Name:	Frontiers in Plant Science
ISSN:	1664-462X
Article type:	Methods Article
First received on:	12 Dec 2013
Frontiers website link:	www.frontiersin.org

Imaging long distance calcium signals in intact plant leaves with the BRET-based GFP-Aequorin reporter

Tou Cheu Xiong[1]*, Elsa Ronzier[1], Frédéric Sanchez[1], Claire Corratgé-Faillie[1], Christian Mazars[2,3], Jean-Baptiste Thibaud[1]

[1]Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, UMR 0386 INRA/UMR 5004 CNRS/Montpellier SupAgro/Université Montpellier 2, F-34060 Montpellier Cedex 2, France
[2]Université de Toulouse, UPS, UMR 5546, Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, BP 42617, F-31326, Castanet-Tolosan, France
[3]CNRS, UMR 5546, BP 42617, F-31326, Castanet-Tolosan, France

*** Correspondence:** Tou Cheu Xiong, Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, UMR 0386 INRA/UMR 5004 CNRS/Montpellier SupAgro/Université Montpellier 2, F-34060 Montpellier Cedex 2, France
xiong@supagro.inra.fr

Number of words: 4941
Number of Figures: 9
Number of Tables: 2

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, Calcium imaging, cooled CCD camera, GFP-Aequorin, Leaf, Long distance calcium signaling, Calcium waves, Salt stress

Abstract

It is well known that the calcium ion (Ca^{2+}) is a secondary messenger involved in many plant signalling processes. Biotic and abiotic stimuli induce Ca^{2+} signals within plant cells, which, when decoded, enable these cells to make adapted responses to environmental stresses. Multiple examples of Ca^{2+} signals from plants containing the fluorescent Ca^{2+} sensor YC3.60 have contributed to the definition of the Ca^{2+} signature in some cell types such as root hairs, pollen tubes and guard cells, however, it is of limited use in autofluorescent plant tissues, in particular photosynthetic tissues. Alternatively, the bioluminescent reporter aequorin enables Ca^{2+} imaging in the whole plant, including photosynthetic cells, but this requires specific devices capable of detecting low amounts of emitted light. Another type of Ca^{2+} sensor, referred to as GFP-aequorin (G5A), has been engineered as a chimerical protein, which combines the two well-known light-emitting proteins from the jellyfish *Aequorea victoria*, the green fluorescent protein (GFP) and the bioluminescent protein aequorin. The Ca^{2+}-dependent light-emitting property of G5A is based on a bioluminescence resonance energy transfer (BRET) phenomenon between its aequorin and GFP moities. G5A has been used for over 10 years for enhanced *in vivo* detection of Ca^{2+} signals in animal tissues.
Here, we adapt G5A for plants and show that G5A greatly improves the imaging of Ca^{2+} signals in intact plants. We describe a simple method to image Ca^{2+} signals in autofluorescent intact leaves of plants with a cooled charge-coupled device (cooled CCD) camera. We present data demonstrating

how plants expressing the G5A probe can be powerful tools for *in planta* imaging of Ca^{2+} signals. It is shown that long distance propagating Ca^{2+} signals can be visualized in intact plant leaves and are seen mainly in the veins.

1. Introduction

Calcium (Ca^{2+}) has long been established as a secondary messenger in living cells. Transgenic expression of fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based fluorescent Ca^{2+} reporters such as the popular yellow cameleon (YC) or of the bioluminescent aequorin has permitted non-invasive monitoring of free Ca^{2+} levels and enabled real-time imaging of Ca^{2+} levels in different cell-types and organisms, including plants (Knight et al., 1991;Perez Koldenkova and Nagai, 2013). The YC has been used extensively for imaging Ca^{2+} signals in specific plant cell types such as guard cells (Allen et al., 1999), germinating pollen tubes (Iwano et al., 2012), and root hairs (Miwa et al., 2006;Monshausen et al., 2008). However, YC requires excitation by exogenous light, which strongly weakens its relevance in plant photosynthetic tissues due to high background emission from auto-fluorescent cell walls, chlorophyll, and secondary metabolites. Moreover, Ca^{2+} imaging at plant tissue level requires strong and long excitation to detect fluorescence signals, which results in YC photo-bleaching, tissue damage and limits long term Ca^{2+} measurements. On the other hand, the bioluminescent Ca^{2+} reporter aequorin does not require exogenous excitation light and no background signal is produced leading to a high signal-to-noise ratio throughout long acquisition periods. Aequorin has the highest dynamic range among Ca^{2+} reporters, allowing the monitoring of Ca^{2+} signals over several days and over a wide range of Ca^{2+} concentrations (Alonso and Garcia-Sancho, 2011). Aequorin has been introduced into several plant species (Knight et al., 1991;Webb et al., 2010) and has enabled photon counting based monitoring of Ca^{2+} in intact plant leaves. Many reports of aequorin application in plants have been published where photon counting with luminometers was used to describe Ca^{2+} signalling under several stress conditions. However, to image photons emitted by aequorin with good resolution in both space and time requires sophisticated detection devices such as image photon detectors (IPDs) (Webb et al., 2010) or cameras fitted with an Intensified Charge-Coupled Device (ICCD) (Webb et al., 2010) or Electron Multiplying Charge-Coupled Device (EMCCD) (Rogers et al., 2008;Webb et al., 2010). This is a significant limitation to *in planta* Ca^{2+} imaging which could be overcome by using the so-called G5A probe, an engineered fusion between the green fluorescent protein (GFP) and aequorin (Figure 1A,C) initially developed for Ca^{2+} imaging in animal cells (Baubet et al., 2000;Rogers et al., 2005). Through a bioluminescence resonance energy transfer (BRET) between its aequorin and GFP moities, G5A shifts wavelength of emitted light from 470 nm to 510 nm and optimizes its detection yield by CCD devices with a better signal/noise ratio (Baubet et al., 2000;Rogers et al., 2005;Rogers et al., 2008).

Here, (i) we adapted G5A for plants and expressed it in Arabidopsis, (ii) we show that, in comparison to aequorin, G5A greatly enhances *in vitro* and *in vivo* Ca^{2+} detection of weak signals in intact plants, including in photosynthetic tissues and (iii) we describe a simple and optimized method that only requires a cooled-CCD camera to visualize Ca^{2+} signals in plant leaves as, for example, Ca^{2+} waves propagating along leaf veins of intact plants after imposing a salt stress to roots of these plants. It is concluded that G5A reporter is an interesting alternative to aequorin.

2. Materials and Methods

2.1. Cloning *G5A* and engineering G5A-expressing plants

The original vector harbouring the *G5A* construct (Baubet et al., 2000) was kindly provided by Dr. Philippe Brûlet's group (CNRS, Gif-sur-Yvette, France). G5A coding sequence was cloned into the Gateway® entry vector pDONR™ by two sequential PCRs amplification using a *G5A* forward primer 5'-GGAGATAGAACC**ATGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCA**-3' and a *G5A* reverse primer 5'-TCCACCTCCGG**ATCAGGGGACAGCTCCACCGTAG**-3', followed by a second PCR using a U5 forward primer 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATG-3' and a U3 reverse primer 5'-AGATTGGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCCACCTCCGGATC-3'. Next step was a transfer, by LR Gateway® recombination, of the *G5A* construct into the expression vector pGWB502Ω (Nakagawa et al., 2007).

The pGWB502Ω-*G5A* construct was introduced in *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101), for transformation of *Arabidopsis thaliana* Col-0 ecotype by the floral dip method (Clough and Bent, 1998). G5A expressing transgenic plants were selected using hygromycin selective media and checked for GFP fluorescence emission under direct excitation of GFP at 488 nm (see Figure 2). Homozygous G5A expressing T3 and T4 plants (here below denoted *G5A* plants) were used in experiments reported here and compared to transgenic plants expressing aequorin in the cytoplasm (Col-0 ecotype, denoted below *Aeq* plants) obtained from Prof. Marc Knight (Durham, UK).

2.2. Plant material and growth conditions

Seeds from *Aeq* and *G5A* plants were surface-sterilized and placed on MS/2- plate medium supplemented with sucrose 1% (w/v) and with hygromycin (*G5A*) or kanamycin (*Aeq*), and stratified at 4°C for 2 days in the dark. Seedlings were subsequently grown in a growth chamber at 22°C with a 70% relative humidity, in long-day conditions (150 µE/m²/s light for 16 h a day) for 7 days. These 7-day old plantlets were either used directly in some experiments or further grown in soil under short day conditions (200 µE/m²/s light for 8 h a day) for 3 to 7 weeks, as indicated.

2.3. Luminescence measurement and imaging

Plantlets. *In vivo* reconstitution of functional aequorin was performed by incubating 7-day-old plantlets for 4 h at 22°C in the dark with a 2.5 µM aqueous solution of coelenterazine HCP (Interchim). For imaging, coelenterazine-treated plantlets were placed within a dark chamber over a gelosed layer (water with 1% agar) in large Petri dishes. A cooled-CCD camera (Hamamatsu 4880-30), fitted at the top of the chamber, collected photons. Sequential image acquisition was carried out using the Hipic 5.1.0 software with an exposure time per image in the 15-60 s range (as indicated in the Figure legends). Images were analyzed with "ImageJ" freeware (Schneider et al., 2012). The first 5 min in each sequence were discarded because of chlorophyll autofluorescence decay.

Older soil-grown plants. At the end of the day, the soil was gently removed from the roots

and the whole plants were incubated for 4 hours at 22°C in the dark in a 2.5 µM aqueous solution of coelenterazine HCP. Plants were then placed with the roots in Qualibact® (CEB) tubes filled with water through a hole in the cap of the tube to separate leaves from roots. Plants were left for 1 h in the dark at room temperature for recovery. Images of the rosette were acquired as described above for plantlets, with a 30 s integration time. NaCl at a final concentration of 200 mM was injected with a remotely actioned syringe at the root level after 25 min of acquisition.

Excised mature leaves. Mature leaves were excised from 6-7-week old plants grown as described above and incubated at 22°C in the dark for 4 hours in a 2.5 µM aqueous solution of coelenterazine HCP. The treated excised leaf was then transferred to a dark chamber under the cooled-CCD camera for G5A imaging as described above with fitted with 15 s exposure time by frame. For salt stress, 100 µL of 200 mM NaCl was pipetted onto the excised leaf petiole (see Figure 8A arrow) and subsequent light emission was acquired.

2.4. Image analysis

All images were analyzed with ImageJ. Shading correction of all images was performed by subtraction of dark field image (acquisition without sample) acquired with the same exposure time. Backgrounds of each image were normalized by subtraction of ROIs of non-plant pixels. ROIs of plant pixels were then quantified and the average values are plotted over the time. Ca^{2+} signal velocity was determined with the MtrackJ plugin of ImageJ and the localization (x,y) of each velocity value was plotted with Matlab® software (R2006a).

2.5. Aequorin immunoblotting

Soluble protein was extracted from 50 seedlings (Mithofer and Mazars, 2002) and separated by SDS-PAGE method. Immunoblotting was carried out using an anti-aequorin rabbit polyclonal antibody (Novus Biological, NB100-1877) as described by the manufacturer. Signals of immunodetection were acquired with LAS-3000 imager (Fujifilm) and quantified with Multi-Gauge v3.2 (Fujifilm).

2.6. Calibration of the two probes G5A and aequorin

Soluble proteins were extracted from *G5A* and *Aeq* plants as described by Mithofer and Mazars (2002) and were suspended in a buffer containing the coelenterazine HCP cofactor for 2 h in the dark at 4°C. Relative amounts of G5A and aequorin reporters in these crude extracts were estimated from the above described western blot. As the G5A/aequorin ratio was found to be 1.48±0.1 (see below, Figure 3A), soluble protein crude extracts from G5A- and aequorin-expressing plants were suspended in a buffer (Tris-HCl 200 mM, pH 7.0, EGTA 5 mM) at a protein content of 0.1 µg/µL and 0.15 µg/µL respectively to ensure that subsequent *in vitro* comparison of both reporters was made with equal quantities of them. Wells of 96-well plates were filled with 50 µL of different Ca^{2+} solutions, of which the free Ca^{2+} concentration was estimated by MaxChelator Software (http://www.stanford.edu/~cpatton/downloads.htm). To start probe calibration, 50 µL of either G5A or aequorin buffer was dispensed into each well and maximum light emitted per second (L) was measured. In a second step, 100 µL of a 2 M $CaCl_2$ solution was dispensed into each well for discharging the remaining reconstituted G5A or aequorin reporters. Light

emitted at this time (L_{total}) allowed the total amount of functional Ca^{2+} reporters to be estimated. All light measurements were made with a plate-spectrophotometer Victor^2 (Perkin Elmer). Results are expressed as the ratio ±SE of maximum light over total light (L/L_{total}). A common linear increase of L/L_{total} ratio was observed between ~10^{-8} and ~10^{-6} M free Ca^{2+} for both G5A and aequorin.

3. RESULTS

Effective transgenesis using the pGWB502Ω-*G5A* construct, with the *35S* strong promoter controlling G5A expression was expected to yield a broad constitutive expression pattern of the G5A probe. This was checked in a Ca^{2+}-independent manner by direct excitation, at 488 nm, of the GFP moiety of the chimera probe expressed in homozygous transgenic plants of the third generation (T3) (Figure 2). GFP fluorescence was emitted from essentially all organs of these plants. Fluorescence can be seen, for example, in roots, hypocotyls and cotyledons of 7-day old plants (Figure 2A,B), including (shown at a larger magnification) in epidermal cells, in guard cells (Figure 2C,D), and in mesophyll cells (Figure 2E,F) of these cotyledons as well as in root cells (Figure 2G,H) and guard cells (Figure 2I,J) of 21-day old plants. The G5A probe localised in the cytoplasm and in the nucleus (arrows in Figure 2G,I).
An anti-aequorin polyclonal antibody (Novus Biological, USA) was used to evaluate the amount of G5A and aequorin proteins in the soluble protein fraction (Figure 3B). This antibody revealed heavily-stained bands in both protein extracts from *Aeq* and *G5A* plants. The G5A/aequorin ratio (protein level) was estimated at 1.48±0.14.

Calibration curves were performed with soluble protein extracts from plants expressing G5A or aequorin. Equal amounts of G5A and aequorin reporters were used for *in vitro* calibration curves. Data are expressed as maximum light emitted per second (denoted "L") (Fricker et al., 1999) over total light (denoted "L_{total}") ratio (Figure 3B see Methods section). G5A and aequorin showed similar responses to free Ca^{2+} concentration and calibration curves do not differ significantly over the 10^{-8} to 10^{-6} M free Ca^{2+} range. Linear regression between 10^{-8} to 10^{-6} M free Ca^{2+} reveals a straight line with a slope of 1.065±0.016 (R^2=0.988) and 0.888±0.015 (R^2=0.987) for G5A and aequorin respectively (Figure 3B). The reciprocal relationship, *i.e.*, between free Ca^{2+} concentration and the rate of consumption of G5A or aequorin can be represented by the equation:

$$-\boldsymbol{log}([\boldsymbol{Ca^{2+}}]) = \boldsymbol{a} * -\boldsymbol{log}\left(\frac{\boldsymbol{L}}{\boldsymbol{L_{total}}}\right) + \boldsymbol{b} \qquad \text{(Fricker et al., 1999)}$$

Coefficients *a* and *b* in the above equation are 0.93919 and 5.61289 for G5A and 1.13646 and 5.26608 for aequorin.

The bioluminescent reporter aequorin has very low noise and high signal/noise ratio (Brini, 2008;Webb et al., 2010). No signal from G5A and aequorin was detected under *in vitro conditions*, in the absence of coelenterazine HCP. In the presence of coelenterazine HCP and without Ca^{2+}, G5A and aequorin noise levels were respectively 271.16±10.76 and 198.67±11.52 RLU (Relative Light Unit). This difference is, however, negligible compared to signal after injection of free Ca^{2+}. At the basal level of cytosolic free Ca^{2+} (0.1 µM), maximum light level was increased to $6.61x10^3$±$0.32x10^3$ and $1.72x10^3$± $0.29x10^3$ RLU for G5A and aequorin respectively. At 1 µM free Ca^{2+}, light levels increased up to $90.14x10^3$±$7.44x10^3$ and $20.25x10^3$±$1.65x10^3$ RLU for G5A and aequorin respectively. Data expressed as signal/noise ratio for the two reporters (Figure 4A) show that G5A is

approximately 3 to 5 times better than aequorin. For instance, the signal/noise ratio for aequorin with 1 µM free Ca^{2+} is reached with only 300 nM free Ca^{2+} with G5A reporter.

In parallel, comparison of the two Ca^{2+} reporters was performed *in planta*. Different time lapses were tested for collecting photons emitted by G5A- and aequorin-expressing plants (Figure 4B). The threshold for signal detection for basal level of free Ca^{2+} was approximately 10 s and 30 s with G5A and aequorin respectively. A 30 s time lapse allowed sufficient light to be collected from *G5A* plants while 1 min was hardly sufficient in the case of *Aeq* plants.

Sudden deprivation of light has been reported to induce weak Ca^{2+} signals in photosynthetic tissues (Johnson et al., 1995;Sai and Johnson, 2002;Dodd et al., 2006). To assess the capability of G5A to detect weak Ca^{2+} events in intact plant tissues, we challenged Arabidopsis plants with darkness: the reactions of *G5A* plants upon suppression of light were compared to those of *Aeq* plants. Representative results of ten independent measurements of dark-induced Ca^{2+} signals from T4 and T3 generation of *G5A* and *Aeq* plants are shown in Figure 5. Four or five 7-day old samples of each of the plant lines were observed with a digital cooled-CCD camera over a 2.5 hour period after onset of darkness (Figure 5). Significantly more photons could be collected from *G5A* plants than from the *Aeq* plants over this period (Figure 5B). Successive integrations of photons over 1 mintime lapses provided an overview of the Ca^{2+} signal kinetics (Figure 5C). Dark-induced Ca^{2+} signals displayed by G5A and aequorin had parallel kinetics (Figure 5C and Figure 5C inset), with a maximal light emission between 40 and 60 min. However approximately five times more photons were detected from plants of the *G5A* line.

This interesting G5A feature allowed us to follow the dynamics of free Ca^{2+} in leaves triggered by a salt stress applied to roots of intact plants (Figure 6 and Supplementary video 1). It is rare to be able to image signalling in plants, induced by salt stress over such long distances. The stress was sensed by roots and propagated to leaves indicating that Ca^{2+} waves might contribute to plant adaptation to salt stress. A time series of frames (representative result of five independent plants) is presented in figure 6A. It shows that a 30 s delay after the application of NaCl (at time =0) was required for Ca^{2+} signals to be detected in petioles. Ca^{2+} signals were then propagated to the rest of the leaves. It is interesting to note that the Ca^{2+} responses of mature and young leaves differed in terms of kinetics. Mature leaves responded by an initial rapid, transient, Ca^{2+} peak (Figure 6A, time=1-2 min) followed by a second very slow, wave-like, increase and subsequent decrease of free Ca^{2+} level lasting more than 50 min (from 6 to 60 min) with a maximum at 12-13 minutes. The young leaves displayed essentially a single rapid Ca^{2+} transient peak (Figure 6A red arrows), similar to that observed in mature leaves although slightly later (3.5-4.5 min after salt stress application). Defining the whole plant as an ROI and plotting the time course of the signal summed over each 30 s lapse (in RLU/30 s) for 60 min after salt stress application yielded a dynamic view of these Ca^{2+} events at leaf level (Figure 6B). It was found that both the Ca^{2+} peaks (observed for mature and young leaves) and the Ca^{2+} wave had a maximum level in the 23-25 RLU/30 s (Figure 6B).

Light emitted by G5A in intact plants facing a salt stress therefore appeared to be sufficiently intense to image the propagation of Ca^{2+} signals in leaves with good time resolution. We performed a simple analysis of Ca^{2+} waves on each leaf of plants subjected to a salt stress applied to roots. Ca^{2+} signal velocities were then calculated for each leaf as shown on figure 7A for the same plant as in figure 6 (red dashed arrows) and the resulting data plotted with dots using false colors (Figure 7B). This shows that velocity was not constant within a given leaf (it decreased at leaf tip) and differed depending on the leaf. Detailed numerical values are given (Table 1): maximum and minimum of velocities were 0.52 mm/s and 0.03 mm/s respectively.

Table 1: Ca^{2+} waves properties on different leaves of an intact plant

	Total lenght (mm)	Velocity mean (mm/s)	Velocity minimum (mm/s)	Velocity maximum (mm/s)	Duration (s)	Latency (s)
1	25.96	0.29 ± 0.10	0.15	0.52	90	30
2	15.55	0.17 ± 0.12	0.03	0.45	90	30
3	16.87	0.11 ± 0.02	0.05	0.18	150	60
4	18.50	0.15 ± 0.03	0.10	0.23	120	30
5	5.84	0.10 ± 0.01	0.08	0.11	60	240
6	30.81	0.26 ± 0.03	0.23	0.34	120	30
7	22.19	0.25 ± 0.02	0.22	0.30	90	30
8	3.68	0.06 ± 0.03	0.03	0.09	60	210
9	13.67	0.15 ± 0.04	0.09	0.24	90	90

Further applications of G5A were investigated by imposing similar salt stress on mature leaves excised from 7-8 week-old plants. An example representative of five independent observations is shown in figure 8. Application of 100 µL of 200 mM NaCl on the petiole end of an excised leaf (Figure 8A, white arrow) was enough to produce detectable Ca^{2+} signals on that leaf after 1 min. A time series of frames cumulating light collected over 15 s time lapses is presented (Figure 8A) and shows the propagation of these Ca^{2+} signals. They started immediately after salt stress at the site of application before they spread throughout the rest of the leaf (Figure 8A and Supplementary video S2). Spreading of Ca^{2+} signals seems to be different in the basal third part of the leaf (denoted by ∗ in Figure 8C) compared to the rest of the leaf (denoted by ∗∗ in Figure 8C). In the early phase of response to the applied stress, Ca^{2+} signals were observed in the peripheral regions of the basal third part of the leaf and not in the middle vein. Subsequently, Ca^{2+} signals seem to propagate throughout the leaf, firstly, along the vascular tissues (primary and secondary veins) and later in the mesophyll tissue. Quantification of Ca^{2+} signals from the entire leaf shows that salt stress induced two different peaks of Ca^{2+}, which correspond to these two successive episodes of Ca^{2+} increase, firstly in the basal part of the leaf, subsequently in the rest of the leaf (as indicated by asterisks in Figure 8B as described for Figure 8C).

In this example, Ca^{2+} signals induced by NaCl needed 315 s (image at 1:00 to 6:15) to travel through a 57 mm-long leaf. Thus in this example the average velocity was 0.181 mm/s. A further analysis was performed on the primary vein of this leaf (Figure 8C, red dashed line X-Y), a kymographic representation of velocity value on the axis X-Y shows that there were three different Ca^{2+} signals velocities (Figure 8D). Two of them (red dashed and orange dashed arrows) were in the same direction (X to Y) whereas one was in the opposite direction (Y to X, cyan dashed arrow). Interesting, a gap between the first third and the second third of the leaf was observed. Despite this gap, where no Ca^{2+} signals were detected with G5A, Ca^{2+} signal propagation was observed on either side of the XY axis (Figure 8C and supplementary video S2). Analyses of Ca^{2+} waves on these excised leaves (representative of 7 leaves) show that Ca^{2+} signals velocities along different veins (Figure 9A dashed arrows) were different. Local velocity values were plotted on the image (as spots in false-colour scale, Figure 9B). Higher velocities in the centre of the leaf and slower velocities at

leaf borders were found (Figure 9B). Details of velocities of Ca^{2+} signals in leaf veins, including on X-Y axis (#1, #8 and #16) are presented in Table 2 below:

Table 2: **Ca^{2+} waves properties on a salt-stressed detached leaf**

	Total lenght (mm)	Velocity mean (mm/s)	Velocity minimum (mm/s)	Velocity maximum (mm/s)	Duration (s)	Latency (s)
1	8.62	0.12 ± 0.02	0.06	0.20	75	0
2	17.01	0.16 ± 0.04	0.03	0.41	105	30
3	17.34	0.19 ± 0.05	0.04	0.39	90	150
4	20.33	0.19 ± 0.04	0.03	0.40	105	165
5	13.18	0.22 ± 0.06	0.09	0.36	60	195
6	10.63	0.18 ± 0.04	0.10	0.28	60	195
7	2.88	0.06 ± 0.02	0.04	0.10	45	255
8	32.90	0.31 ± 0.08	0.09	0.60	105	150
9	2.78	0.04 ± 0.01	0.01	0.07	75	240
10	9.94	0.13 ± 0.06	0.02	0.35	75	195
11	10.21	0.11 ± 0.03	0.03	0.23	90	195
12	9.77	0.13 ± 0.04	0.02	0.24	75	195
13	14.41	0.14 ± 0.03	0.04	0.27	105	165
14	17.59	0.15 ± 0.04	0.04	0.40	120	150
15	20.04	0.11 ± 0.03	0.03	0.35	180	0
16	20.25	0.10 ± 0.04	0.02	0.54	195	150

4. Discussion

Since the successful use of aequorin as a Ca^{2+}-signaling reporter in plant tissues (Knight et al., 1991), examples of aequorin imaging in plants have relied upon the use of ultra-sensitive camera devices (intensified-CCD or electron-multiplying-CCD) to detect the few photons emitted by aequorin. They have revealed, for example, that Ca^{2+} oscillations occur during diurnal rhythms in plant leaves (Johnson et al., 1995;Sai and Johnson, 2002;Dodd et al., 2006). Optimized imaging of aequorin signals in plants has been reported recently that, with integration time down to 40 s, showed stimulus- and tissue-specific Ca^{2+} signatures in seedlings (Zhu et al., 2013). In these examples of aequorin imaging in plants, however, low light detection relied upon sophisticated equipment that only a few specialised laboratories could afford. Another interesting development of aequorin-based approach to *in planta* Ca^{2+} signaling has recently been reported: expression of aequorin in some specific cell types in Arabidopsis was used to determine which cell types make Ca^{2+} signals in response to a given stimulus (Marti et al., 2013). Photometry (with high time resolution) of aequorin emission from specific leaf cell–types (mesophyll cells, guard cells, [peri-]vascular cells, epidermal cells and trichomes) may be used to follow various stresses. These experimental conditions allowed the collected information to be ascribed to a given cell-type, without, however, spatial localization of

the measured signals.

The G5A-based method we propose here provides an interesting complement to these recent improvements of aequorin-based methods, as discussed below. In the *Aequoria Victoria* jellyfish, a naturally evolved BRET phenomenon between aequorin and GFP occurs. Several artificial proteins assembling aequorin with GFP-derived proteins have been engineered to mimic the natural BRET observed in *Aequoria victoria*. Performance of these artificial Ca^{2+} reporters depends on the linker motif slotted in between the BRET partner proteins (Baubet et al., 2000;Gorokhovatsky et al., 2004). Comparison of different linkers in GFP-aequorin protein fusions has demonstrated that the five repeat motifs used here in the so-called G5A artificial reporter (see Figure 1) allows a high BRET efficiency (Baubet et al., 2000). Subsequently, the G5A reporter has been successfully used to image Ca^{2+} elevation at cellular and organ levels in animals (Baubet et al., 2000;Chiesa et al., 2001;Cassidy and Radda, 2005;Rogers et al., 2005;Martin et al., 2007;Rogers et al., 2008;Naumann et al., 2010). To date, however, no G5A application in plants has been reported.

Although our *in vitro* assays show similar calibration curves for both these reporters (Figure 3B), there was a significantly better signal/noise ratio for G5A than for aequorin (Figure 4A) corresponding to a 3-5 fold increase in light collected from the former compared to the later. Such an amplification is consistent with the data obtained *in planta* (Figures. 4B and 5) where small changes of free Ca^{2+} concentration were more easily detected with G5A than with aequorin. The (up to) 5-fold amplification of light in plants expressing G5A is similar to the 5.7-fold increase in the light signal resulting from bioluminescence resonance energy transfer between luciferin and GFP in *Renilla reniformis* (Ward and Cormier, 1976). It is interesting to note however that the improved detection of light emission from aequorin through BRET is still not completely understood (Webb et al., 2010).

An issue for plant cell physiologists is the autofluorescence of chlorophyll and other organic pigments which hinders the use of fluorescent probes, of which the excitation or the emission peaks would overlap those of these pigments. For instance chlorophyll *b* and carotenoids (lutein, neoxanthin and violaxanthin) have major absorption peaks between 469 and 490 nm (Rivadossi et al., 2004;Taylor et al., 2006) and may absorb photons emitted at ~470 nm by aequorin in leaf cells. As a consequence of the efficient BRET between its aequorin and GFP moieties, G5A emits photons at~510 nm (Baubet et al., 2000;Rogers et al., 2005;Rogers et al., 2008), thus reducing absorbance by plant tissues and resulting in better detection by cameras or luminometers. This also could contribute to the better performance of G5A compared to aequorin in the present *in planta* experiments (Figure 5C).

Another issue often reported with genetic probes expressed in plant cells is gene silencing, in particular when, as in the present *G5A* line, expression of the transgene is controlled by the strong viral promoter *35S*. We found that G5A expression did not decrease with time as assessed from (i) Ca^{2+}-imaging performance was as good in 1 week-old plantlets (Figures 1A-F, 4 and 5) as in 4-7 week-old plants (Figures 6-8 and Supporting information videos 1&2) and (ii) equivalent results obtained with fourth and third generation transformed plants (T4 and T3 *G5A* plants). A significant advantage of *G5A* plants over *Aeq* plants as a tool for Ca^{2+} imaging is that the reporter expression can be checked simply by direct excitation of the GFP moiety of G5A (*e.g.*, as in Figure 1B) with no need to add the coelanterazine cofactor.

In addition to these considerations, the G5A-based original results that we report here exemplify the interest of this Ca^{2+} reporter to plant biologists. Comparison of *Aeq* and *G5A* plants subjected to darkness shows that similar responses could be visualized with both Ca^{2+} reporters, but 5 times more light was emitted from *G5A* plants (Figure 5). This suggests that G5A is an alternative tool to aequorin for Ca^{2+} imaging when signals are either too low or if ultra-sensitive camera is not

available. Moreover, further examples of potential application of G5A are introduced here, showing the analysis of long-distance Ca^{2+} signalling (potentially involved in the coordination of the integrative responses of plant to stresses, here salt stress, Figures 6-9).
Long distance propagation of Ca^{2+} signals (so-called "Ca^{2+} waves") is attracting increasing interest in the plant biology community (Steinhorst and Kudla, 2013) and in this context, G5A seems to be a complementary tool, along with fluorescent Ca^{2+} reporters, to investigate complex cell to cell communication within plants. Most of successful Ca^{2+} imaging experiments in intact tissue with a fluorescent reporter have been carried out in roots (Fasano et al., 2001;Monshausen et al., 2011;Gjetting et al., 2012), where autofluorescence is much less important than in leaves. Aequorin imaging requires ultra-sensitive cameras (intensified-CCD or electron-multiplied-CCD) but not does G5A imaging. The high dynamics and intensity of G5A light emission upon Ca^{2+} events open opportunities to detect low Ca^{2+} signals and to analyse their propagation with good time resolution, using a “regular” cooled CCD camera. In practical terms, time resolution is the time required to make an image (a frame) with an acceptably high signal/noise ratio. Under the present experimental conditions, integration time for a frame was well under 1 min: depending on amplitude of the Ca^{2+} signal this integration time ranged from 30 s (Figure 6) down to 15 s (Figure 8) for whole plantlets or mature leaves and even down to 5 s in the most favourable case (wounding stress, data not shown). Thus values of Ca^{2+} wave propagation speed as fast as 0.5-0.6 mm/s can be resolved from analysis of G5A imaging, as in the reported example of Ca^{2+} signals propagating in the vein network of an excised leaf challenged with a salt stress (Figure 9, Tables 1&2).
We consider that G5A reporter opens exciting perspectives for the study of cell-to-cell communication in plants. The physiological meaning of Ca^{2+} waves observed within vascular tissues (but not solely there) is one of the interesting aspects which could be investigated. Velocity values observed for these Ca^{2+} signals are of the same order of magnitude as that of “fast” electrical signals (indeed "action potentials") reported to travel leaf tissues in Arabidopsis (Favre et al., 2011). This substantiates the hypothesis of an interplay between Ca^{2+} and electrical signalling. Recently, glutamate receptor-like putative Ca^{2+} channels were reported to play a role in leaf to leaf signalling of wounding (Mousavi et al., 2013) in relation with some travelling electrical signals. In this context, combining G5A-based imaging of Ca^{2+} with electrophysiological recording of electrical signals might be a powerful method to decipher the molecular basis of electrical signalling in plants upon different types of stress, including wounding.

In conclusion, G5A allows Ca^{2+} detection that is up to 5 times more sensitive than aequorin in intact plant tissues, including photosynthetic ones, making the *G5A* line that we have constructed appear to be a promising tool. The imaging of Ca^{2+} signals in intact plant leaves with an affordable cooled CCD camera will considerably widen the field of investigation of Ca^{2+} signalling for the plant research community.

5. Acknowledgement

We thank Dr. T. Nakagawa (Nagoya, Shimane University, Japan) for the pGWB502Ω plasmid, Prof. M. Knight (Durham University, UK) for the *Aeq* line (pMAQ2, Col-0 ecotype), Prof. P. Brûlet (CNRS, Gif-sur-Yvette, France) for the G5A construct.
This work was supported by a joint CNRS-INRA fellowship to ER, by the Agropolis Fondation (Grant 0803-022), and by the European Commission’s FP7 (Grant IRG 268393). We are grateful to Drs. Cliona Hann and Siobhán Staunton for their helpful comments on the manuscript.

411

412 ## 6. References[1]

413 Allen, G.J., Kwak, J.M., Chu, S.P., Llopis, J., Tsien, R.Y., Harper, J.F., and Schroeder, J.I. (1999). Cameleon
414 calcium indicator reports cytoplasmic calcium dynamics in Arabidopsis guard cells. *Plant J* 19**,** 735-
415 747.
416 Alonso, M.T., and Garcia-Sancho, J. (2011). Nuclear Ca(2+) signalling. *Cell Calcium* 49**,** 280-289.
417 Baubet, V., Le Mouellic, H., Campbell, A.K., Lucas-Meunier, E., Fossier, P., and Brulet, P. (2000). Chimeric
418 green fluorescent protein-aequorin as bioluminescent Ca2+ reporters at the single-cell level. *Proc*
419 *Natl Acad Sci U S A* 97**,** 7260-7265.
420 Brini, M. (2008). Calcium-sensitive photoproteins. *Methods* 46**,** 160-166.
421 Cassidy, P.J., and Radda, G.K. (2005). Molecular imaging perspectives. *J R Soc Interface* 2**,** 133-144.
422 Chiesa, A., Rapizzi, E., Tosello, V., Pinton, P., De Virgilio, M., Fogarty, K.E., and Rizzuto, R. (2001).
423 Recombinant aequorin and green fluorescent protein as valuable tools in the study of cell signalling.
424 *Biochem J* 355**,** 1-12.
425 Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated
426 transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J* 16**,** 735-743.
427 Dodd, A.N., Jakobsen, M.K., Baker, A.J., Telzerow, A., Hou, S.W., Laplaze, L., Barrot, L., Poethig, R.S., Haseloff,
428 J., and Webb, A.A. (2006). Time of day modulates low-temperature Ca signals in Arabidopsis. *Plant J*
429 48**,** 962-973.
430 Fasano, J.M., Swanson, S.J., Blancaflor, E.B., Dowd, P.E., Kao, T.H., and Gilroy, S. (2001). Changes in root cap
431 pH are required for the gravity response of the Arabidopsis root. *Plant Cell* 13**,** 907-921.
432 Favre, P., Greppin, H., and Degli Agosti, R. (2011). Accession-dependent action potentials in Arabidopsis. *J*
433 *Plant Physiol* 168**,** 653-660.
434 Fricker, M.D., Plieth, C., Knight, H., Blancaflor, E., Knight, M.R., White, N.S., and Gilroy, S. (1999). "Chapter
435 forty-two - Fluorescence and Luminescence Techniques to Probe Ion Activities in Living Plant Cells,"
436 in *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity (Second Edition),* ed. W.T. Mason.
437 (London: Academic Press), 569-596.
438 Gjetting, K.S., Ytting, C.K., Schulz, A., and Fuglsang, A.T. (2012). Live imaging of intra- and extracellular pH in
439 plants using pHusion, a novel genetically encoded biosensor. *J Exp Bot* 63**,** 3207-3218.
440 Gorokhovatsky, A.Y., Marchenkov, V.V., Rudenko, N.V., Ivashina, T.V., Ksenzenko, V.N., Burkhardt, N.,
441 Semisotnov, G.V., Vinokurov, L.M., and Alakhov, Y.B. (2004). Fusion of Aequorea victoria GFP and
442 aequorin provides their Ca(2+)-induced interaction that results in red shift of GFP absorption and
443 efficient bioluminescence energy transfer. *Biochem Biophys Res Commun* 320**,** 703-711.
444 Iwano, M., Ngo, Q.A., Entani, T., Shiba, H., Nagai, T., Miyawaki, A., Isogai, A., Grossniklaus, U., and Takayama,
445 S. (2012). Cytoplasmic Ca2+ changes dynamically during the interaction of the pollen tube with
446 synergid cells. *Development* 139**,** 4202-4209.
447 Johnson, C.H., Knight, M.R., Kondo, T., Masson, P., Sedbrook, J., Haley, A., and Trewavas, A. (1995). Circadian
448 oscillations of cytosolic and chloroplastic free calcium in plants. *Science* 269**,** 1863-1865.
449 Knight, M.R., Campbell, A.K., Smith, S.M., and Trewavas, A.J. (1991). Transgenic plant aequorin reports the
450 effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* 352**,** 524-526.
451 Marti, M.C., Stancombe, M.A., and Webb, A.A. (2013). Cell- and stimulus type-specific intracellular free Ca2+
452 signals in Arabidopsis. *Plant Physiol* 163**,** 625-634.

[1] Provide the doi when available, and ALL complete author names.

Martin, J.R., Rogers, K.L., Chagneau, C., and Brulet, P. (2007). In vivo bioluminescence imaging of Ca signalling in the brain of Drosophila. *PLoS One* 2**,** e275.

Mithofer, A., and Mazars, C. (2002). Aequorin-based measurements of intracellular Ca2+-signatures in plant cells. *Biol Proced Online* 4**,** 105-118.

Miwa, H., Sun, J., Oldroyd, G.E., and Downie, J.A. (2006). Analysis of calcium spiking using a cameleon calcium sensor reveals that nodulation gene expression is regulated by calcium spike number and the developmental status of the cell. *Plant J* 48**,** 883-894.

Monshausen, G.B., Messerli, M.A., and Gilroy, S. (2008). Imaging of the Yellow Cameleon 3.6 indicator reveals that elevations in cytosolic Ca2+ follow oscillating increases in growth in root hairs of Arabidopsis. *Plant Physiol* 147**,** 1690-1698.

Monshausen, G.B., Miller, N.D., Murphy, A.S., and Gilroy, S. (2011). Dynamics of auxin-dependent Ca2+ and pH signaling in root growth revealed by integrating high-resolution imaging with automated computer vision-based analysis. *Plant J* 65**,** 309-318.

Mousavi, S.A., Chauvin, A., Pascaud, F., Kellenberger, S., and Farmer, E.E. (2013). GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature* 500**,** 422-426.

Nakagawa, T., Suzuki, T., Murata, S., Nakamura, S., Hino, T., Maeo, K., Tabata, R., Kawai, T., Tanaka, K., Niwa, Y., Watanabe, Y., Nakamura, K., Kimura, T., and Ishiguro, S. (2007). Improved Gateway binary vectors: high-performance vectors for creation of fusion constructs in transgenic analysis of plants. *Biosci Biotechnol Biochem* 71**,** 2095-2100.

Naumann, E.A., Kampff, A.R., Prober, D.A., Schier, A.F., and Engert, F. (2010). Monitoring neural activity with bioluminescence during natural behavior. *Nat Neurosci* 13**,** 513-520.

Perez Koldenkova, V., and Nagai, T. (2013). Genetically encoded Ca(2+) indicators: Properties and evaluation. *Biochim Biophys Acta*.

Rivadossi, A., Zucchelli, G., Garlaschi, F.M., and Jennings, R.C. (2004). Light absorption by the chlorophyll a-b complexes of photosystem II in a leaf with special reference to LHCII. *Photochem Photobiol* 80**,** 492-498.

Rogers, K.L., Martin, J.R., Renaud, O., Karplus, E., Nicola, M.A., Nguyen, M., Picaud, S., Shorte, S.L., and Brulet, P. (2008). Electron-multiplying charge-coupled detector-based bioluminescence recording of single-cell Ca2+. *J Biomed Opt* 13**,** 031211.

Rogers, K.L., Stinnakre, J., Agulhon, C., Jublot, D., Shorte, S.L., Kremer, E.J., and Brulet, P. (2005). Visualization of local Ca2+ dynamics with genetically encoded bioluminescent reporters. *Eur J Neurosci* 21**,** 597-610.

Sai, J., and Johnson, C.H. (2002). Dark-stimulated calcium ion fluxes in the chloroplast stroma and cytosol. *Plant Cell* 14**,** 1279-1291.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9**,** 671-675.

Steinhorst, L., and Kudla, J. (2013). Calcium and reactive oxygen species rule the waves of signaling. *Plant Physiol* 163**,** 471-485.

Taylor, K.L., Brackenridge, A.E., Vivier, M.A., and Oberholster, A. (2006). High-performance liquid chromatography profiling of the major carotenoids in Arabidopsis thaliana leaf tissue. *J Chromatogr A* 1121**,** 83-91.

Ward, W.W., and Cormier, M.J. (1976). In vitro energy transfer in *Renilla* bioluminescence. *The Journal of Physical Chemistry* 80**,** 2289-2291.

Webb, S.E., Rogers, K.L., Karplus, E., and Miller, A.L. (2010). The use of aequorins to record and visualize Ca(2+) dynamics: from subcellular microdomains to whole organisms. *Methods Cell Biol* 99**,** 263-300.

Zhu, X., Feng, Y., Liang, G., Liu, N., and Zhu, J.K. (2013). Aequorin-based luminescence imaging reveals stimulus- and tissue-specific Ca2+ dynamics in Arabidopsis plants. *Mol Plant*.

Figure legends

Figure 1: **Construction and operating principle of the G5A Ca^{2+} reporter.** **(A)** Structure of the chimeric gene encoding the G5A protein. The open-reading frame (*ORF*) encoding the green fluorescent protein (GFP) is linked to the *ORF* encoding the apo-aequorin by five repeats of a short sequence encoding a SGGSGSGGQ oligopeptide. The structure and length of this linker ensures optimal bioluminescence resonance energy transfer (BRET) between the aequorin and the GFP (Baubet et al., 2000). Using the pGWB502Ω vector, expression of the *G5A* gene is controlled by the p35S strong promoter. **(B)** Principle of the aequorin bioluminescence emission upon fixation of Ca^{2+}. In the presence of the coelenterazine cofactor ("C"), the apo-aequorin is reconstituted as a functional aequorin. Upon binding of three Ca^{2+} ions, the cofactor is released with emission of light at ~470 nm. **(C)** Principle of G5A fluorescence emission upon fixation of Ca^{2+}. The tight molecular coupling between the aequorin and GFP moieties of G5A, a BRET phenomenon between aequorin and GFP, leads to excitation and fluorescence emission of the latter at 510 nm.

Figure 2: **Constitutive over-expression of the G5A fusion protein in all tissues of *Arabidopsis thaliana* seedlings**. Seven- **(A-F)** or 21-day old **(G-J)** G5A-expressing plants were checked for this Ca^{2+} reporter expression by direct excitation of GFP (at 488 nm) under a stereo microscope **(A,B)** or a confocal microscope **(C-J)**. Fluorescence emission by GFP is shown in **A, C, E, G, I** and corresponding bright field images are shown respectively in **B**, **D**, **F**, **H**, **J**. Fluorescent stereo microscope observation of intact seedlings allowed detection of GFP signals in cotyledons and the primary root **(A, B)**. Confocal microscopy observation of leaf epidermal cells **(C, D)** and mesophyll cells **(E, F)** showed a wide expression of G5A in leaves. Sub-cellular localisation of G5A was observed in both the cytosol and the nucleus (arrows) of root cells **(G, H)** and in stomatal guard cells **(I, J)**. Scale bar = 20 µm.

Figure 3: *In vitro* calibration of the two G5A and aequorin Ca^{2+} reporters. **(A)** Immunoblotting, with an anti-aequorin polyclonal antibody, of soluble protein fractions from fifty 14-day old plants of the *G5A* and *Aeq* lines. Signals of immunoblotting were quantified and indicated a G5A/aequorin ratio of protein accumulation of 1.48±0.14 (average of one hundred seedlings obtained in two independent experiments ±SE). **(B)** *In vitro* calibration curves of G5A and aequorin within soluble protein extracts from *G5A* and *Aeq* plants. Equivalent amounts of Ca^{2+} reporters were used for the comparison (based on assay reported in **A**) and incubated in a buffer containing 2.5 µM coelenterazine HCP cofactor for 2 h in the dark at 4°C prior light emission assay in the presence of various free Ca^{2+} amounts (see Materials and Methods). Results are expressed as the ratio ±SE (n=6 in two independent experiments) of maximum light over total light (L/L_{total}) as outlined in Materials and Methods. The linear range of L/L_{total} ratio as a function of free Ca^{2+} concentration is shown for G5A (full line) and aequorin (dashed line).

Figure 4: *In vitro* and *in vivo* comparison of light emission by the G5A and aequorin Ca^{2+} reporters. G5A emits more light than aequorin both *in vitro* and *in vivo*. **(A)** *In vitro* assay of light emission from equal amounts of Ca^{2+} reporters G5A and aequorin is plotted against buffer free Ca^{2+} concentration. Results (mean±SE, n=6) are expressed as the ratio of signal (maximum emitted light)

over noise. **(B)** Representative *in vivo* Ca^{2+} signals emitted from 7-day old *G5A* (top) and *Aeq* (bottom) plants over different exposition time lapses (10, 30 and 60 s). Left panel shows bright field view (scale bar = 1 cm) of the imaged plants. The other panels display cumulative Ca^{2+} signals in false colours (colour scale in the 10 s-labelled panel).

Figure 5: **Ca^{2+} signals detected in response to dark onset from plants expressing G5A or aequorin. (A)** Bright field view of batches of 7-day old *G5A* (left) and *Aeq* (right) transgenic Arabidopsis seedlings over-expressing Ca^{2+} reporters. Scale bar = 1 cm. **(B)** Cumulative amount of light emitted from these plants after dark onset, over 150 min, expressed in false colors (scale shown at right, in device-dependent arbitrary unit or "RLU", standing for "relative light unit"). **(C)** Time-course, during 150 min, of the cumulative light emitted over 60 s time lapses from plants in **A**,**B** (data are means±SE of ten independent experiments with 4 *G5A* and 5 *Aeq* plants). Ca^{2+} signals from the *Aeq* plants show kinetics (inset) similar to *G5A* plants but with approximately 5 times less amount of light.

Figure 6: Salt stress on roots elicits long distance Ca^{2+} signals in leaves. **(A)** Time series of photos (time of capture indicated in the left bottom corner of each image) showing propagation of Ca^{2+} signals in aerial part of an intact plant. First image of the series is a bright-field view of the plant. At time = 0, a solution of NaCl (200 mM final concentration) was applied to roots and light subsequently emitted from leaves was accumulated over 60 min (each image shows cumulative light over a 30 s time lapse). As early as 0.5 min, Ca^{2+} signals were detected on petioles and propagation of Ca^{2+} signals to the end of each mature leaf were observed. Young leaves responded only at 3.5-4.5 min after NaCl stress (red arrows) **(B)** Quantification of light signals from the whole plant over 60 min.

Figure 7: **Analysis of the propagation on leaves of Ca^{2+} signals induced by salt stress applied to roots. (A)** Ca^{2+} signals on each leaf were analysed with ImageJ. Velocities (mm/s) of Ca^{2+} signals were determined for each leaf along paths figured by red dashed arrows (values of Ca^{2+} signal velocity are presented on Table 1). **(B)** Values of velocity at some points along main leaf veins are represented (same space scale as in **A**). Representation is in false colours with scale (in mm/s) given at the right.

Figure 8: Salt application on detached leaf elicits Ca^{2+} waves along the vascular tissue. (A) Time series of photos (time of capture indicated in the right top corner of each image in min:sec) showing propagation of Ca^{2+} signals in detached leaf. First image of the series is a bright-field view of the plant. At time = 1 min, 100 µL of a solution of NaCl (200 mM) was dispensed onto petiole (white arrow) and light subsequently emitted from leaves was accumulated over 7 min (each image shows cumulative light over a 15 s time lapse). Ca^{2+} signals were immediately detected on petioles and propagation of Ca^{2+} signals to the end of leaf was observed. Scale bar = 1 cm. Calibration bar in grey scale is shown in the last image (RLU). **(B)** Quantification of light signals from ROI for the whole leaf (see **C**) over 8 min (in RLU per 15 s). At time = 1 min, NaCl was dropped on petiole (black arrow). The two peaks denoted by ∗ and ∗∗ correspond to Ca^{2+} increase in the basal third and the rest of the leaf respectively. **(C)** Localisation of Ca^{2+} signals is represented by z-stack of standard deviation of Ca^{2+} signals over the 8 minutes of measurement. Ca^{2+} signals seem to take place in leaf veins. The basal third of the leaf is indicated by ∗ and the rest of the leaf by ∗∗. Line scan of primary vein (red dashed line X-Y) is analysed in (**D**). **(D)** Kymographic representation of Ca^{2+} signals in the primary vein (X-Y from **C**). Three different velocities of Ca^{2+} signals could be measured and are

584 indicated on the figure.

585 **Figure 9: Analysis of the propagation on leaves of Ca^{2+} signals induced by salt stress applied to**
586 **detached leaf.** **(A)** Ca^{2+} signals on each vein were analyzed with ImageJ. Velocities (mm/s) of Ca^{2+}
587 signals were determined along paths figured by dashed arrows (details of Ca^{2+} signal velocity are
588 presented on Table 2). **(B)** Values of velocity at some points along main leaf veins are represented
589 (same space scale as in **A**). Representation is in false colours with scale (in mm/s) given at the right.

590 **Table 1: Ca^{2+} waves properties on different leaves of intact plant**

591 **Table 2: Ca^{2+} waves properties on a salt-stressed detached leaf**

592 **Supporting information video S1**: Light emission from intact 4 week-old G5A-expressing plant
593 leaves upon salt stress applied to roots. The left part **(A)** shows the bright field view of the plant
594 (scale bar is 2 cm). Video in the right part **(B)** is made of frames, each corresponding to photons
595 collected over a 30 s time lapse, displayed at a rate of 10 frames per second (video rate is x300). At
596 time zero of the video, the plant has already spent 20 min in darkness (data not shown) and no Ca^{2+}
597 signals were detected. Application of 200 mM NaCl to roots at t=5 min induced long distance Ca^{2+}
598 signaling from roots to leaves over 77 min. NaCl induced different Ca^{2+} signals (waves) in young and
599 expanded leaves. Propagation of strong Ca^{2+} signals to fully expanded leaves can be visualized just
600 after the NaCl stress and are followed by slow Ca^{2+} variations in leaves over 77 min. Small young
601 leaves emit strong and transient Ca^{2+} signals 3.5-4.5 min after the NaCl stress.

602

603 **Supporting information video S2**: Light emission from intact leaf detached from a G5A-expressing
604 plant upon salt stress applied to the petiole. The left part **(A)** shows the bright field view of the leaf
605 (scale bar is 1 cm). Video in the right part **(B)** is made of frames, each corresponding to photons
606 collected over a 15 s time lapse, displayed at a rate of 10 frames per second (video rate is x150). At
607 time zero no Ca^{2+} signals are detected. Application of 200 mM NaCl to petiole t=1 min induced Ca^{2+}
608 waves from petiole to leaf tips over 7 min.

Figure 1

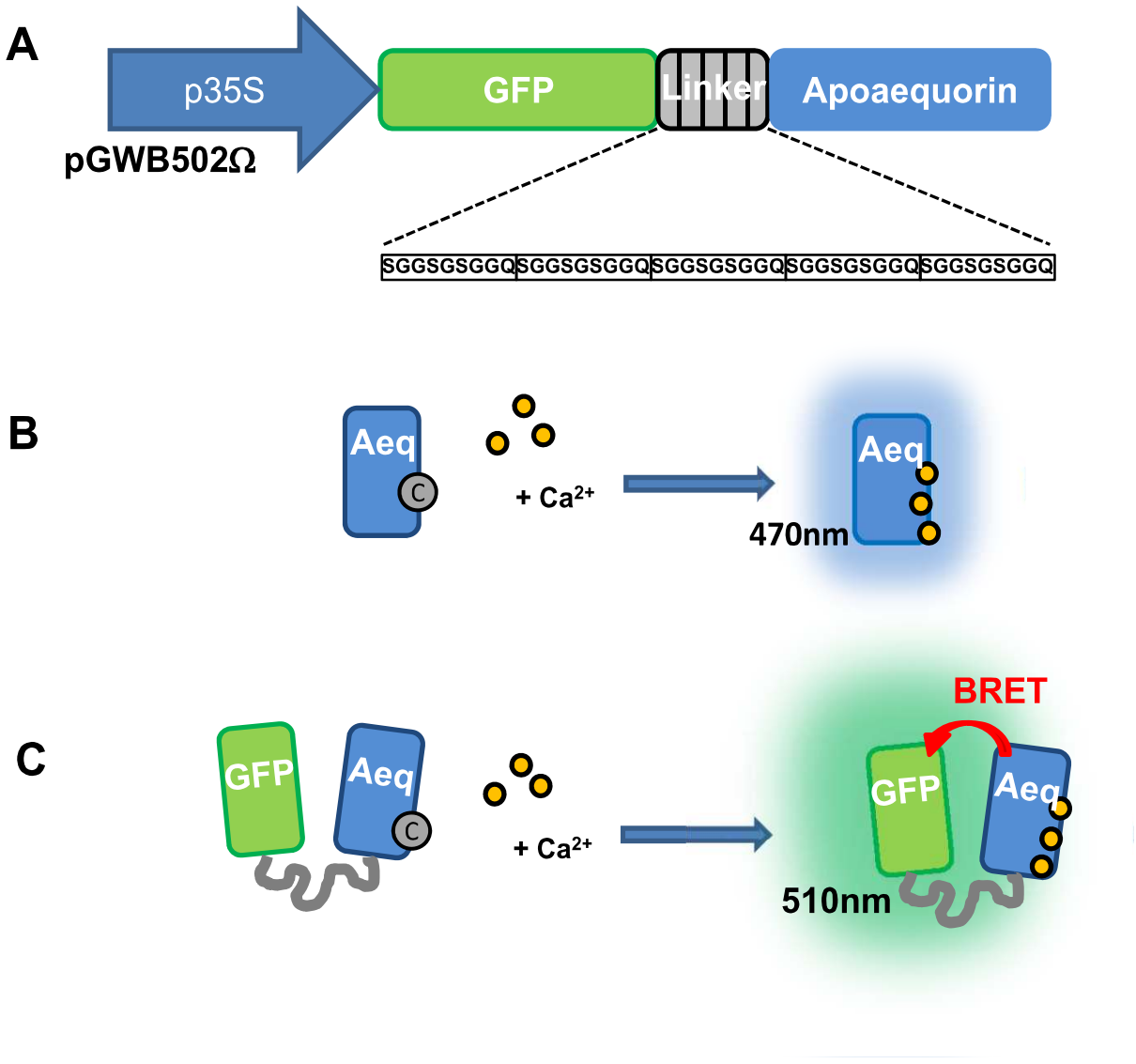

A
p35S
GFP
Linker
Apoaequorin
pGWB502Ω
SGGSGSGGQ SGGSGSGGQ SGGSGSGGQ SGGSGSGGQ SGGSGSGGQ
B
Aeq
C
+ Ca2+
Aeq
470nm
C
GFP
Aeq
C
+ Ca2+
BRET
GFP
Aeq
510nm

Figure 2

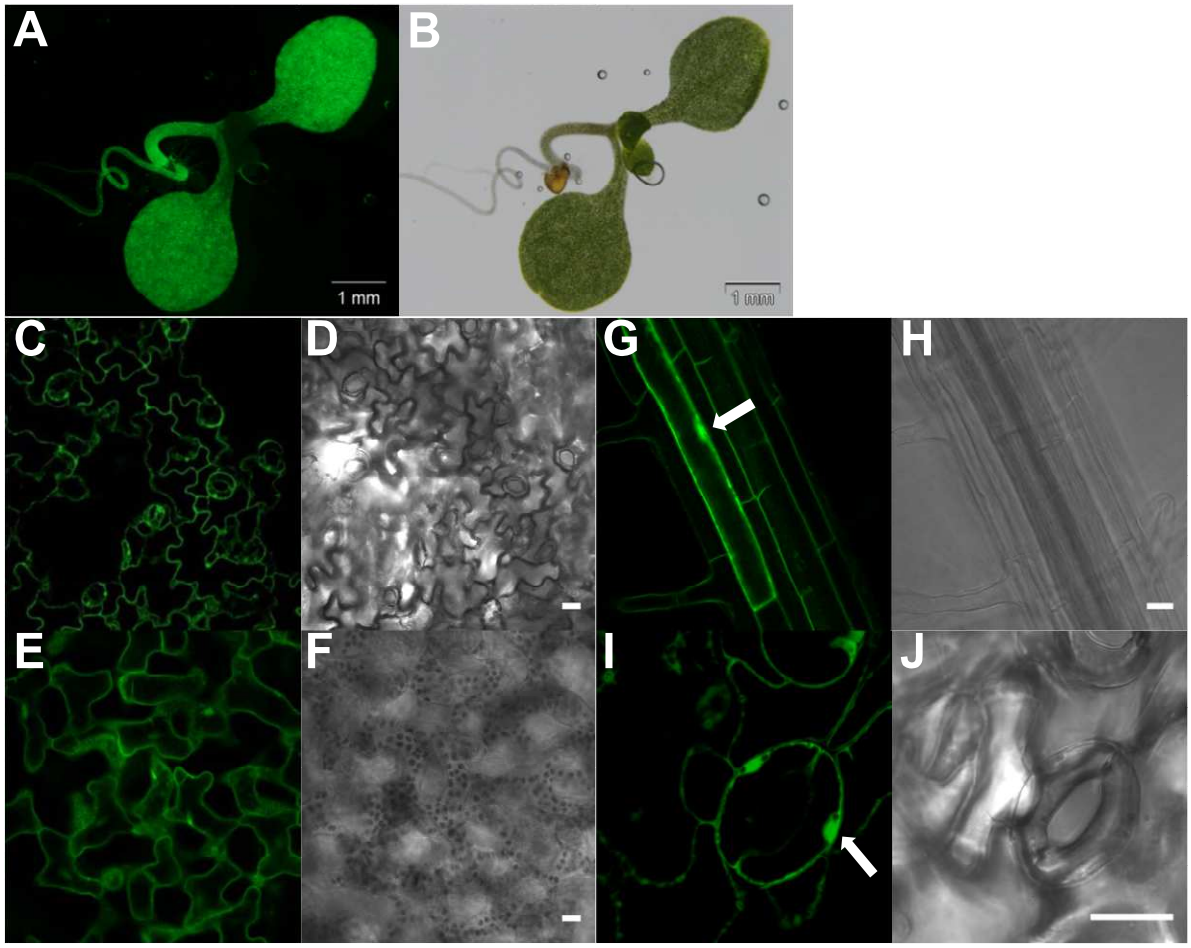


Figure 3

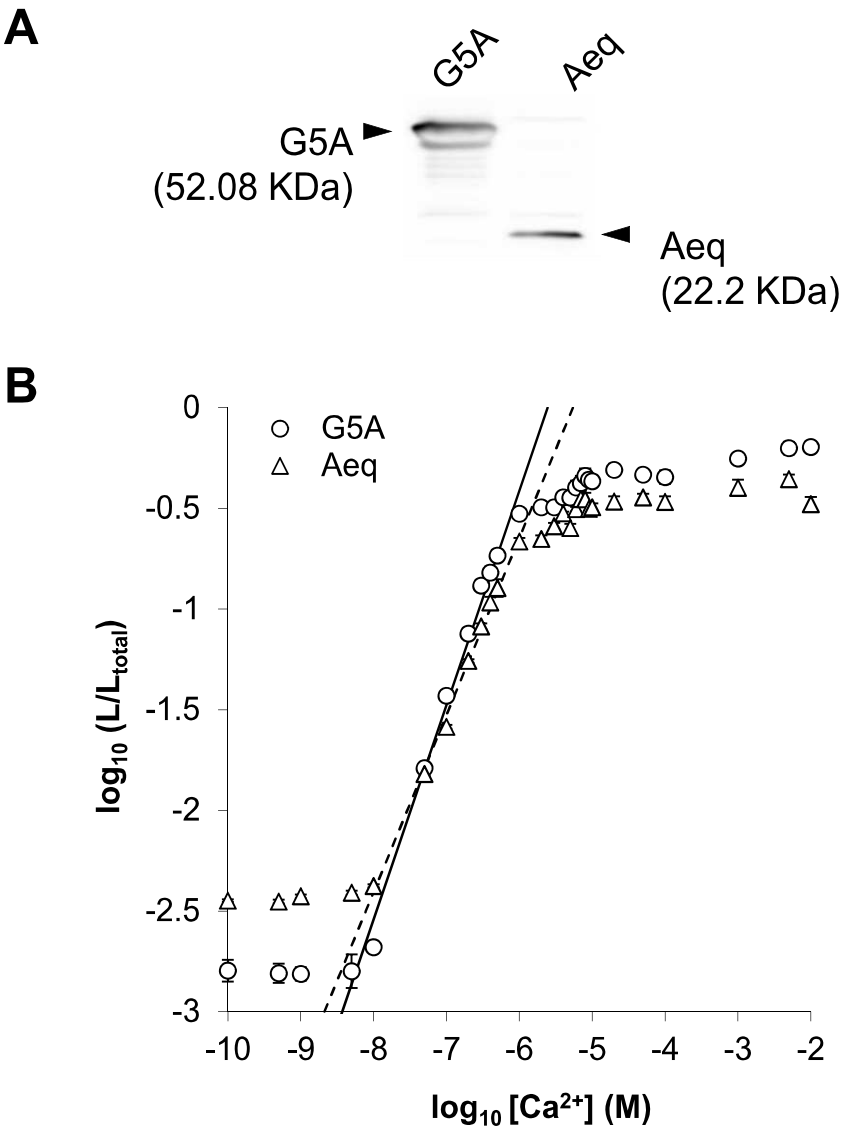

A
G5A
Aeq
G5A
(52.08 KDa)
Aeq
(22.2 KDa)
B
G5A
Aeq
0
-0.5
-1
-1.5
-2
-2.5
-3
-10
-9
-8
-7
-6
-5
-4
-3
-2
log10 (L/Ltotal)
log10 [Ca2+] (M)

Figure 4

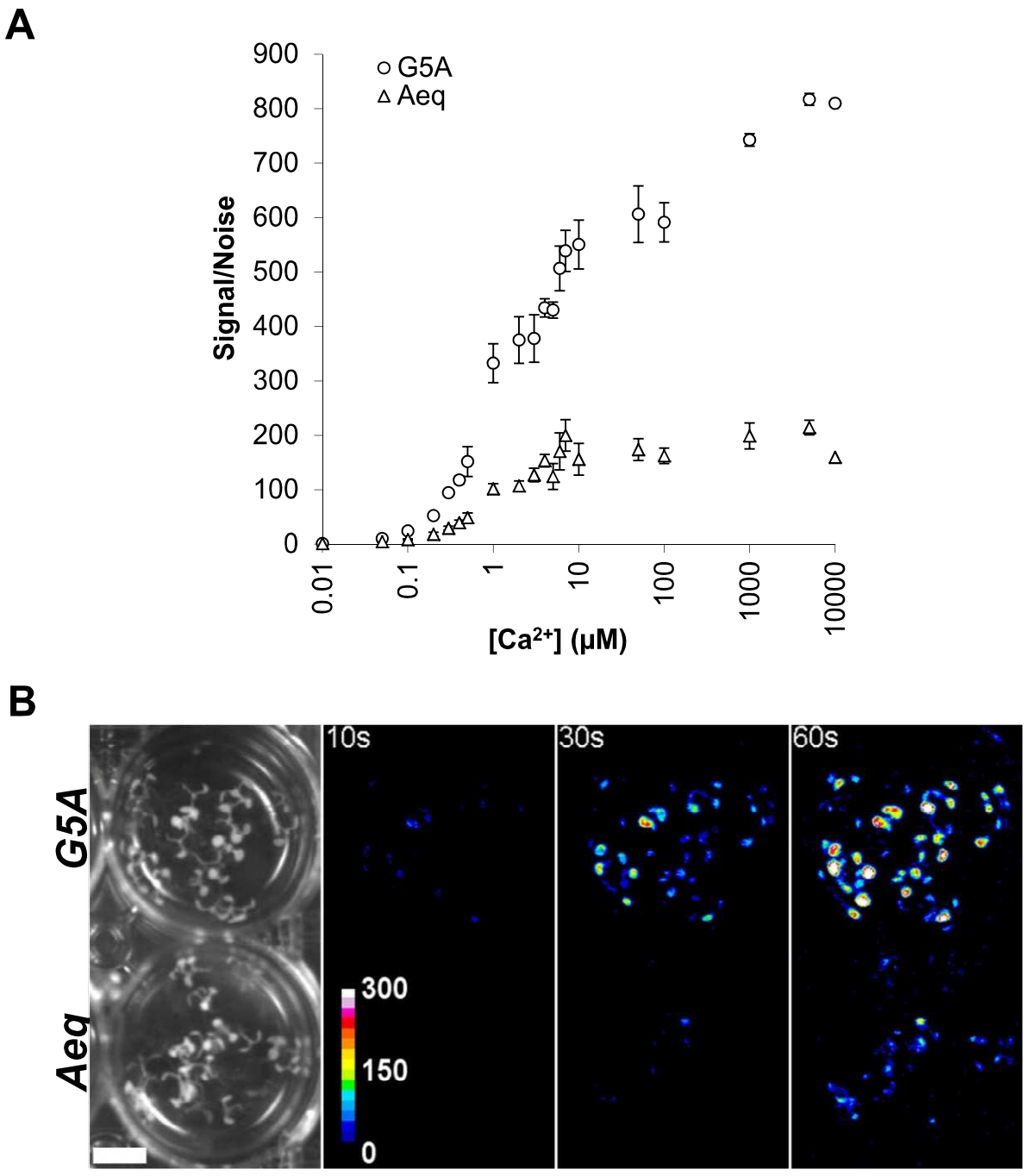

A
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
G5A
Aeq
Signal/Noise
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
[Ca2+] (μM)
B
G5A
Aeq
10s
30s
60s
300
150
0

Figure 5

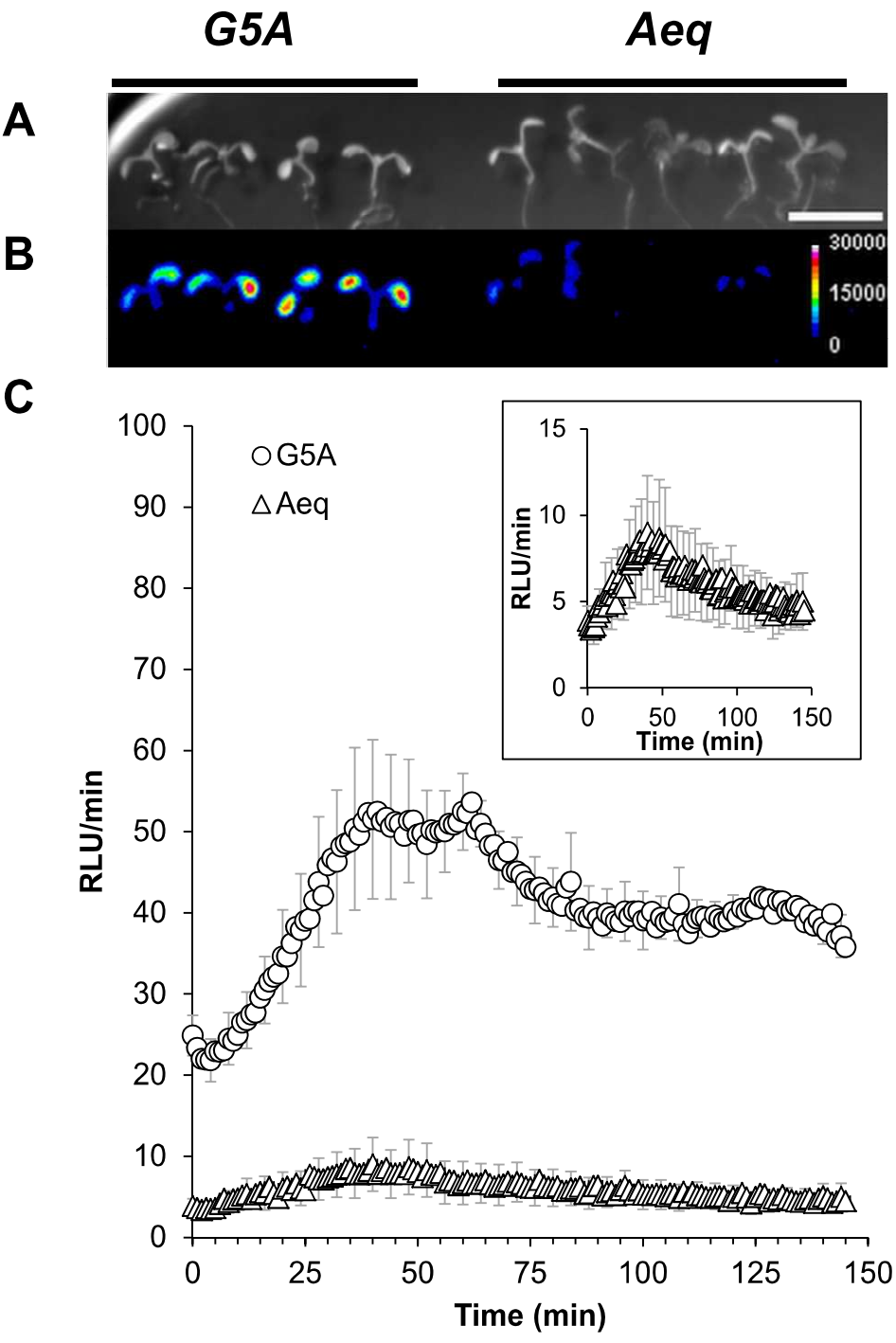
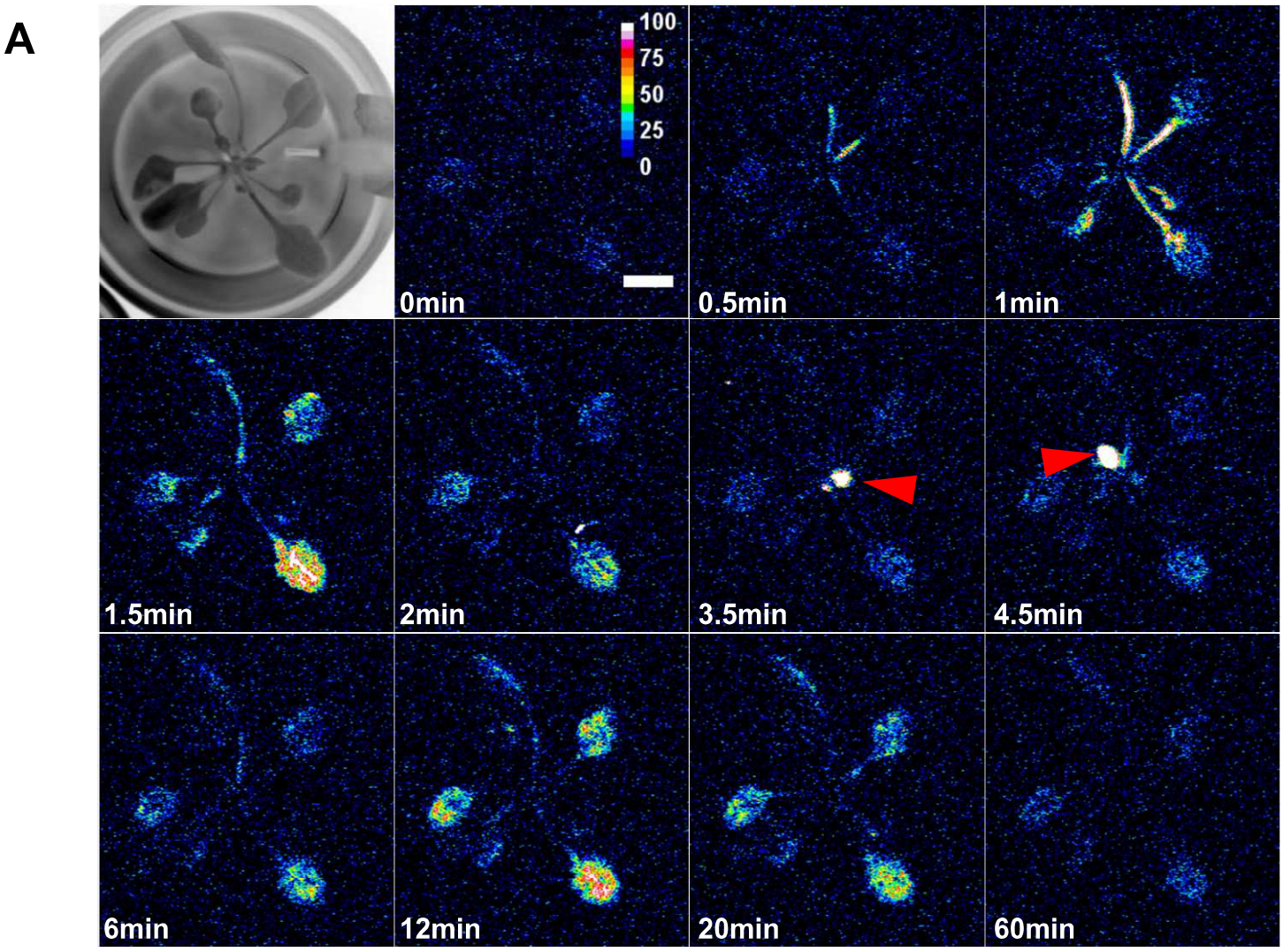

G5A
Aeq
A
B
C
30000
15000
0
G5A
Aeq
RLU/min
Time (min)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0
25
50
75
100
125
150
0
5
10
15
0
50
100
150

Figure 6


A
100
75
50
25
0
0min
0.5min
1min
1.5min
2min
3.5min
4.5min
6min
12min
20min
60min

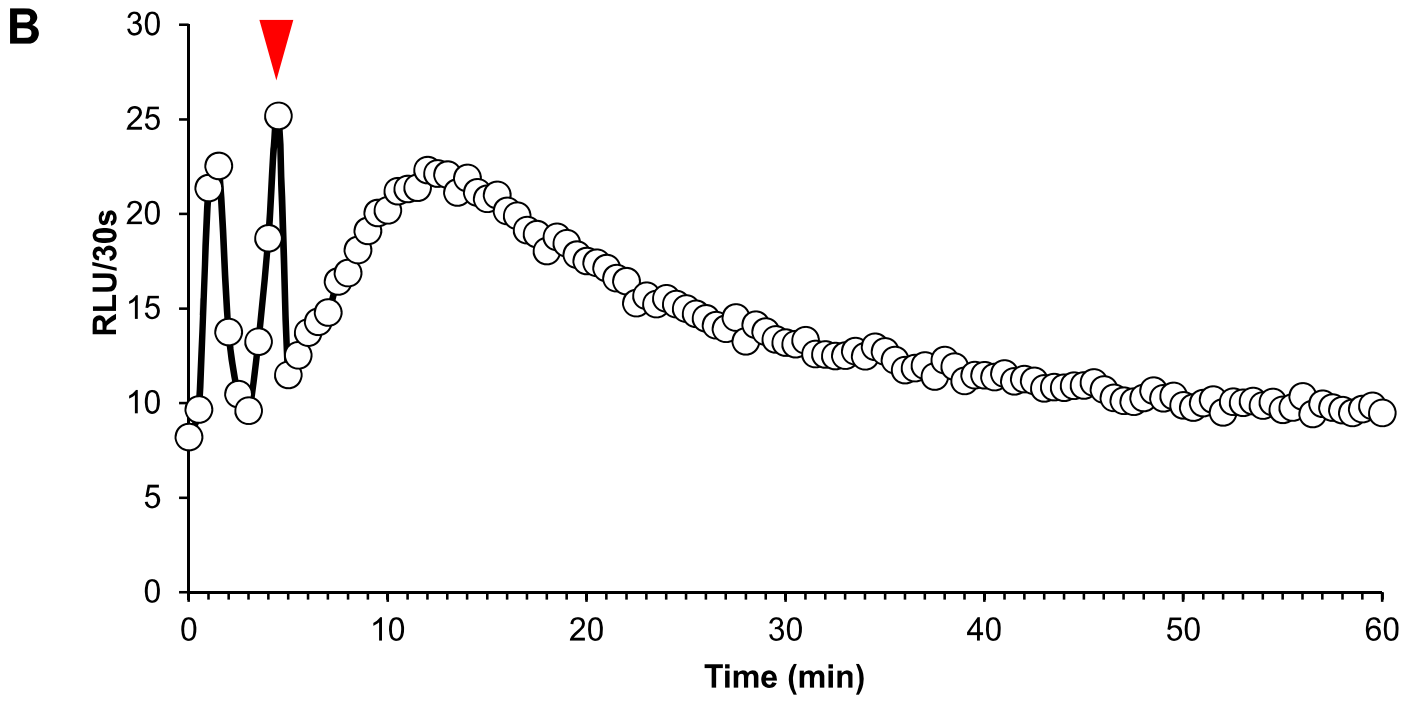

B
RLU/30s
Time (min)
0
5
10
15
20
25
30
0
10
20
30
40
50
60

Figure 7

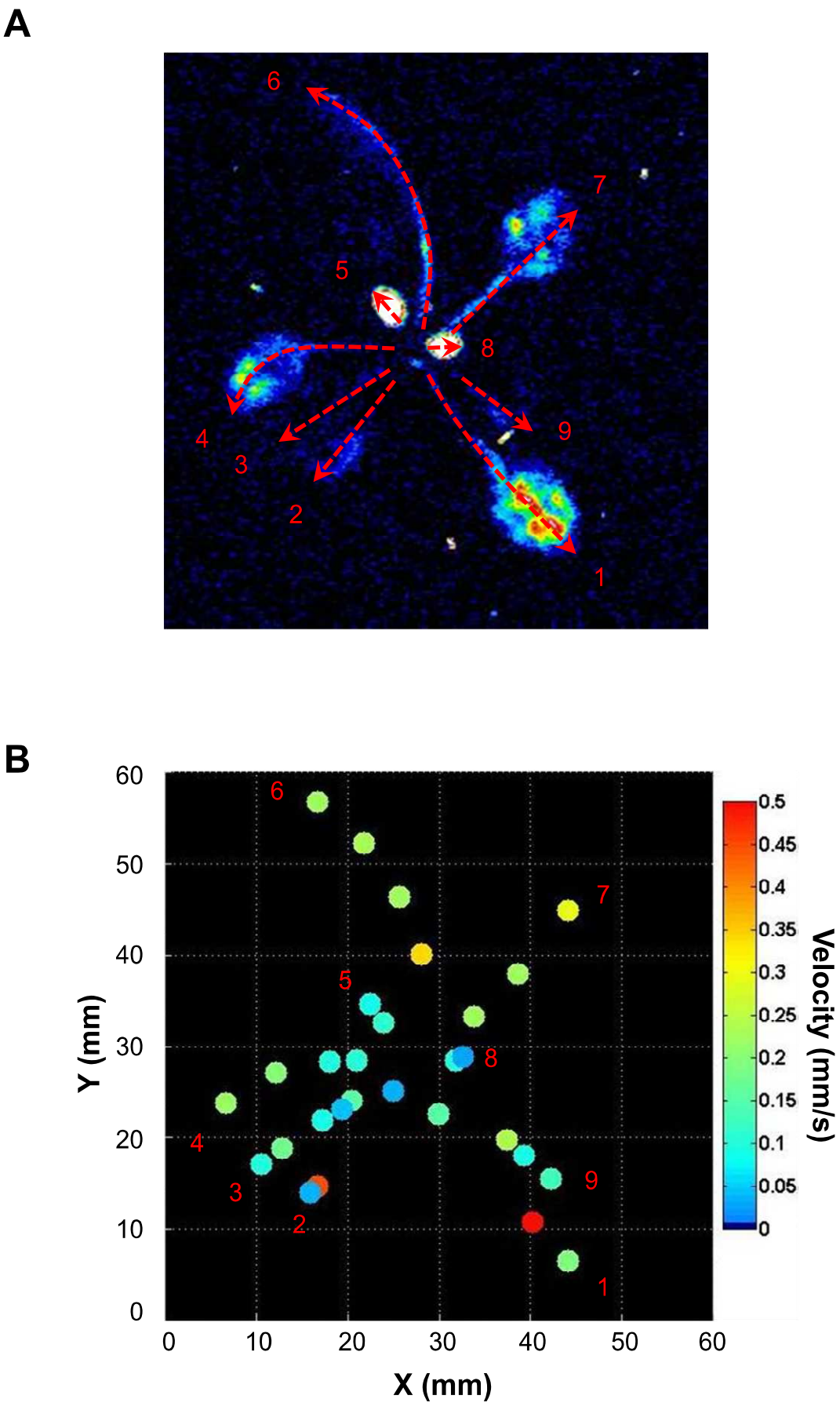

A
6
7
5
8
4
9
3
2
1
B
60
50
40
30
20
10
0
Y (mm)
0
10
20
30
40
50
60
X (mm)
6
7
5
8
4
9
3
2
1
0.5
0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
Velocity (mm/s)

Figure 8

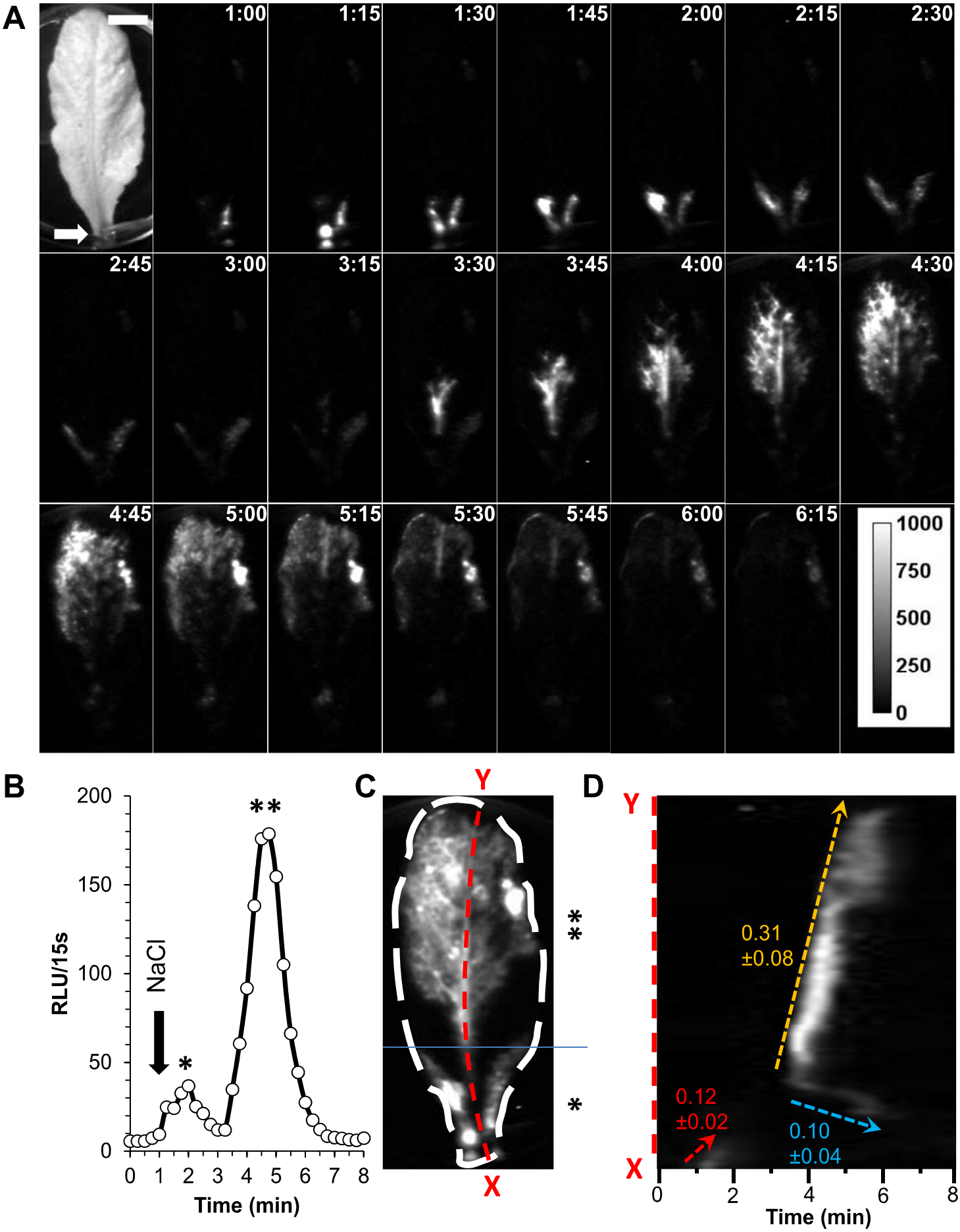
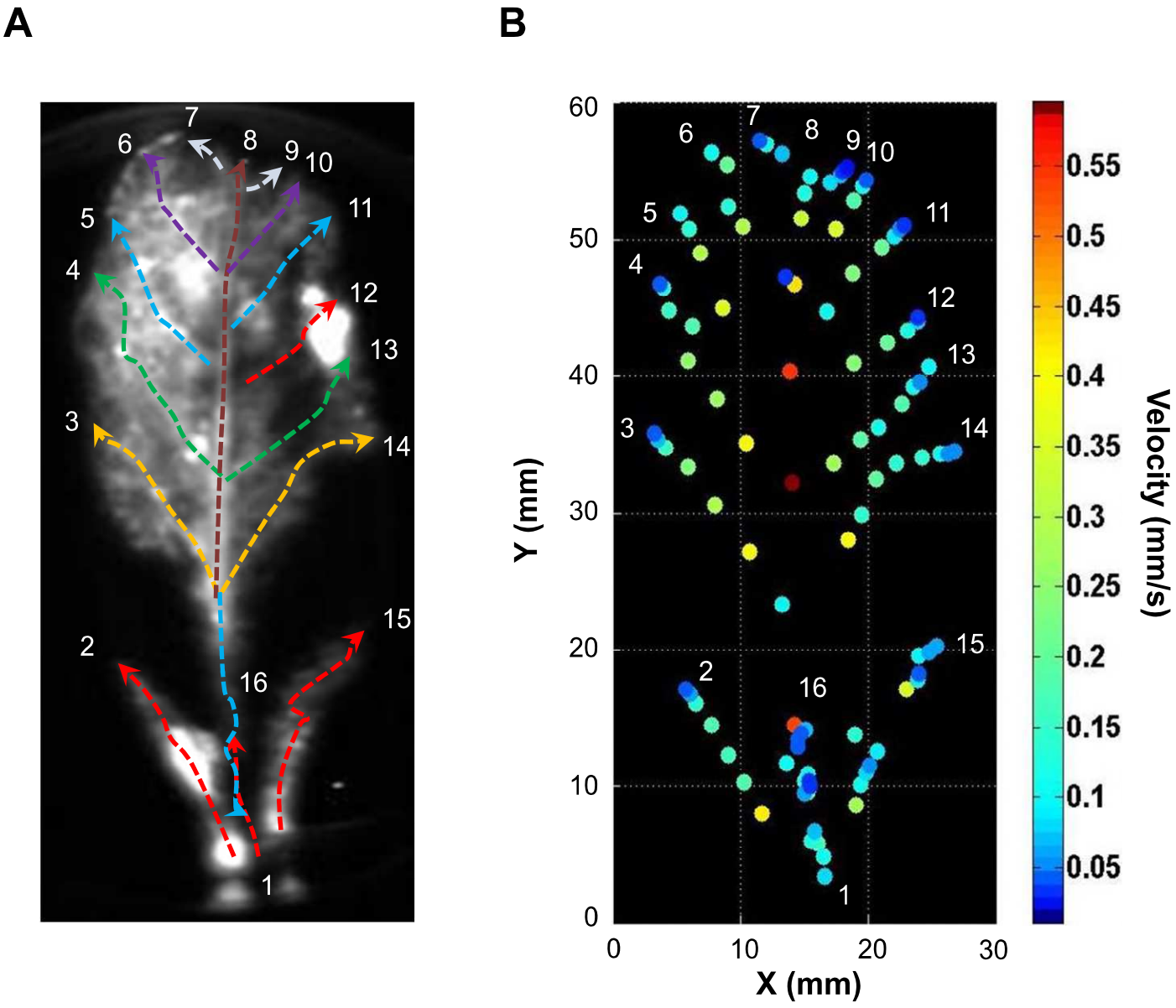

A
1:00
1:15
1:30
1:45
2:00
2:15
2:30
2:45
3:00
3:15
3:30
3:45
4:00
4:15
4:30
4:45
5:00
5:15
5:30
5:45
6:00
6:15
1000
750
500
250
0
B
RLU/15s
200
150
100
50
0
NaCl
*
**
0 1 2 3 4 5 6 7 8
Time (min)
C
Y
X
**
*
D
Y
X
0.31
±0.08
0.12
±0.02
0.10
±0.04
0 2 4 6 8
Time (min)

Figure 9


A
B
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
Y (mm)
X (mm)
Velocity (mm/s)
0
10
20
30
40
50
60
0.05
0.1
0.15
0.2
0.25
0.3
0.35
0.4
0.45
0.5
0.55

Annexe 4 : Article en preparation

“CPK13, a non-canonical CPK, specifically reduces stomatal opening through inhibition of KAT2 Shaker channels”

CPK13, a non-canonical CPK, specifically reduces stomatal opening through inhibition of KAT2 Shaker channels

Elsa RONZIER[1], Claire CORRATGÉ-FAILLIE[1], Frédéric SANCHEZ[1], Karine PRADO[1], Christian BRIÈRE[2], Nathalie LEONHARDT[3], Jean-Baptiste THIBAUD[1], Tou Cheu XIONG[1]

[1]Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, UMR CNRS/INRA/SupAgro/UM2 Institut de Biologie Intégrative des plantes 'Claude Grignon' 2 place Viala, 34060 Montpellier, France.
[2]Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, Université Paul Sabatier, CNRS UMR 5546, Pôle de Biotechnologies Végétales 24, chemin de Borde Rouge, B.P.42617 Auzeville, 31326 Castanet-Tolosan, France.
[3]Laboratoire de Biologie du Développement des Plantes (LBDP), UMR 7265 CNRS-CEA-Université Aix-Marseille II. CEA Cadarache Bat 156, 13108 St Paul Lez Durance, France.

One sentence summary: A kinase is identified, which phosphorylates and inhibits inward potassium channels in guard cells, resulting, in a Ca^{2+}-, pH- and abscisic acid-independent manner, in a reduction of stomatal aperture and, on the long term, of plant biomass

Ca^{2+}-dependent protein kinases (CPKs) form a large family of 34 genes in *Arabidospsis*. Based on their dependence on Ca^{2+}, CPKs can be sorted in three types. First, that of strictly Ca^{2+}-dependent CPKs, second that of Ca^{2+}-stimulated CPKs (with a significant basal activity in the absence of Ca^{2+}) and third the type of essentially calcium-insensitive CPKs. Here, we report on a third-type CPK, CPK13, which is expressed in guard cells, but of which the role is still unknown. We confirm expression of CPK13 in Arabidopsis guard cells and we present evidence that the K^+ channel KAT2 is a target of this kinase. Over-expressing CPK13 reduces and delays light-induced stomatal opening, this resulting in a significantly biomass reduction in challenging light conditions. KAT2 is confirmed to be a significant target for regulators of stomata movements, and CPK13 is identified as such a regulator.

Stomata are microscopic organs at the leaf surface, each composed of two so-called guard cells forming a pore. Opening or closing these pores is the way through which plants control their gas exchanges with the surrounding atmosphere, *i.e.*, carbon dioxide uptake to feed the photosynthetic process and transpirational loss of water vapor. Stomatal movements result from osmotically-driven fluxes of water, which follow massive exchanges of solutes, including K^+ ions, between guard cells and surrounding tissues (Hetherington, 2001; Nilson and Assmann, 2007).

Ca^{2+} signaling is one of the signaling pathway that control stomatal movements (Blatt, 2000; Laanemets et al., 2013). For example, Ca^{2+} signals have been reported to promote stomatal closure through the inhibition of inward and activation of outward K^+ channels (Blatt, 2000; Hetherington and Brownlee, 2004; Pei et al., 1998; Schroeder et al., 2001). However, little is known on the molecular identity of the links between Ca^{2+} events and Shaker K^+ channel activity. Plants express two large kinase families, of which the activity is in relation with Ca^{2+} signaling. Firstly, CBL-interacting protein kinases (CIPKs, 25 genes in Arabidopsis) are indirectly controlled by their interaction with a set of calcium sensors, the calcineurin B-like proteins (CBLs, 10 genes in Arabidopsis). This complex forms a fascinating network of potential Ca^{2+}-signaling decoders (Luan, 2009; Weinl and Kudla, 2009), which have been addressed in numerous reports (Batistic et al., 2010; Held et al., 2011; Weinl and Kudla, 2009). In particular, some CBL-CIPK pairs have been shown to regulate Shaker channels like AKT1 (Lan et al., 2011; Xu et al., 2006) or AKT2 (Held et al., 2011). Secondly, Ca^{2+}-dependent protein kinases (CPKs), form an even larger family (34 genes in Arabidopsis) of proteins combining a kinase domain with ability to bind Ca^{2+} thanks to so-called EF-hands (Cheng et al., 2002; Harmon et al., 2000; Harper et al., 1991; Harper et al., 2004). CPKs, which, interestingly, are not found in animal cells, exhibit different calcium dependencies (Boudsocq et al., 2012) and, with respect to this, three types of CPKs can be considered: first, strictly Ca^{2+}-dependent CPKs; second, Ca^{2+}-stimulated CPKs (with a significant basal activity in the absence of Ca^{2+}); third, essentially Ca^{2+}-insensitive CPKs (however structurally close to kinases of groups 1 and 2).

Pioneering work by Luan *et al.* in 1993 (Luan et al., 1993) evidenced in *Vicia faba* guard cells that inward K^+ channels were regulated by some Ca^{2+}-dependent kinase. Then, such a Ca^{2+}-dependent kinase could be purified from *Vicia* guard cells and checked to actually phosphorylate the cloned KAT1 Shaker channel (natively expressed in Arabidopsis guard cells, Li *et al.* 1998).

Since, several *cpk*- Arabidopsis mutant lines have been shown to be impaired in stomatal movements, for example *cpk10* (Ca^{2+} insensitive), *cpk4/cpk11* (Ca^{2+} dependent), *cpk3/cpk6/cpk23* (Ca^{2+} dependent) (Geiger et al., 2010; Hubbard et al., 2012; Mori et al., 2006; Munemasa et al., 2011).

Of the nine genes encoding voltage-dependent K^+ channels (Shaker) in *Arabidopsis thaliana* (Hedrich, 2012; Lebaudy et al., 2007; Véry and Sentenac, 2002; Véry and Sentenac, 2003) six are expressed in guard cells and play a role in stomatal movements: the *GORK* gene, encoding an outward K^+ channel subunit, and the *AKT1*, *AKT2*, *AtKC1*, *KAT1* and *KAT2* genes, encoding inward K^+ channel subunits (Hosy et al., 2003; Lebaudy et al., 2008a; Pandey et al., 2007; Pilot et al., 2001; Szyroki et al., 2001). Shaker channels result from the assembly of four subunits and it has been shown that inward subunits tend to heterotetramerize, thus potentially widening the functional and regulatory scope of inward K^+ conductances in guard cells (Jeanguenin et al., 2008; Lebaudy et al., 2008a; Lebaudy et al., 2010; Xicluna et al., 2007). This has grounded a strategy for disrupting inward K^+ channel conductances in guard cells by overexpressing a non-functional KAT2 subunit (dominant negative mutation) in a *kat2*- knocked-out Arabidopsis line. The resulting Arabidopsis lines, named "*kincless*", have no functional K_{in} channels and exhibit a delayed stomatal opening (Lebaudy et al., 2008b) with in the long term a biomass reduction compared to Arabidopsis wild-type line.

Among the CPKs presumably expressed in Arabidopsis guard cells (Leonhardt et al. 2004), we looked for CPK13, whose role remains unknown in stomatal movement and which, belongs to the atypical Ca^{2+}-insensitive type of CPKs (Boudsocq et al., 2012; Kanchiswamy et al., 2010; Liese and Romeis, 2013). Here, we show first that CPK13 kinase activity is also independent of pH and confirm CPK13 expression in Arabidopsis guard cells using CPK13-GUS lines. We observed that overexpression of CPK13 in *Arabidopsis* induces a significant biomass reduction and a dramatic default in stomatal aperture, which, interestingly, could not be counteracted by the fungal toxin Fusicoccin. Based on the previously reported *kincless* phenotype (Lebaudy *et al.*, 2008b), we hypothesized that CPK13 could target KAT2 in guard cells and reduce its channel activity. We confirmed this hypothesis by voltage-clamp experiments, which show an inhibition of KAT2 activity by CPK13. In addition, we demonstrated that KAT2 and CPK13 interact *in planta* using FRET-FLIM assay. Finally, *in vitro* peptide-array phosphorylation assays reveal that CPK13 targets, with some specificity, several KAT2 polypeptides.

RESULTS

CPK13 is expressed in guard cells. Based on transcriptomic data, it has been previously reported that CPK13 is expressed in guard cells (Leonhardt et al., 2004; Zhao et al., 2008). We therefore assessed the activity of the *CPK13* promoter using the *GUS* reporter gene and found it both in veins (Figure 1A) and guard cells (Figure 1B-C).

Kinase activity of CPK13 is independent of Ca^{2+} and pH. Coomassie blue staining of SDS-PAGE gel of purified GST-tagged recombinant CPK13 shows a single band at 85kDa, a size expected for 60kDa CPK13 fused with 25kDa GST (Figure 1D, left). Western-blot with an anti-GST antibody resulted in a staining of this 85kDa band (Figure 1D, right). Kinase activity of this GST-tagged CPK13 was evaluated using the synthetic peptide Syntide-2 as a target. The kinase activity was tested in different buffers containing either 10µM free Ca^{2+} or no Ca^{2+}, and with pH values ranging from 6.5 to 8.5. No significant change in kinase activity was observed in these different conditions. The CPK13 kinase activity is confirmed to be independent of Ca^{2+} and is also shown to be essentially independent of pH (in the 6.5 - 8.5 range) (Figure 1E).

Overexpression of CPK13 induces a biomass reduction. To determine the impact of CPK13 over-expression on stomatal regulation, transgenic lines overexpressing CPK13 were generated. Among the homozygous lines, two independent lines, denoted ox#3 and ox#4, were selected. Using quantitative RT-PCR, the overexpression level of CPK13 was quantified in both lines. Compared to wild-type (WT) plants, the CPK13 transcript level was increased by factors of 2 and 1.3 for ox#3 and ox#4, respectively (Figure 2A). To evaluate the long-term impact of CPK13 overexpression on plant phenotype, 10-day old plants were grown over a 20-day period in challenging day/night conditions (see methods). In the highest overexpression line ox#3, fresh weight (Figure 2B) was significantly reduced by 16.7% compared to the WT line. Representative pictures of plants after 30 days of culture are presented Figure 2C.

Overexpression of CPK13 strongly reduces light-induced stomatal opening. After a 12h-long night, the three lines displayed very similar stomatal aperture (zero time in Figure 3A,). Then, light-triggered stomatal opening was measured at 30, 60 and 180 minutes in epidermal peels of ox#3, ox#4 and WT lines. The ox#3 and the ox#4 lines showed a significant reduction in stomatal

aperture (Figure 3A). In particular, when WT stomatal pores widened by an average of 1.4 µm, ox#3 ones did only by an average of 0.7 µm, which makes a reduction by more than 50% of the opening movement in the mutant line compared to the WT. At time 180 minutes, under light, stomatal closure in the presence of 10µM ABA was tested. Not only ABA-induced closure was not affected in both mutant lines, but also stomatal aperture remained significantly reduced (under light and ABA) in these mutants compared to the WT. This additive effect of ABA and CPK13 suggested that this kinase acted through a pathway independent of the hormone (Figure 3A). The effect of 10µM of the fungal phytotoxin fusiccocin, a powerful activator of plasma membrane H^+-ATPase, by bypassing much of known regulatory pathways, was also tested on epidermal strips from WT and mutant plants. Over-expression of CPK13 in ox#3, ox#4 lines was efficient in counteracting the effect of the fungal toxin: even in the presence of the toxin over-expressors still show 20% of difference in stomatal aperture compared to WT (Figure 3B).

In summary over-expressing CPK13 induces a biomass reduction with a default of stomatal aperture, reminiscent of the previously reported phenotype of the *kincless* mutant line. This line, which is impaired in expression of functional inward K^+ channel subunit KAT2 (Lebaudy *et al.*, 2008b), displays little, if any, K^+ inward current in guard cells and shows a stomatal phenotype similar to ox#3, ox#4 lines.

CPK13 inhibits KAT2 inward currents in Xenopus oocytes. A standard voltage-clamp protocol was used to assess KAT2 channel activity when expressed alone or co-expressed with CPK13 in Xenopus oocytes: hyperpolarization of the membrane activated the inward-rectifying KAT2 currents (Figure 4A, middle). In the same conditions, co-expression with CPK13 dramatically reduced KAT2 currents (Figure 4A, bottom). Average current-voltage plots (Figure 4B) show that this effect is unlikely due to an impact of the kinase on channel voltage-dependent gating (no shift of the activation threshold) but rather to less channels being able to participate in the membrane conductance. This effect, in the 60% range (Figure 4C, left), was somehow specific for the KAT2-CPK13 pair as CPK4, a typical CPKs, was unable to significantly change KAT2 currents. This KAT2-CPK13 specificity is also reinforced by the fact that the current of another hyperpolarisation-activated K^+ channel, AKT2 (also expressed in guard cells), is essentially unchanged by co-expression with CPK13 (Figure 4C, right). As some other CPKs, CPK13 bears a myristoylation site (Glycine residue in position 2), which is responsible for

protein anchoring to the cell membrane (Benetka et al., 2008; Lu and Hrabak, 2013). The mutant G2A (with Glycine in position 2 substituted by Alanine), which cannot be myristoylated, was co-expressed with KAT2 in oocytes. This G2A mutant CPK13 was as efficacious as wild-type CPK13 in inhibiting KAT2, suggesting that anchoring to the cell membrane is not necessary for the kinase to target the channel (Figure 4C, left).

CPK13 and KAT2 co-localize and interact *in planta*. In order to determine if these two proteins interact *in vivo*, constructs allowing expression of CPK13 fused to YFP (CPK13-YFP) and of KAT2 fused to CFP (KAT2-CFP) were obtained. Sub-cellular co-localization of the two tagged proteins was observed in *Nicotiana benthamiana* leaf epidermal cells expressing transiently the two constructs: KAT2-CFP and CPK13-YFP co-localized to the plasma membrane (Figure 5A).

To provide evidence of interaction between these proteins *in vivo*, Förster Resonance Energy Transfer (FRET) experiments were then performed in *Nicotiana benthamiana* leaf epidermal cells. FRET was measured using a Fluorescence Life-time Imaging Microscopy (FLIM) approach which allowed measuring fluorescence-lifetime of CFP at the cell membrane in different conditions (Figure 5B): the life-time of CFP significantly decreased from 2.19 ± 0.05 ns, when KAT2-CFP was expressed alone, to 1.86 ± 0.04 ns, when KAT2-CFP and CPK13-YFP were co-expressed (Table 1). This decrease shows that FRET occurred between CFP and YFP when KAT2-CFP and CPK13-YFP were both present at the cell membrane, FRET efficiency around 14.9% (Table 1) and strongly supports the physical interaction between KAT2 and CPK13 proteins *in vivo*.

These results, which show that CPK13 regulates KAT2 activity in oocyte and that both proteins interact together *in planta*, suggest that CPK13 regulates KAT2 by phosphorylation.

CPK13 phosphorylates KAT2 *in vitro*. Phosphorylation by CPK13 of putative target sites in KAT2 (Serine and Threonine residues) was tested using peptide arrays featuring 384 peptides in duplicate, including 51 KAT2-derived and 59 AKT2-derived peptides. A representative autoradiography of one of these peptide arrays is shown after incubation with recombinant kinase (see Figure 1D) in the presence of [^{32}P]-ATP (Figure 6A) and Ca^{2+}. Stained spots represent phosphorylated peptides. Quantitative analysis of the staining was made using ImageJ (Supplemental figure S1). At least 11 KAT2 polypeptides were found to be phosphorylated by

recombinant CPK13, showing that KAT2 is actually a target of this kinase (these 11 polypeptides correspond to 20 Serine or Threonine residues indicated by white circles on the channel structure, Figure 6B); both the N-terminal and the C-terminal regions of KAT2 bear several of these targeted sites. In contrast, only 5 AKT2 peptides (corresponding to 7 Serine or Threonine residues, indicated by white triangles, Figure 6C) were phosphorylated by CPK13, in N-terminal part.

DISCUSSION AND CONCLUSION

The aim of this study was to identify a role in guard cells of CPK13, an atypical CPK whose kinase activity is independent of Ca^{2+} (Boudsocq et al., 2012). We show here that CPK13 kinase activity is also independent of pH (Figure 1E). Transcriptomic data revealed that ABA signal transduction has no effect on *CPK13* expression (Leonhardt et al., 2004) suggesting that CPK13 is not involved in ABA signaling in guard cells. Transgenic plants over-expressing CPK13 were used to study the role *in planta* of this kinase. Additive effects of ABA and CPK13 on stomatal closure (Figure 3A) suggest that this kinase acts through a pathway independent of the phytohormone. Interestingly, this impairment of stomatal opening was also observed in the presence of the fungal toxin fusicoccin, a powerful stoma opener, the action of which is rarely overcome. In contrast, these CPK13-overexpressing mutants show no default of ABA-triggered stomatal closure. Independent regulatory pathways for stomatal aperture and closure have been reported previously by Assman's group (Wang et al., 2001). They showed that inhibition of stomata opening by ABA is impaired in the knock-out mutant *gpa-1* whereas stomatal closure is still maintained with ABA. Our results obtained with the CPK13-overexpressing lines show that stomatal opening is altered but ABA is still able to promote stomata closure. Thus CPK13 acts in an ABA-independent manner through an inhibition of KAT2 channels. Changes of cytosolic pH are known to affect CPKs activities as shown for a typical CPK4 (Supplemental figure S2). Interestingly, pH-independent activity of CPK13 (Figure 1E) could explain that this kinase remains active in the presence of fusicoccin and therefore that fusicoccin-induced stomatal opening is decreased by CPK13 (Figure 3A). More generally, the control of stomatal aperture in response to cytosolic pH changes may be inhibited partially by CPK13.

Potential significance of KAT2 inhibition by CPK13 in oocytes is confirmed. On-chip phosphorylation assays show that CPK13 phosphorylates at least 11 oligo-peptides derived from KAT2 (Figure 6B, potentially concerned 20 Serine/Threonine residues), while it targets only 5 of those derived from AKT2 (Figure 6B), a CPK13-insensitive channel (Figure 4C). Inhibition of KAT2 would then result from phosphorylation of this channel subunit by CPK13, putatively in the large C-terminal cytoplasmic region.

Here, the characterization of CPK13 evidences this non-canonical CPK is a new negative regulator of stomatal aperture, through inhibition of KAT2 channel activity in Ca^{2+}-, pH- and ABA-independent pathway. Logically, different expression levels of CPK13 in the two over-expressing lines display different inhibition of stomatal opening: higher is the CPK13 expression, stronger is the stomatal opening inhibition and the plant fresh weight reduction. This result suggests that regulation of CPK13 could be at the transcriptional level, resulting in an appropriate response of the plant. ABA would not mediate this (Leonhardt et al., 2004) and data mining for likely candidates, using *Arabidopsis* eFP Browser (http://bar.utoronto.ca/), pinpointed two stresses amongst those tested for their impact on Arabidopis transcriptome: cold and oxidative stresses (Kilian et al., 2007), appeared to favor overexpression of *CPK13*. For both these stresses, the integrative plant response is known to involve stomata (Kim et al., 2013; McAinsh et al., 1996; Wilkinson et al., 2001), which, as suggested by the present data, could imply CPK13.

MATERIALS AND METHODS

Cloning of KAT2 and CPK13 using the Gateway® system. *KAT2* cDNA was amplified by PCR using *KAT2* FW primer GGAGATAGAACCatgtcaatctcttgtaccagaaactt and *KAT2* RV primer TCCACCTCCGGatccagagttttcattgatgagaatatacaa. The same method was used for *CPK13* cDNA with *CPK13* FW primer GGAGATAGAACCatgggaaactgttgcaga and *CPK13* RV primer TCCACCTCCGGctattcgttgcctaggtt. PCR fragments were introduced into the Gateway® entry vector *pDONR*™ (BP cloning, Invitrogen) by recombination. A LR Gateway® recombination was then performed using this *pDONR-CPK13* construct and either the expression vectors *pGEMGWC* to obtain cRNA transcripts for oocytes, *pGWB523* (Nakagawa et al., 2007) and *pGWB533* to obtain transgenic plants, *pDEST15* for recombinant protein production, or *pEarleyGate* (Earley et al., 2006) for sub-cellular localization and *in planta* interaction (FRET-FLIM) studies.

GUS assay. The promoter region of *CPK13* (2kb upstream start codon) has been cloned in the pGWB533 vector (Nakagawa et al., 2007) using primers (FW: GGAGATAGAACCTGGATGGGTTCACGAGGAATCACT and RV: TCCACCTCCGGATCCCACTGTGTGTAGCTCTGATGAG) (for promoter testing with the reporter gene encoding β-glucuronidase -GUS-) and introduced in *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101), to transform *A. thaliana* (Clough and Bent, 1998). To analyze GUS pattern, 4 week-old plant leaves were incubated for 45min in "pre-fix" solution (50mM $NaPO_4$, 1.5% formaldéhyde, 0.05% Triton X100 (pH 7)) and overnight at 37°C, in "GUS-fix" solution (50mM $NaPO_4$, 0.5mM ferricyanide, 0.5mM ferrocyanide, 0.05% Triton X100, 1mM X-Gluc, (pH 7)), then washed in successive baths of 50, 70, 90 and 100% ethanol. Observations were made using Camera-Color-View II (Olympus soft imaging system).

Production and purification of recombinant proteins. Rosetta® *E. coli* strains were transformed with pDEST15-*CPK13* plasmid that allows the production of recombinant CPK13 proteins upon induction by IPTG. Bacteria were grown in 200ml of *Löwenstein-Jensen* TB medium supplemented with Ampicillin (50µg/ml) and Chloramphenicol (30µg/ml). At 0.7-0.8 OD, protein production has been induced using 1mM IPTG. Recombinant CPK13 protein was then purified following the manufacturer's protocol (GE Healthcare).

***In vitro* kinase assays**. Kinase activities were monitored following the manufacturer's procedure (Promega, Kinase-Glo® Luminescent Kinase Assays). Briefly, recombinant CPK (500ng) was incubated with Syntide-2 (25µM) as substrate in presence of ATP (25µM) for 15 min at room temperature in kinase buffers (see *in vitro* phosphorylation method below) containing either 10µM free Ca^{2+} or no Ca^{2+}, and with pH values ranging from 6.5 to 8.5. Phosphorylation reaction was stopped by adding a volume of Kinase-Glo® reagent and luminescent signals correlated to the amount of ATP remaining in the solution were measured with a microplate reader Victor^2 (PerkinElmer life sciences).

Obtaining of transgenic plants overexpressing CPK13. The pGWB523-*CPK13* construct was introduced in *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101::pMP90), and then used to transform *A. thaliana* Col-0 ecotype by floral dip method (Clough and Bent, 1998). Transgenic plants overexpressing CPK13 were selected on hygromycin (50mg/ml) and checked by Q-PCR. Two

homozygous *CPK13* over-expressing lines (ox#3 and ox#4) of T3 plants were used in our experiments.

Foliar development analyses. Plantlets of WT, ox#3 and ox#4 lines were cultivated on MS/2 0.7% of agar in growth chamber at 22°C with a 70% relative humidity, in long-day conditions (150 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ light for 16h a day). Ten day-old plantlets were transferred into individual pots all filled with the same mass of water-saturated compost. Plantlets in their pots (21 of WT, 20 of ox#3 and 21 of ox#4) were then installed for 20 days in a growth chamber with challenging light conditions: 4 short periods of light (2h) (430$\mu E. m^{-2}.s^{-1}$) interrupted by 4 periods of darkness (4h). At day 30, a digital photo of each plant was taken for subsequent determination of total leaf area using Image J freeware (Schneider et al., 2012), then the fresh weight of the excised rosette was measured.

Stomatal aperture measurements. Epidermal strips were peeled from abaxial leaf face of 4 week-old plants as described in (Hosy et al., 2003), and incubated in 30mM KCl, 10mM MES-KOH, pH 6. For stomatal opening, epidermal strips were kept in darkness to ensure stomatal closure. These strips were then exposed to white light (300$\mu E.m^{-2}.s^{-1}$) and stomatal apertures were measured at T0, T+30, T+60 and T+180 minutes. At time T+180 min stomatal closures were induced with 10µM ABA and stomatal apertures were measured at T+200, T+240 and T+300 minutes. Stomatal pore widths on ≥35 stomata for each epidermal strip were measured with an optical microscope (Optiphot, Nikon) and a digitizing table (Houston Instrument). Data are expressed as means ± SE (n=6 plants by genotype). For fusicoccin treatment, epidermal strips were incubated in 30mM KCl, 10mM MES-KOH (pH 6) supplemented with 10µM fusicoccin. Stomatal apertures were measured at T+180 minutes. Data are expressed as means ± SE (n=4 plants by genotype).

Electrophysiological recordings in Xenopus oocytes. Oocyte preparation, injection, and measurements were performed as described in (Véry et al., 1995). *In vitro* transcriptions were performed using the mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra kit (Ambion). Xenopus oocytes were injected either with 20ng of *KAT2* cRNA alone or co-injected with 20ng of *KAT2* cRNA and 20ng of *CPK13* cRNA. Before recordings, oocytes were incubated for 48h at 20°C in a solution containing 96mM NaCl, 2mM KCl, 1.8mM $CaCl_2$, 2mM $MgCl_2$, 2.5mM Na-pyruvate, 5mM Hepes-NaOH (pH 7.5) and 50µg/ml of gentamycin. Whole-cell currents were recorded using

two-electrode voltage-clamp technique with oocytes bathed in 10mM KCl, 90mM NaCl, 1mM $MgCl_2$, 1mM $CaCl_2$, 10mM Hepes-NaOH (pH 7.5).Voltage steps of 3 sec to values ranging between +40 and −145 mV in −15 mV decrements were applied from a −40 mV holding potential.

Co-localization and interaction (FRET-FLIM) studies in plant tissues. *Nicotiana benthamania* leaves were transformed by agro-infiltration using *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101::pMP90) harboring different pEarleyGate recombinant plasmids (Earley et al., 2006): p101-*CPK13*, and p102-*KAT2* were used to yield expression of CPK13-YFP and KAT2-CFP, respectively. Coexpression of both CPK13-YFP and KAT2-CFP was obtained by co-infiltration with *A. tumefaciens* harboring p101-*CPK13* and p102-*KAT2*. Leaves of 4-5 week-old *N. benthamiana* plants were infiltrated by bacterial suspensions (OD_{600} = 0.5) in a buffer containing 10mM MES-KOH (pH 5.8), 10mM $MgCl_2$ and 200µM acetosyringone. Expression and localization of the proteins were checked two days after infiltration using a confocal microscope (LSM SP2 AOBS, Leica Microsystem, Germany) equipped with a 40X water immersion objective and an Argon ion laser for excitation at 458 and 514 nm. Emission range was set to 470-500 nm and 535-590 nm for CFP and YFP, respectively.

Fluorescence lifetime imaging microscopy was performed using a Streak-FLIM system (Streakscope C4334, Hamamatsu Photonics, Japan) coupled to a high sensitivity CCD camera (model C8800-53C, Hamamatsu). The light source (wavelength 439 nm) was a pulsed diode laser working at 2 MHz (Hamamatsu). All images were acquired with 60X oil immersion objective (Plan Apo 1.4 NA, IR) mounted on an inverted microscope (Eclipse TE2000E, Nikon, Japan) coupled to the FLIM system through a band-pass filter for CFP. Fluorescence-decay images were analyzed with homemade software to calculate fluorescence lifetimes by fitting fluorescence decay curves with a bi-exponential function using the Levenberg-Marquardt nonlinear least-square algorithm. For each condition at least 30 measurements were made. Comparisons between control (KAT2-CFP) and co-expressed assays (KAT2-CFP + CPK13-YFP) were performed with a Student's t-test. Results are expressed as mean $\pm$ SE of 5 independent biological experiments.

***In vitro* phosphorylation of peptide arrays.** From the primary sequence of different target polypeptides, including KAT2, AKT2 and six control target peptides (Synthide-2, Autocamtide-2, CSP, AtDil9, TPK1a and TPK1b (Latz et al., 2013; Rodriguez Milla et al., 2006; Shao and

Harmon, 2003), we designed peptide arrays bearing 15-18 amino-acid peptides. These peptides were synthesized and spotted (covalent link to a glass slide) by Proteomic Solutions (France). Whole sequences of KAT2 and AKT2 were covered respectively through 51 and 59 of the 384 peptides spotted in duplicate on each of these peptide arrays. *In vitro* phosphorylation of peptide arrays was performed by incubation with 5µg of recombinant CPK13 in 5ml of a kinase buffer (10mM $MgCl_2$, 2mM DTT, 4mM EGTA, 4.86mM $CaCl_2$, 50mM Hepes-NaOH (pH=7.4)). Phosphorylation reaction was started by adding 5µCi of [γ-^{32}P]-ATP and lasted 1h at 25°C upon slow agitation. Peptide arrays were then washed five times using 5ml of washing solution (150mM NaCl, 5mM EDTA and 0.05% Triton X100, 50mM Hepes-NaOH (pH 7.4)). Radiolabelling of phosphoryled peptides was revealed by autoradiography. Image analyses (quantification of phosphorylation) were done using Image J freeware (Schneider et al., 2012).

Supplemental data. The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure S1: Phosphorylation quantification from peptide arrays

Supplemental Figure S2: Biochemical assay of CPK4

ACKNOWLEDGEMENTS: We thank Drs. Benoît Lacombe and Gabriel Krouk for helpful discussions on this work. We thank Hugues Baudot for technical assistance. We gratefully acknowledge Prof. Tsuyoshi Nakagawa from Shimane University (Japan) for gift of pGWB vectors. We thank Dr. Isabel A. Lefevre for helpful comments on the manuscript.

LITERATURE CITED

Batistic, O., Waadt, R., Steinhorst, L., Held, K., and Kudla, J. (2010). CBL-mediated targeting of CIPKs facilitates the decoding of calcium signals emanating from distinct cellular stores. Plant J **61**:211-222.

Benetka, W., Mehlmer, N., Maurer-Stroh, S., Sammer, M., Koranda, M., Neumuller, R., Betschinger, J., Knoblich, J.A., Teige, M., and Eisenhaber, F. (2008). Experimental testing of predicted myristoylation targets involved in asymmetric cell division and calcium-dependent signalling. Cell Cycle **7**:3709-3719.

Blatt, M.R. (2000). Cellular signaling and volume control in stomatal movements in plants. Annu Rev Cell Dev Biol **16**:221-241.

Boudsocq, M., Droillard, M.J., Regad, L., and Lauriere, C. (2012). Characterization of Arabidopsis calcium-dependent protein kinases: activated or not by calcium? Biochem J **447**:291-299.

Cheng, S.H., Willmann, M.R., Chen, H.C., and Sheen, J. (2002). Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family. Plant Physiol **129**:469-485.

Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. Plant J **16**:735-743.

Earley, K.W., Haag, J.R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., and Pikaard, C.S. (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. Plant J **45**:616-629.

Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Marten, I., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Wellmann, C., Al-Rasheid, K.A., Grill, E., et al. (2010). Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca^{2+} affinities. Proc Natl Acad Sci U S A **107**:8023-8028.

Harmon, A.C., Gribskov, M., and Harper, J.F. (2000). CDPKs a kinase for every Ca^{2+} signal? Trends Plant Sci **5**:154-159.

Harper, J.F., Breton, G., and Harmon, A. (2004). Decoding Ca^{2+} signals through plant protein kinases. Annu Rev Plant Biol **55**:263-288.

Harper, J.F., Sussman, M.R., Schaller, G.E., Putnam-Evans, C., Charbonneau, H., and Harmon, A.C. (1991). A calcium-dependent protein kinase with a regulatory domain similar to calmodulin. Science **252**:951-954.

Hedrich, R. (2012). Ion channels in plants. Physiol Rev **92**:1777-1811.

Held, K., Pascaud, F., Eckert, C., Gajdanowicz, P., Hashimoto, K., Corratgé-Faillie, C., Offenborn, J.N., Lacombe, B., Dreyer, I., Thibaud, J.-B., et al. (2011). Calcium-dependent modulation and plasma membrane targeting of the AKT2 potassium channel by the CBL4/CIPK6 calcium sensor/protein kinase complex. Cell Res **21**:1116-1130.

Hetherington, A.M. (2001). Guard cell signaling. Cell **107**:711-714.

Hetherington, A.M., and Brownlee, C. (2004). The generation of Ca^{2+} signals in plants. Annu Rev Plant Biol **55**:401-427.

Hosy, E., Vavasseur, A., Mouline, K., Dreyer, I., Gaymard, F., Porée, F., Boucherez, J., Lebaudy, A., Bouchez, D., Véry, A.-A., et al. (2003). The Arabidopsis outward K^+ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. Proc Natl Acad Sci U S A **100**:5549-5554.

Hubbard, K.E., Siegel, R.S., Valerio, G., Brandt, B., and Schroeder, J.I. (2012). Abscisic acid and CO_2 signalling via calcium sensitivity priming in guard cells, new CDPK mutant phenotypes and a method for improved resolution of stomatal stimulus-response analyses. Ann Bot **109**:5-17.

Jeanguenin, L., Lebaudy, A., Xicluna, J., Alcon, C., Hosy, E., Duby, G., Michard, E., Lacombe, B., Dreyer, I., and Thibaud, J.-B. (2008). Heteromerization of Arabidopsis Kv channel alpha-subunits: Data and prospects. Plant Signal Behav **3**:622-625.

Kanchiswamy, C.N., Takahashi, H., Quadro, S., Maffei, M.E., Bossi, S., Bertea, C., Zebelo, S.A., Muroi, A., Ishihama, N., Yoshioka, H., et al. (2010). Regulation of Arabidopsis defense responses against Spodoptera littoralis by CPK-mediated calcium signaling. BMC Plant Biol **10**:97.

Kilian, J., Whitehead, D., Horak, J., Wanke, D., Weinl, S., Batistic, O., D'Angelo, C., Bornberg-Bauer, E., Kudla, J., and Harter, K. (2007). The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. Plant J **50**:347-363.

Kim, H.S., Oh, J.M., Luan, S., Carlson, J.E., and Ahn, S.J. (2013). Cold stress causes rapid but differential changes in properties of plasma membrane H^+-ATPase of camelina and rapeseed. J Plant Physiol **170**:828-837.

Laanemets, K., Brandt, B., Li, J., Merilo, E., Wang, Y.F., Keshwani, M.M., Taylor, S.S., Kollist, H., and Schroeder, J.I. (2013). Calcium-Dependent and -Independent Stomatal Signaling Network

and Compensatory Feedback Control of Stomatal Opening via Ca^{2+} Sensitivity Priming. Plant Physiol.

Lan, W.Z., Lee, S.C., Che, Y.F., Jiang, Y.Q., and Luan, S. (2011). Mechanistic analysis of AKT1 regulation by the CBL-CIPK-PP2CA interactions. Mol Plant **4**:527-536.

Latz, A., Mehlmer, N., Zapf, S., Mueller, T.D., Wurzinger, B., Pfister, B., Csaszar, E., Hedrich, R., Teige, M., and Becker, D. (2013). Salt Stress Triggers Phosphorylation of the Arabidopsis Vacuolar K^+ Channel TPK1 by Calcium-Dependent Protein Kinases (CDPKs). Mol Plant.

Lebaudy, A., Hosy, E., Simonneau, T., Sentenac, H., Thibaud, J.B., and Dreyer, I. (2008a). Heteromeric K+ channels in plants. Plant J **54**:1076-1082.

Lebaudy, A., Pascaud, F., Véry, A.-A., Alcon, C., Dreyer, I., Thibaud, J.-B., and Lacombe, B. (2010). Preferential KAT1-KAT2 heteromerization determines inward K^+ current properties in Arabidopsis guard cells. J Biol Chem **285**:6265-6274.

Lebaudy, A., Vavasseur, A., Hosy, E., Dreyer, I., Leonhardt, N., Thibaud, J.-B., Véry, A.-A., Simonneau, T., and Sentenac, H. (2008b). Plant adaptation to fluctuating environment and biomass production are strongly dependent on guard cell potassium channels. Proc Natl Acad Sci U S A **105**:5271-5276.

Lebaudy, A., Véry, A.-A., and Sentenac, H. (2007). K^+ channel activity in plants: genes, regulations and functions. FEBS Lett **581**:2357-2366.

Leonhardt, N., Kwak, J.M., Robert, N., Waner, D., Leonhardt, G., and Schroeder, J.I. (2004). Microarray expression analyses of Arabidopsis guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. Plant Cell **16**:596-615.

Liese, A., and Romeis, T. (2013). Biochemical regulation of in vivo function of plant calcium-dependent protein kinases (CDPK). Biochim Biophys Acta **1833**:1582-1589.

Lu, S.X., and Hrabak, E.M. (2013). The myristoylated amino-terminus of an Arabidopsis calcium-dependent protein kinase mediates plasma membrane localization. Plant Mol Biol **82**:267-278.

Luan, S. (2009). The CBL-CIPK network in plant calcium signaling. Trends Plant Sci **14**:37-42.

Luan, S., Li, W., Rusnak, F., Assmann, S.M., and Schreiber, S.L. (1993). Immunosuppressants implicate protein phosphatase regulation of K^+ channels in guard cells. Proc Natl Acad Sci U S A **90**:2202-2206.

McAinsh, M.R., Clayton, H., Mansfield, T.A., and Hetherington, A.M. (1996). Changes in Stomatal Behavior and Guard Cell Cytosolic Free Calcium in Response to Oxidative Stress. Plant Physiol **111**:1031-1042.

Mori, I.C., Murata, Y., Yang, Y., Munemasa, S., Wang, Y.F., Andreoli, S., Tiriac, H., Alonso, J.M., Harper, J.F., Ecker, J.R., et al. (2006). CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca^{2+}-permeable channels and stomatal closure. PLoS Biol **4**:e327.

Munemasa, S., Hossain, M.A., Nakamura, Y., Mori, I.C., and Murata, Y. (2011). The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase, CPK6, functions as a positive regulator of methyl jasmonate signaling in guard cells. Plant Physiol **155**:553-561.

Nakagawa, T., Suzuki, T., Murata, S., Nakamura, S., Hino, T., Maeo, K., Tabata, R., Kawai, T., Tanaka, K., Niwa, Y., et al. (2007). Improved Gateway binary vectors: high-performance vectors for creation of fusion constructs in transgenic analysis of plants. Biosci Biotechnol Biochem **71**:2095-2100.

Nilson, S.E., and Assmann, S.M. (2007). The control of transpiration. Insights from Arabidopsis. Plant Physiol **143**:19-27.

Pandey, S., Zhang, W., and Assmann, S.M. (2007). Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction. FEBS Lett **581**:2325-2336.

Pei, Z.M., Baizabal-Aguirre, V.M., Allen, G.J.,Schroeder, J.I. (1998) A transient outward-rectifying K+ channel current down-regulated by cytosolic Ca^{2+} in Arabidopsis thaliana guard cells. Proc Natl Acad Sci U S A **95**:6548-6553.

Pilot, G., Lacombe, B., Gaymard, F., Chérel, I., Boucherez, J., Thibaud, J.-B., and Sentenac, H. (2001). Guard cell inward K^+ channel activity in arabidopsis involves expression of the twin channel subunits KAT1 and KAT2. J Biol Chem **276**:3215-3221.

Rodriguez Milla, M.A., Uno, Y., Chang, I.F., Townsend, J., Maher, E.A., Quilici, D., and Cushman, J.C. (2006). A novel yeast two-hybrid approach to identify CDPK substrates: characterization of the interaction between AtCPK11 and AtDi19, a nuclear zinc finger protein. FEBS Lett **580**:904-911.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Methods **9**:671-675.

Schroeder, J.I., Allen, G.J., Hugouvieux, V., Kwak, J.M., and Waner, D. (2001). Guard Cell Signal Transduction. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **52**:627-658.

Shao, J., and Harmon, A.C. (2003). In vivo phosphorylation of a recombinant peptide substrate of CDPK suggests involvement of CDPK in plant stress responses. Plant Mol Biol 53:691-700.

Szyroki, A., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M.R., Ache, P., Reintanz, B., Deeken, R., Godde, M., Felle, H., Steinmeyer, R., et al. (2001). KAT1 is not essential for stomatal opening. Proc Natl Acad Sci U S A 98:2917-2921.

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

Véry, A.-A., and Sentenac, H. (2002). Cation channels in the Arabidopsis plasma membrane. Trends Plant Sci 7:168-175.

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

Wang, X.Q., Ullah, H., Jones, A.M., and Assmann, S.M. (2001). G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in Arabidopsis guard cells. Science **292**:2070-2072.

Weinl, S., and Kudla, J. (2009). The CBL-CIPK Ca^{2+}-decoding signaling network: function and perspectives. New Phytol **184**:517-528.

Wilkinson, S., Clephan, A.L., and Davies, W.J. (2001). Rapid low temperature-induced stomatal closure occurs in cold-tolerant Commelina communis leaves but not in cold-sensitive tobacco leaves, via a mechanism that involves apoplastic calcium but not abscisic acid. Plant Physiol **126**:1566-1578.

Xicluna, J., Lacombe, B., Dreyer, I., Alcon, C., Jeanguenin, L., Sentenac, H., Thibaud, J.-B., and Chérel, I. (2007). Increased functional diversity of plant K^+ channels by preferential heteromerization of the shaker-like subunits AKT2 and KAT2. J Biol Chem **282**:486-494.

Xu, J., Li, H.D., Chen, L.Q., Wang, Y., Liu, L.L., He, L., and Wu, W.H. (2006). A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K^+ transporter AKT1 in Arabidopsis. Cell **125**:1347-1360.

Zhao, Z., Zhang, W., Stanley, B.A., and Assmann, S.M. (2008). Functional proteomics of Arabidopsis thaliana guard cells uncovers new stomatal signaling pathways. Plant Cell **20**:3210-3226.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Expression pattern and biochemical assay of CPK13. (A-C) Spatial expression pattern of CPK13 in *Arabidopsis thaliana* lines with *GUS* reporting of *CPK13* promoter activity in leaf tissues. (A) Large view of part of a leaf showing staining in the central vein and secondary ones (scale bar = 200µm). (B-C) Enlarged views of leaves of the same transgenic plant line showing

staining in guard cells (scale bar = 20µm). (D) Coomassie blue staining of a SDS-PAGE gel (left) and autoradiography of a western blot (right) showing a single 85kDa band corresponding to CPK13-GST protein purified from a Rosetta *E. coli* strain (see methods). (E) *In vitro* assay of recombinant CPK13 kinase activity on a Synthide-2 target peptide. Data are kinase activity (arbitrary units) obtained in the presence (black bars) or not (white bars) of 10µM Ca^{2+}, at buffer pH values ranging from 6.5 to 8.5 (means ± SE, n=3).

Figure 2: Phenotype of CPK13 overexpressing plants. (A) Expression level of the CPK13 gene (normalized to the Tubulin-4 housekeeping gene) in wild-type plants (WT) and two independent CPK13 overexpressing lines (ox#4 and ox#3). Data (mean ± SE, n=45) result from quantitative real-time PCR performed on cDNA extracts from 15 day-old seedlings. (B) Ten day-old WT (n=21), ox#3 (n=20) and ox#4 (n=21) plants grown in standard short-day conditions were transferred for 20 days in challenging day/night conditions (see methods) and thereafter compared for their fresh weight. (C) View of representative individual plants from the same experiment (scale bar = 1cm). * for $p \leq 0.05$, ** for $p \leq 0.01$ and *** for $p \leq 0.001$ with Student's t-test.

Figure 3: Epidermal strips peeled from WT and CPK13 overexpressing plants. (A) Light-triggered stomatal opening assayed on the same genotypes as in *A* (WT, ox#3 and ox#4). Light was switched on at time 0 and average stomatal aperture (≥35 stomata per epidermal strip) were measured at times 0, 30, 60 and 180 min. Stomatal closure was triggered by adding the plant stress hormone ABA (10µM). Data are means ± SE (n=6) plants by genotype. (B) Stomatal opening was induced by Switching light on in buffer with 10µM fusicoccin. Data are means (at 180 minutes) ± SE (n=4 plants by genotype), * for $p \leq 0.05$, ** for $p \leq 0.01$ and *** for $p \leq 0.001$ with Student's t-test.

Figure 4: Inhibition of KAT2 channels by CPK13 in Xenopus oocytes. (A) Representative current recordings obtained in non-injected oocytes (Control, *top*), in oocytes injected with *KAT2* cRNA (KAT2, *middle*) or with *KAT2*+*CPK13* cRNAs (KAT2+CPK13, *bottom*) using two-electrode voltage-clamp (TEVC). In all recordings, 3-sec voltage steps to values ranging between +40 and -145 mV in -15 mV decrements were applied from a –40 mV holding potential. (B) Average current–voltage relationships from recordings obtained in the same conditions as in *A*. Data are mean ± SE for non-injected oocytes (black squares, n=12) and oocytes injected either

with *KAT2* (black circles, n=19) or *KAT2+CPK13* cRNAs (open circles, n=13). (C) Comparative effects of CPK13, G2A (non myristoylated mutant CPK13, see text) and CPK4 on KAT2 and of CPK13 on AKT2 (same conditions as in *A*). The bar chart on the left represents percentage of current recorded at -145 mV for oocytes expressing KAT2 alone (black, n=19), KAT2+CPK13 (white, n=13), KAT2+CPK4 (hatched, n=8) and KAT2+G2A (grey, n=18). The bar chart on the right represents percentage of current recorded at -140 mV for oocytes expressing AKT2 only (black, n=10), AKT2+CPK13 (white, n=8),*** for p≤0.001 with Student's t-test.

Figure 5: Co-localization and interaction of KAT2 and CPK13 in plant cells. (A) Confocal fluorescence microscopy of tobacco epidermal leaf cells co-expressing KAT2-CFP and CPK13-YFP, (scale bar = 20µm). (B) Fluorescence life-time imaging microscopy of CFP in tobacco leaf cells expressing KAT2-CFP only (blue dash curve) or co-expressing KAT2-CFP and CPK13-YFP (dark yellow curve).

Figure 6: Phosphorylation *in vitro* on peptide arrays. (A) Representative autoradiography of peptide array after phosphorylation with recombinant CPK13. (B) Cartoon of a Shaker channel subunit secondary structure with positions of the phosphorylated sites (triangles indicate KAT2 sites, circles indicate AKT2 sites) from on-chip assay of CPK13 kinase activity. Ext/cyt and mb stand for extracellular/cytoplasmic side and membrane; S1-6, P, CNBD, Anky, KHA stand respectively for transmembrane segment 1 to 6, pore domain, putative cyclic nucleotide-binding domain, ankyrin domain (present only in AKT2 and not in KAT2) and domain rich in hydrophobic and acidic residues.

Table 1: FLIM values of KAT2-CFP. CFP fluorescent life-time values in *N. benthamiana* that were transfected with pEARLEYGATE_101-CPK13 and pEARLEYGATE_101-KAT2. Fluorescence life-time measurements are in nanoseconds (ns); n represents the total number of measures from five independent experiments.

Supplemental figure S1: Phosphorylation quantification from peptide arrays. (A) Phosphorylation signals are quantified for KAT2 peptides and are represented from N-terminal to C-terminal in the bar graph (B) Phosphorylation signals are quantified for AKT2 peptides and are represented from N-terminal to C-terminal in the bar graph. Quantification of each part of the duplicate area of the peptide arrays (left and right parts), are represented by blue and red bars

respectively. Quantifications were made with ImageJ software and expressed in arbitrary unit (A.U). False signals were represented with hatched bars.

Supplemental figure S2: Biochemical assay of CPK4. (A) *In vitro* assay of recombinant CPK4 kinase activity on a Synthide-2 target peptide obtained in the presence of 10µM Ca^{2+} with buffer pH values ranging from 6.5 to 8.5. (B) *In vitro* assay of recombinant CPK4 kinase activity on a Synthide-2 target peptide performed in the absence (black bars) or in the presence (grey bars) of 10µM free Ca^{2+}. Data are kinase activity (arbitrary units) given as means ± SE, n=3. * for $p \leq 0.05$, ** for $p \leq 0.01$ and *** for $p \leq 0.001$ with Student's t-test.

Figure 1

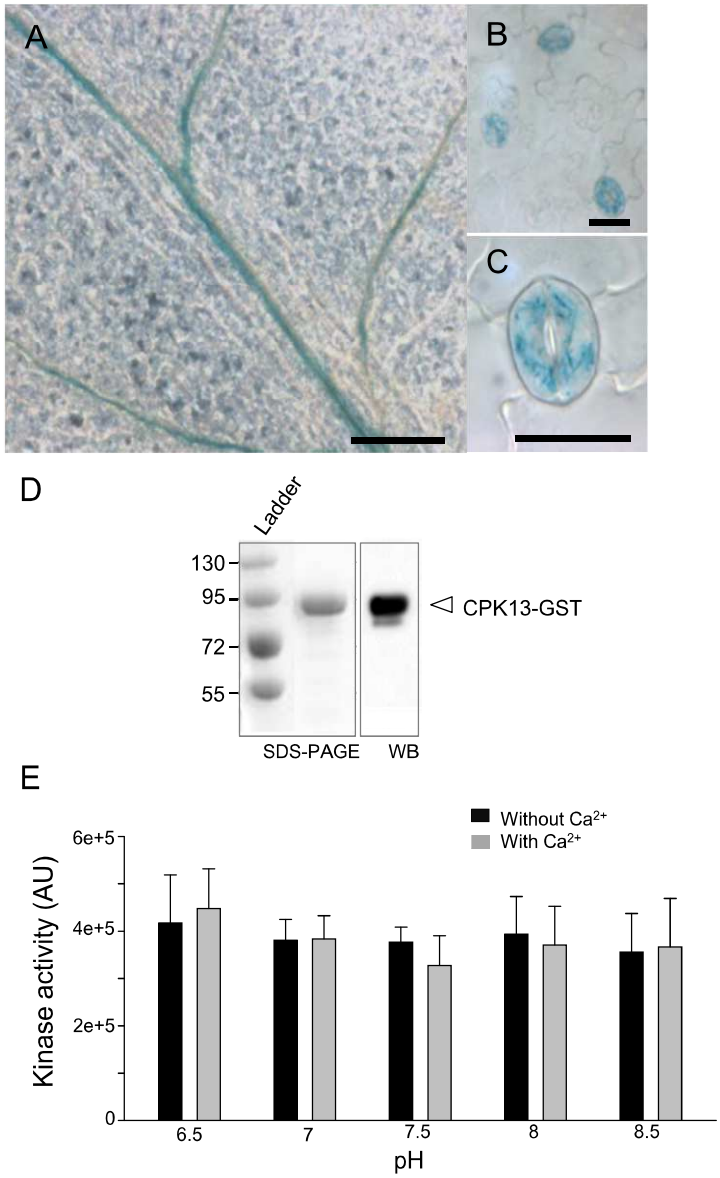


Figure 1: Expression pattern and biochemical assay of CPK13. (A-C) Spatial expression pattern of CPK13 in Arabidopsis thaliana lines with GUS reporting of CPK13 promoter activity in leaf tissues. (A) Large view of part of a leaf showing staining in the central vein and secondary ones (scale bar = 200µm). (B-C) Enlarged views of leaves of the same transgenic plant line showing staining in guard cells (scale bar = 20µm). (D) Coomassie blue staining of a SDS-PAGE gel (left) and autoradiography of a western blot (right) showing a single 85kDa band corresponding to CPK13-GST protein purified from a Rosetta E. coli strain (see methods). (E) In vitro assay of recombinant CPK13 kinase activity on a Synthide-2 target peptide. Data are kinase activity (arbitrary units) obtained in the presence (black bars) or not (white bars) of 10µM Ca^{2+}, at buffer pH values ranging from 6.5 to 8.5 (means ± SE, n=3).

Figure 2

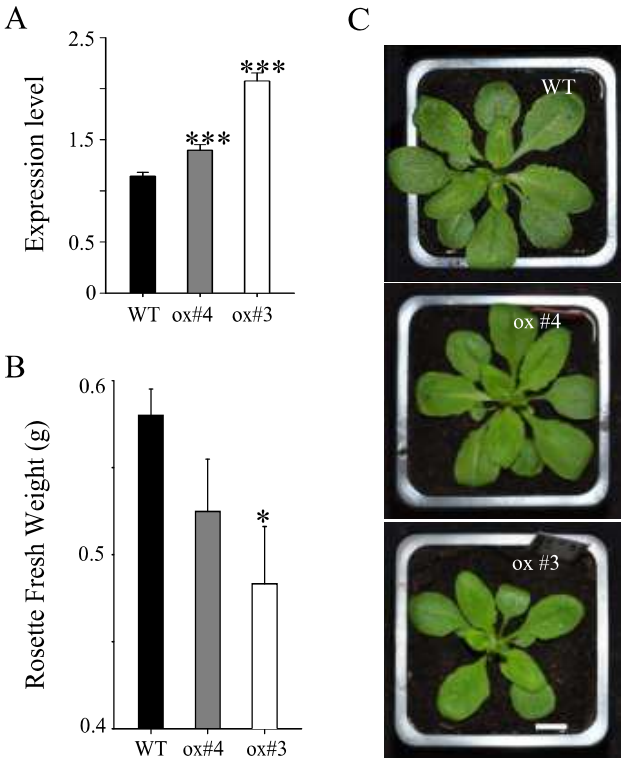


Figure 2: Phenotype of CPK13 overexpressing plants. (A) Expression level of the CPK13 gene (normalized to the Tubulin-4 housekeeping gene) in wild-type plants (WT) and two independent CPK13 overexpressing lines (ox#4 and ox#3). Data (mean ± SEM, n=45) result from quantitative real-time PCR performed on cDNA extracts from 15 day-old seedlings. (B) Ten day-old WT (n=21), ox#3 (n=20) and ox#4 (n=21) plants grown in standard short-day conditions were transferred for 20 days in challenging day/night conditions (see methods) and thereafter compared for their fresh weight. (C) View of representative individual plants from the same experiment (scale bar = 1cm). * for $p \leq 0.05$, ** for $p \leq 0.01$ and *** for $p \leq 0.001$ with Student's t-test.

Figure 3

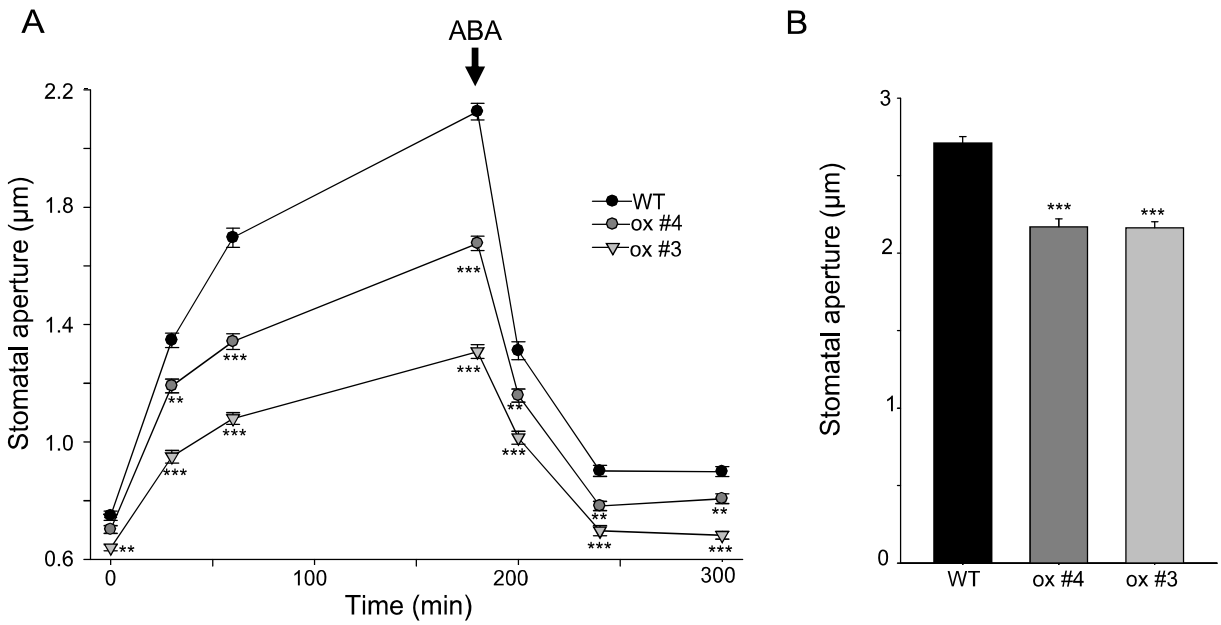


Figure 3: Epidermal strips peeled from WT and CPK13 overexpressing plants. (A) Light-triggered stomatal opening assayed on the same genotypes as in A (WT, ox#3 and ox#4). Light was switched on at time 0 and average stomatal aperture (≤35 stomata per epidermal strip) were measured at times 0, 30, 60 and 180 min. Stomatal closure was triggered by adding the plant stress hormone ABA (10µM). Data are means ± SE (n=6) plants by genotype. (B) Stomatal opening was induced by Switching light on in buffer with 10µM fusicoccin. Data are means (at 180 minutes) ± SE (n=4 plants by genotype), * for p≤0.05, ** for p≤0.01 and *** for p≤0.001 with Student's t-test.

Figure 4

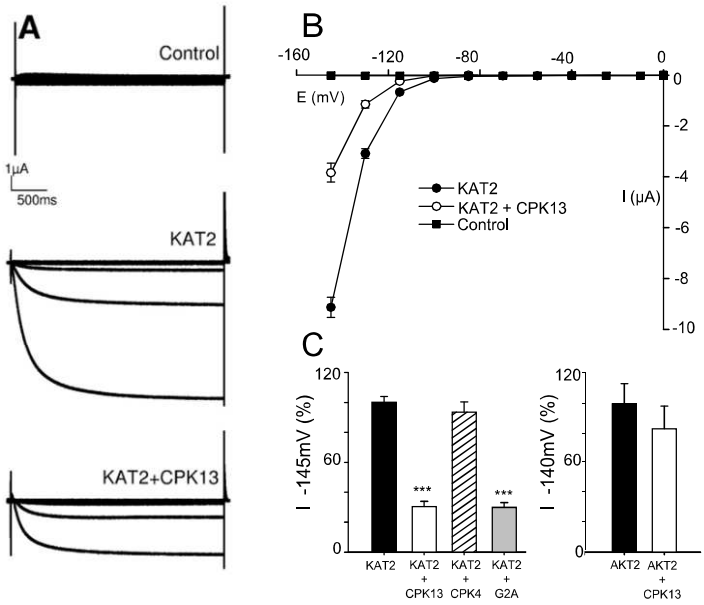


Figure 4: Inhibition of KAT2 channels by CPK13 in Xenopus oocytes. (A) Representative current recordings obtained in non-injected oocytes (Control, top), in oocytes injected with KAT2 cRNA (KAT2, middle) or with KAT2+CPK13 cRNAs (KAT2+CPK13, bottom) using two-electrode voltage-clamp (TEVC). In all recordings, 3-sec voltage steps to values ranging between +40 and -145 mV in -15 mV decrements were applied from a −40 mV holding potential. (B) Average current–voltage relationships from recordings obtained in the same conditions as in A. Data are mean ± SEM for non-injected oocytes (black squares, n=12) and oocytes injected either with KAT2 (black circles, n=19) or KAT2+CPK13 cRNAs (open circles, n=13). (C) Comparative effects of CPK13, G2A (mutant CPK13, see text) and CPK4 on KAT2 and of CPK13 on AKT2 (same conditions as in A). The bar-chart on the left represents percentage of current recorded at -145mV for oocytes expressing KAT2 alone (black, n=19), KAT2+CPK13 (white, n=13), KAT2+CPK4 (hatched, n=8), and KAT2+G2A (grey, n=18). The bar-chart on the right represents percentage of current recorded at -140mV for oocytes expressing AKT2 only (black, n=10), AKT2+ CPK13 (white, n=8). *** for p≤0.001 with Student's t-test.

Figure 5

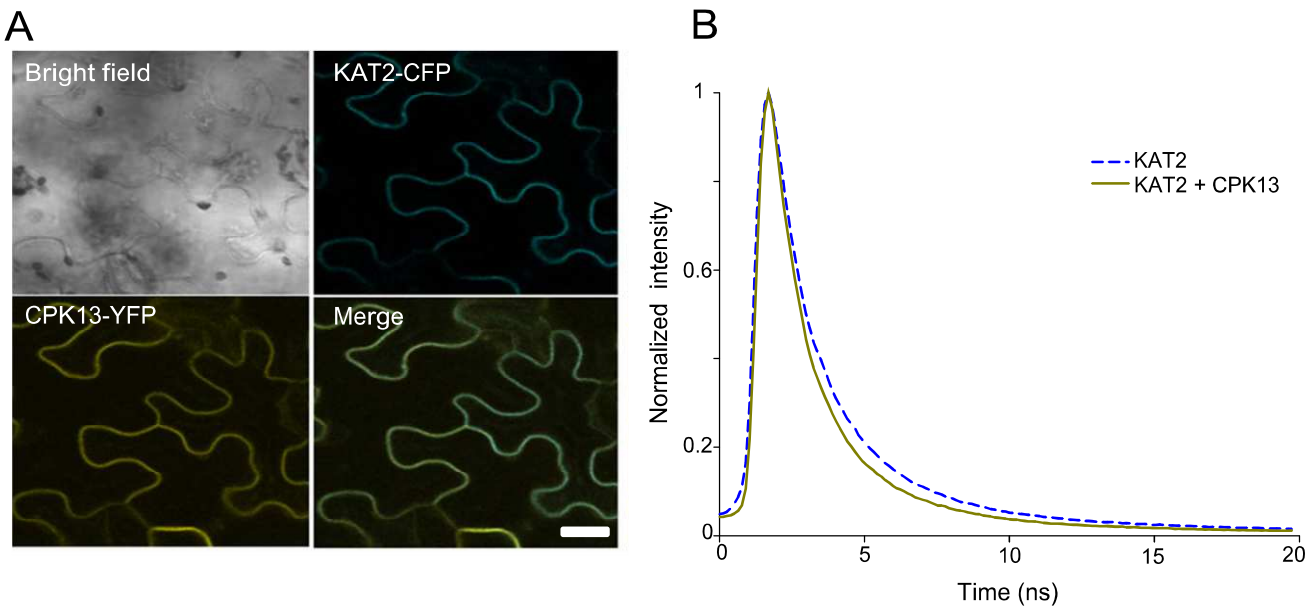


Figure 5: Co-localization and interaction of KAT2 and CPK13 in plant cells. (A) Confocal fluorescence microscopy of tobacco epidermal leave cells co-expressing KAT2-CFP and CPK13-YFP, (scale bar = 20µm). (B) Fluorescence life-time imaging microscopy of CFP in tobacco leaf cells expressing KAT2-CFP only (blue dash curve) or co-expressing KAT2-CFP and CPK13-YFP (dark yellow curve).

Figure 6

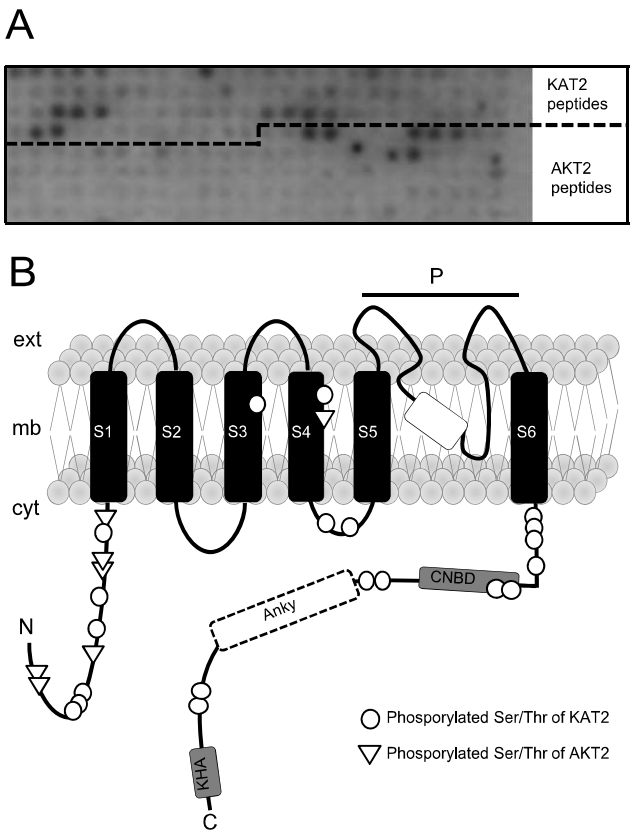


Figure 6: Phosphorylation in vitro on peptide arrays. (A) Autoradiography of peptide array after phosphorylation with recombinant CPK13. (B) Cartoon of a Shaker channel subunit secondary structure with positions of the phosphorylated sites (triangles indicate KAT2 sites, circles indicate AKT2 sites) from on-chip assay of CPK13 kinase activity. Ext/cyt and mb stand for extracellular/cytoplasmic side and membrane; S1-6, P, CNBD, Anky, KHA stand respectively for transmembrane segment 1 to 6, pore domain, putative cyclic nucleotide-binding domain, ankyrin domain (present only in AKT2 and not in KAT2) and domain rich in hydrophobic and acidic residues.

Table 1

	Fluorescence lifetime (ns)	Change in CFP fluorescence lifetime (%)	n
KAT2-CFP	2,19 ± 0.05	---	115
KAT2-CFP + CPK13-YFP	1,86 ± 0.04	- 14,9	146

Table 1 : FLIM values of KAT2-CFP. CFP fluorescent lifetime values in N. benthamiana that were transfected with pEARLEYGATE_101-CPK13 and pEARLEYGATE_101-KAT2. Fluorescence lifetime measurements are in nanoseconds (ns) and n represents the total number of measures from five independent experiments.

Régulation post-traductionnelle des canaux potassiques par les CPKs (Protéines Kinases Dépendantes du Calcium) chez Arabidopsis thaliana : un rôle dans la réponse adaptative aux stress environnementaux?

Les canaux potassiques de la famille Shaker sont des voies majeures du transport de K^+ à travers la membrane plasmique. Ces canaux sont impliqués dans l'absorption du potassium depuis le sol et dans sa redistribution dans les parties aériennes de la plante. Ils sont également impliqués dans les mouvements stomatiques et sont pour cela finement régulés. Ils peuvent subir des modifications post-traductionnelles telle que la phosphorylation par des protéines kinases. L'objectif principal de ce travail de thèse s'inscrit dans ce contexte et a pour but d'évaluer l'implication des CPKs dans la régulation post-traductionnelle des canaux Shaker. Les mécanismes d'action de deux CPKs (CPK13 et CPK6) sur la sous-unité entrante KAT2 sont plus spécifiquement étudiés. La première partie du travail de thèse avait pour but de mettre en place le matériel nécessaire pour l'étude en réalisant les clonages, la production des protéines recombinantes et leur caractérisation et testant les premiers effets des CPKs sur l'activité des canaux en expression hétérologue. La seconde partie concerne l'étude du rôle de CPK13 dans la régulation stomatique via la sous-unité KAT2. Nous montrons que la sur-expression de CPK13 dans les lignées transgéniques induit, à court terme, un défaut dans l'ouverture stomatique et également, à long terme, un défaut dans la croissance de la plante. L'existence d'une interaction physique à la membrane plasmique entre CPK13 et KAT2 est montrée à l'aide de la technique de FRET-FLIM. et la phosphorylation de la sous-unité KAT2 par la protéine recombinante CPK13 est montrée in vitro à l'aide de puces à peptides. Enfin, il est montré par voltage-clamp en ovocyte de xénope que CPK13 inhibe l'activité de KAT2 de plus de 60%. Dans la dernière partie, nous présentons un ensemble de résultats qui suggèrent un rôle de CPK6 dans la tolérance au stress salin via son action sur KAT2. Il est en effet connu qu'en cas de stress salin, l'activité des canaux responsables de l'influx de potassium est stimulée, ce qui contribue au maintien d'un faible ratio Na^+/K^+ dans les cellules. Or, nous montrons un effet activateur de la CPK6 sur l'activité de KAT2, à l'aide de la technique de voltage-clamp. Nous montrons que l'expression du gène CPK6 est très augmentée en réponse à un stress salin et que ceci est concomitant avec le déclenchement d'une vague calcique en réponse à ce même stress. L'utilisation de lignées GUS a permis de vérifier que les patrons d'expression des gènes CPK6 et KAT2 sont identiques chez Arabidopsis thaliana. Enfin, nous montrons une interaction physique entre le canal KAT2 et la protéine CPK6 (FRET-FLIM) et la phosphorylation de KAT2 par CPK6 (puces à peptides).

Mots clefs : Arabidopsis thaliana, adaptation aux stress, canaux Shaker, CPKs, signalisation calcique, modification post-traductionnelle.

Post-translational regulation of potassium channels by CPKs (Calcium-dependent Protein Kinases) in Arabidopsis thaliana: a role in adaptive response to environmental stresses?

Potassium Shaker channels are major pathways for K^+ across plant cell plasma membrane. These channels are implicated in K^+ absorption from soil and in its redistribution throughout the plant. They are more particularly implicated in stomatal movement and therefore are finely regulated. They can especially undergo post-translational modifications such as phosphorylation by protein kinases. The aim of this work is to determine the implication of CPKs (Ca^{2+}-dependent Protein Kinases) in Shaker channel post-translational regulation. CPK13 and CPK6 molecular mechanisms of action on Shaker sub-unit KAT2 activity are specifically studied here. First part of this work consisted in cloning, producing and characterizing recombinant proteins and broad screening of CPK effects on Shaker channel activity, using heterologous expression. Second part focuses on the role of CPK13 in stomatal regulation through its effect on KAT2 activity. Over-expression of CPK13 in plant is shown to induce a defect of stomatal aperture and plant growth. KAT2 and CPK13 interaction at the plasma membrane is evidenced by using FRET-FLIM technique. KAT2 phosphorylation by CPK13 is checked on peptide arrays. Finally, a 60% decrease of KAT2 activity by CPK13 is shown using voltage-clamp on xenopus oocyte. Third and last part of this work suggests a role of CPK6 in salt stress resistance through KAT2 channel regulation. Inward potassium channels are indeed known to be activated upon salt stress to contribute keeping a low Na^+/K^+ ratio. Now, voltage-clamp technique demonstrates that KAT2 activity is increased by CPK6 and salt stress is shown to both increase CPK6 expression and elicit a calcium wave. Using GUS lines evidences KAT2 and CPK6 co-expression in Arabidopsis thaliana (in phloem and guard cells). Physical interaction between these two partners is shown by FRET-FLIM, and KAT2 phosphorylation by CPK13 gets strong support from peptide array assays.

Key words: Arabidopsis thaliana, adaptation to stress, Shaker channels, CPKs, calcium signaling, post-translational modification