



HAL
open science

Identification et caractérisation d'un canal chlorure, AtCLCg, impliqué dans la réponse au stress salin chez *Arabidopsis thaliana*

Chi Tam Nguyen

► **To cite this version:**

Chi Tam Nguyen. Identification et caractérisation d'un canal chlorure, AtCLCg, impliqué dans la réponse au stress salin chez *Arabidopsis thaliana*. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA112231 . tel-00856592

HAL Id: tel-00856592

<https://theses.hal.science/tel-00856592>

Submitted on 2 Sep 2013

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

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



UNIVERSITE PARIS-SUD – UFR des Sciences

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DU VEGETAL

Discipline : Sciences du végétal

Thèse

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ PARIS SUD

Par

Chi Tam NGUYEN

Identification et caractérisation d'un canal chlorure, AtCLCg, impliqué dans la réponse au stress salin chez *Arabidopsis thaliana*

Soutenance le **19/10/2012**, devant le jury d'examen :

Hoang Ha CHU	Pr., Institut des Biotechnologies de Hanoï	Examineur
Michel DRON	Pr., Université Paris Sud	Examineur
Sophie FILLEUR	Dr., Institut des Sciences du Végétal	Directrice de thèse
Pascal GANTET	Pr., Université Montpellier 2	Examineur
Nathalie LEONHARDT	Dr., CEA Cadarache	Rapporteur
Anne-Aliénor VERY	Dr., CNRS Montpellier	Rapporteur

Remerciements

En tout premier, je souhaiterais adresser mes remerciements les plus sincères aux membres du jury, Dr. Anne-Aliénor Véry, Dr. Nathalie Leonhardt, Prof. Pascal Gantet, Prof. Michel Dron et Prof. Hoang Ha Chu qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail de thèse.

Je tiens à remercier profondément les membres de mon comité de thèse, Dr. Anne Krapp, Dr. Sébastien Thomine et Dr. Martin Crespi qui m'ont offert des conseils précieux pour ma thèse.

Je voudrais remercier vivement toutes les personnes qui m'ont apporté leurs aides et qui ont contribué au bon déroulement de cette thèse, aussi bien sur le plan scientifique que humain.

Je voudrais dire un très grand merci à ma directrice de thèse Dr. Sophie Filleur de m'avoir encadré et soutenu tout au long de ces années. Toujours disponible, avec ta tendresse tu m'as guidé dans mes recherches et m'as transmis tes connaissances. Pour moi, c'est une chance énorme de travailler avec toi et je garderais des excellents souvenirs de tes conseils scientifiques et tes encouragements.

Un très grand merci tout SPECIAL à Geneviève, merci pour toute ton aide, tes conseils, tes soutiens lors des premiers jours à Gif-sur-Yvette et surtout ton idée pour le regroupement de ma famille.

Je tiens à remercier vivement Dr. Hélène Barbier-Brygoo pour m'avoir accueilli au sein de l'ISV. Merci Dr. Sébastien Thomine pour m'avoir accueilli au sein du groupe ST - un bon laboratoire professionnel mais également rempli de chaleur humaine. Les repas de Noël du groupe, même s'ils ont eu lieu en plein été parfois, restent dans ma mémoire par l'ambiance, les discussions, les convivialités inoubliables.

Je tiens à remercier particulièrement l'équipe CLC avec qui j'ai des sentiments partagés. Merci à Mathieu J, tu m'as fait apprendre énormément de choses. Merci à Benoît, Steffi, Edgar et Aïna pour les conversations amicales. Merci 'petit' Sylvain pour tes aides précieuses et ton temps à me consacrer sous la hotte.

Je tiens à remercier très sincèrement l'équipe MSL, NRAMP et l'équipe de Christiane. Je garderais dans ma mémoire tous vos visages, comme un enregistrement au ralenti dans mon âme. Merci beaucoup Jean-Marie et ta famille, les 'barbecues de Limours' resteront dans mon souvenir pour jamais. Merci Tiffanie, Astrid, 'petite' Hélène, Marie, Van Anh et Viviane L. pour les conversations conviviales. Merci Daniel et 'petite' Viviane pour ton aide, sans toi mon congrès à Norwich serait sans succès. Merci beaucoup 'grand' Sylvain, Mathieu II, Jérôme, Mathias pour vos aides et vos humours indispensables. Merci 'café matin' avec les 'sujets du jour' enrichissants qui ne sont jamais deux fois pareils.

Je tiens à remercier profondément Blandine, Marie-Jo et Françoise pour vos préoccupations et vos encouragements tout au long de mes années au laboratoire.

Un grand merci à Christine, Artur, François et Olivier grâce à qui mes premiers jours à l'ISV se sont bien déroulés.

Je remercie tous mes amis de Doc' en herbe pour les moments agréables et les conversations amicales.

Je tiens à remercier vivement les collaborateurs Françoise Daniel-Vedele, Sylvie Cyterne, Marie-Noëlle Soler, Jim Dompierre, Véronique Couvreur qui m'ont aidé dans l'analyse de mes échantillons.

Enfin, je voudrais remercier VIED (Vietnam International Education Development - Ministry of Education and Training) pour m'avoir fourni ma bourse pour réaliser cette thèse.

Merci à tous !

Sommaire

Avant-propos	1
Introduction	3
I. L'étude du stress salin chez les plantes	3
I.1. La salinité du sol	3
I.2. Stress salin chez les plantes	4
I.2.1. Stress osmotique	5
I.2.1.1. Définition du potentiel hydrique	5
I.2.1.2. Effets du stress osmotique	6
I.2.1.3. Mécanismes de perception et signalisation lors du stress osmotique	10
I.2.2. Stress ionique	13
I.2.2.1. La toxicité causée par Na ⁺ et Cl ⁻	13
I.2.2.2. Stratégies d'adaptation au stress ionique Na ⁺ dans le contexte de la plante entière	14
I.2.2.3. Stratégies d'adaptation au stress ionique Cl ⁻ dans le contexte de la plante entière	18
II. La famille des CLCs	23
II.1. La découverte des CLCs	23
II.2. Le modèle structural des CLCs	24
II.2.1. Les deux polypeptides antiparallèles des CLCs	24
II.2.2. Domaines CBS	25
II.3. La structure du pore des CLCs	25
II.3.1. Le site de liaison externe S _{ext}	26
II.3.2. Le site de liaison interne S _{int}	26
II.3.3. Le site de liaison central S _{cen}	28
II.4. Les rôles des CLCs chez différents organismes	29
II.4.1. CLC chez la levure	29
II.4.2. CLCs chez l'homme	29
II.4.2.1. L'activité des canaux CLCs	29
II.4.2.2. L'activité des anti-porteurs Cl ⁻ / H ⁺	30
II.4.3. CLCs chez les plantes	30
II.5. CLCs chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
II.5.1. AtCLCa	31

II.5.2. AtCLCb	32
II.5.3. AtCLCc	33
II.5.4. AtCLCd	33
II.5.5. AtCLCe et AtCLCf	34
II.5.6. AtCLCg	34
Projet de thèse	35
Résultats	36
Chapitre I - Identification et caractérisation d'AtCLCg	36
I. Clonage d'AtCLCg - plusieurs formes différentes d'ADNc	36
I.1. Description des différentes formes d'ADNc	36
I.2. Proportion des formes d'ADNc (+72) et (+14) dans la population totale d'ADNc	37
II. Localisation subcellulaire et tissulaire d'AtCLCg	38
II.1. Localisation subcellulaire d'AtCLCg	38
II.2. Localisation subcellulaire des protéines issues de différentes formes d'ADNc	39
II.3. Expression tissulaire d'AtCLCg	40
III. Criblage des mutants <i>atclcg</i> et production des plantes complémentées	41
III.1. À la recherche des mutants <i>atclcg</i>	41
III.2. Production des plantes complémentées	42
IV. Caractérisation fonctionnelle d'AtCLCg	42
IV.1. AtCLCg ne joue pas de rôle dans l'homéostasie du nitrate dans les conditions testées	43
IV.2. AtCLCg est impliqué dans la réponse au stress NaCl	44
IV.2.1. Les plantes mutantes <i>atclcg</i> sont hypersensibles au NaCl par rapport au sauvage	44
IV.2.1.1. Phénotype des mutants en condition de culture en serre	44
IV.2.1.2. En condition de culture in vitro les mutants montrent:	44
IV.2.2. Le phénotype des plantes mutantes <i>atclcg</i> est spécifiquement lié à l'insertion de l'ADN-T	46
IV.2.3. Le phénotype des plantes mutantes <i>atclcg</i> est spécifiquement lié au chlorure	46
IV.2.4. Le contenu des anions chez les plantes mutantes est modifié par rapport au sauvage	47
IV.3. Analyse de l'expression de certains gènes en condition de stress NaCl	49
IV.3.1. <i>AtCLCg</i> est induit par le stress salin	49
IV.3.2. Régulation post-transcriptionnelle d' <i>AtCLCg</i> en réponse au	50

NaCl	
IV.3.3. Expression des autres <i>AtCLCs</i>	51
IV.3.4. <i>AtSULTR4.1</i> et <i>4.2</i>	51
Conclusion du chapitre I	53
Chapitre II - Relation fonctionnelle entre <i>AtCLCg</i> et <i>AtCLCc</i>	56
I. Problématique de l'étude de la redondance entre <i>AtCLCg</i> et <i>AtCLCc</i>	56
II. Comparaison in silico des séquences d'acides aminés d' <i>AtCLCg</i> et <i>AtCLCc</i>	56
II.1. Le site de liaison avec les anions S_{ext}	57
II.2. Le site de liaison avec les anions S_{cen}	57
II.3. Le site de liaison avec les anions S_{int}	58
III. Structure 3D - la ressemblance entre <i>AtCLCc</i> et <i>AtCLCg</i>	59
IV. À la recherche du phénotype du double mutant <i>atclcc/atclcg</i>	59
IV.1. Le double mutant présente un phénotype identique à celui des simples mutants	60
IV.1.1. Phénotype du double mutant sur milieu de stress NaCl	60
IV.1.2. Phénotype du double mutant sur milieu de stress KCl et de stress osmotique	60
IV.2. Contenus en anion du double mutant en condition de stress NaCl	61
IV.3. Analyse de l'expression d' <i>AtCLCa</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , <i>g</i> et <i>AtSULTR4</i>	62
IV.3.1. Expression d' <i>AtCLCc</i> ou <i>AtCLCg</i> chez les plantes du simple mutant	62
IV.3.2. Expression d' <i>AtCLCa</i> , <i>AtCLCb</i> et <i>AtSULTR4.1</i> chez le double mutant <i>atclcc-1/atclcg-2</i>	63
Conclusion du chapitre II	65
Discussion et Perspectives	69
Matériel et Méthodes	73
I. Matériel	73
I.1. Matériel végétal	73
I.2. Souches bactériennes	73
I.3. Plasmides	74
I.4. Amorces nucléotidiques	75
II. Méthodes	75
II.1. Méthodes relatives aux plantes	75
II.1.1. Stérilisation des graines	75
II.1.2. Culture in vitro de plantules d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	75
II.1.3. Culture de plante d' <i>Arabidopsis thaliana</i> en système hydroponie	76

II.1.4. Production des plantes transgéniques par la transformation avec <i>Agrobacterium tumefaciens</i> par la technique « Floral Dip »	77
II.1.5. Transformation transitoire de protoplaste d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	78
II.2. Méthodes relatives aux bactéries	80
II.2.1. Transformation des bactéries <i>E. coli</i> par choc thermique	80
II.2.2. Transformation d' <i>A. tumefaciens</i> par choc électrique	80
II.3. Méthodes de biologie moléculaire	81
II.3.1. Extraction rapide d'ADN génomique végétal	81
II.3.2. Construction de plasmides par la technique Gateway®	81
II.3.3. Extraction d'ARN total au Trizol / Chloroforme	82
II.3.4. Transcription inverse pour synthèse d'ADNc	83
II.3.5. PCR quantitative en temps réel - qRT PCR	84
II.3.6. Dosage des anions par analyseur DX-120 DIONEX®	84
Bibliographie	86
Annexe	102

Liste des abréviations

35S	Promoteur constitutif du virus CaMV de la mosaïque du chou-fleur	LEA	Late Embryogenesis Abundant
ABA	Acide Abscisique	LRPK	Leucine-rich Repeat Receptor-like Kinase
ADN	Acide Désoxyribonucléique	MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
ADNc	ADN complémentaire	mM	Milli molaire
ADN-T	ADN de transfert	mOsm	Milliosmole
ADP	Adénosine 5'-DiPhosphate	MPa	Mégapascal
ALMT	Al ³⁺ -activated Malate Transporter	MS	Murashige and Skoog
AMPK	Adenosine Monophosphate Activated Protein Kinase	MYB	Myeloblastosis
APX	Ascorbate peroxidase	N	Newton
ARN	Acide Ribonucléique	NASC	European Arabidopsis Stock Centre
ATP	Adénosine-5'-TriPhosphate	NCED	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase
bZIP	Basic leucine zipper	NHX	Sodium-Proton Exchanger
CBS	Cystathionine- β -Synthase	NRAMP	Natural Resistance-Associated Macrophage Protein
CCC	Cation-Chloride Cotransporter	NSCC	Non Selective Cation Channel
CDPK	Ca ²⁺ -dependent protein kinase	PCR	Polymerase Chain Reaction
CLC	Chloride Channel	PEG	PolyEthylene Glycol
CNGC	Cyclic Nucleotide Gated Cation Channel	PIP	Plasma membrane Intrinsic Protein
CO ₂	Dioxyde de carbone	PO ₄ ³⁻	Phosphate
Col-0	Accession Columbia	qRT-PCR	quantitative Reverse Transcription PCR
DEPC	Diéthyl Pyrocarbonate	QUAC	Quickly Activating Anion Conductance
DHAR	Réductase déshydroascorbate	RH	Humidité relative
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique	RLK	Receptor-Like Kinase
EREBP	Ethylene-Responsive Element Binding Protein	ROS	Espèces réactives de l'oxygène
FAO	Food and Agriculture Organisation	SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
GEF	Glycerol / Ethanol Fe-requiring	SLAC	Slow Anion Channel-associated
GFP	Green Fluorescent Protein	SOC	Super Optimal broth with Catabolite
GLR	GLutamate Receptor	SOD	Superoxyde dismutase
GPCR	G-Protein Coupled Receptor	SOS	Salt Overly Sensitive
GR	Glutathion Réductase	SULTR	Sulfate Transporter
GST	Glutathion-S-Transférase	TAIR	The Arabidopsis Information Resource
GUS	Beta-Glucuronidase	Tris	trihydroxyméthylaminométhane
HA	Hemagglutinin	Ubi	Ubiquitine
HK	Histidine Kinase	UTR	UnTranslated Region
HKT	High-affinity K ⁺ Transporter	VIT	Vacuolar Iron Transporter
InsP	Inositol Polyphosphate	WS	Accession Wassilewskija
IRAC	Inwardly Rectifying Anion Channel	X-Gluc	Acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronique
JA	Acide Jasmonique	YFP	Yellow Fluorescent Protein
JPL	milieu Jouanneau et Péaud-Lenoël	β -ME	β -MercaptoEthanol
LB	L-Broth ou Luria Bertani	Ψ	Potentiel
LCT	Low-affinity Cation Transporter		

Table des illustrations

Figures

Figure I-1 : Diversité dans la tolérance au sel d'espèces différentes	4
Figure I-2 : Illustration schématique du changement de potentiel hydrique du milieu extérieur sur la cellule végétale	5
Figure I-3 : Schéma illustrant une molécule de protéine stabilisée par des molécules H ₂ O	9
Figure I-4 : Illustration schématique hypothétique de la réponse de la croissance aux deux phases de réponse à la salinité	10
Figure I-5 : Voie générique pour la réponse des plantes au stress salin, stress hydrique, le froid ou le chaud	11
Figure I-6 : Réseaux de régulation transcriptionnelle des signaux de stress abiotiques et expression des gènes	12
Figure I-7 : Schéma montrant le transport radial et le mouvement longitudinal d'ions Na ⁺ à partir du sol dans la racine, dans le xylème, et la recirculation au travers du phloème	15
Figure I-8 : Régulation de la concentration de Na ⁺ par la voie de SOS	16
Figure I-9 : Division des groupes de plantes selon leur croissance à une haute concentration de Cl ⁻ dans le milieu extérieur	18
Figure I-10 : Arbre phylogénétique présentant les CLCs chez les différentes espèces	24
Figure I-11 : (A) La protéine CLC (B) Structure du pore de StCLC	25
Figure I-12 : (A) Topologie d'une sous-unité de CLC bactérien (B) Une sous-unité de CLC eucaryotique	26
Figure R-1 : Quatre formes d'ADNc d'AtCLCg obtenues au cours des clonages	37
Figure R-2 : Quantification des différentes formes d'ADNc d'AtCLCg au sein d'une population totale d'ADNc	38
Figure R-3 : Localisation subcellulaire d'AtCLCg	39
Figure R-4 : Expression tissulaire d'AtCLCg	40
Figure R-5 : Position des insertions ADN-T et analyse des transcrits chez les mutants <i>atclg</i>	41
Figure R-6: Sélection des plantes complémentées	42
Figure R-7: Implication d'AtCLCg dans l'homéostasie du nitrate	43
Figure R-8: Les mutants <i>atclg</i> cultivées sur sol en serre sont hypersensibles au NaCl	44
Figure R-9: Les mutants <i>atclg</i> se développent moins bien sur NaCl que le sauvage	45
Figure R-10: Impact de l'ADN-T sur le phénotype NaCl	46
Figure R-11: Les mutants <i>atclg</i> sont hypersensibles au KCl mais non au mannitol	47
Figure R-12: Contenu en anions des plantes sauvages et mutantes <i>atclg</i> en réponse au NaCl	48

Figure R-13: Expression d' <i>AtCLCg</i> en réponse au stress salin	49
Figure R-14: La réponse d' <i>AtCLCa</i> , d' <i>AtCLCb</i> et d' <i>AtSULTR4.1</i> au stress NaCl en absence d' <i>AtCLCg</i>	51
Figure R-15: Comparaison des séquences d'acides aminés d' <i>AtCLCg</i> et d' <i>AtCLCc</i>	57
Figure R-16: Comparaison des structures 3D d' <i>AtCLCg</i> et d' <i>AtCLCc</i>	59
Figure R-17: Le double mutant <i>atclcc-1/atclcg-2</i> a un phénotype similaire à chacun des 2 simples mutants	60
Figure R-18: Analyse du double mutant sur KCl et mannitol	61
Figure R-19: Le contenu en anions est identique chez le double mutant <i>atclcc-1/atclcg-2</i> et chez les simples mutants, <i>atclcc-1</i> et <i>atclcg-2</i>	62
Figure R-20: Expression d' <i>AtCLCg</i> et d' <i>AtCLCc</i> en réponse au NaCl chez les simples mutants <i>atclcc-1</i> et <i>atclcg-2</i>	63
Figure R-21: Expression d' <i>AtCLCa</i> , d' <i>AtCLCb</i> et d' <i>AtSULTR4.1</i> en réponse au NaCl et à l'extinction d' <i>AtCLCc</i> et/ou d' <i>AtCLCg</i>	64
Figure R-22: Modèle d'explication de la sur-accumulation du chlorure chez la plante mutante <i>atclcg</i> vis-à-vis de la plante sauvage	70
Figure R-23: Modèle d'explication de la relation entre <i>AtCLCc</i> et <i>AtCLCg</i>	71
Figure M-1 : Plasmide d'entrée de clonage Gateway® pDONR207	74
Figure M-2 : Plasmide pAlligator2 utilisé pour la surexpression d'ADNc chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	74
Figure M-3 : Vecteur destinataire pMDC43 pour l'analyse de la localisation subcellulaire des protéines	75
Figure M-4 : Vecteur binaire pKGWFS7 utilisé pour l'analyse du promoteur	75
Figure M-5 : Système de clonage Gateway®	81

Tableaux

Tableau I-1 : Récapitulatif des connaissances sur les CLCs	23
Tableau R-1 : Liste des différentes formes d'ADNc contenant des changements repérés auprès des colonies bactériennes	36
Tableau M-1 : Noms, séquences et températures d'hybridation des amorces utilisées dans ce travail	76
Tableau M-2: Conditions de cultures des plantes	77
Tableau M-3: Marqueur de sélection pour les vecteurs utilisés	77

AVANT-PROPOS

Les plantes sont des êtres vivants multicellulaires à la base de la chaîne alimentaire. Elles forment l'une des subdivisions des eucaryotes appelée « *Plantae* ». En général, elles sont fixées au sol par leurs racines. Cela les rend très dépendantes des conditions environnementales malgré leurs capacités à produire leur propre matière organique à partir des sels minéraux et de l'eau puisés dans le sol, du dioxyde de carbone naturellement présent dans l'air, assimilé par les feuilles grâce à l'énergie solaire (organismes autotrophes photosynthétique) pour assurer leur survie et développement. Les conditions de l'environnement des plantes sont extrêmement variables dépendant du soleil, de la pluie, du vent, de la température, de l'eau et des sels minéraux solubles dans le sol. Tous ces éléments jouent des rôles importants pour une croissance normale des plantes.

Un des facteurs le plus limitant à la croissance des plantes est le sel sous la forme de chlorure de sodium (NaCl). L'augmentation de la tolérance au sel des plantes est un élément clé ainsi qu'un enjeu majeur pour les plantes pour finir leur cycle de vie, pour l'homme pour soutenir les augmentations de la production alimentaire dans de nombreuses régions du monde. Face au stress salin, certaines plantes ont acquis des mécanismes biologiques de tolérance aux effets néfastes des sels sur le métabolisme, la croissance et/ou le développement. Parmi plusieurs facteurs jouant un rôle dans la tolérance des plantes au sel, les transporteurs / canaux ioniques, en particulier les transporteurs / canaux de chlorure, jouent un rôle important au niveau cellulaire. Ce sont des facteurs importants impliqués dans de nombreux mécanismes de réponses aux stress environnementaux tels que l'homéostasie des composantes nutritives, la séquestration des ions toxiques par la compartimentation, l'exclusion des ions en excès ou encore le mouvement des stomates...

Ce mémoire présente, en premier une analyse bibliographique contenant deux parties : (i) les problématiques concernant le stress salin chez la plante et la diversité de mécanismes métaboliques que cette dernière possède en réponse à ce stress ; (ii) les connaissances actuelles relatives aux transporteurs / canaux de chlorure de type CLC (Chloride Channel) chez les êtres vivants, particulièrement chez les plantes, et leurs rôles

physiologiques dans l'ensemble des processus biologiques. Dans la seconde partie de ce mémoire, sont présentés les résultats que j'ai obtenus au cours de ma thèse. J'ai étudié, dans le chapitre I, le rôle d'AtCLCg dans la réponse au stress salin au niveau de la plante entière par l'utilisation d'approches de biologie moléculaire et de physiologie. J'ai ensuite clarifié, dans le chapitre II, la relation fonctionnelle entre les deux protéines AtCLCc et AtCLCg dans le contexte de la réponse au stress salin de la plante. Enfin dans une troisième partie, l'ensemble des résultats obtenus sont discutés ainsi que les travaux mis en perspectives sont présentés.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. L'étude du stress salin chez les plantes

I.1. La salinité du sol

Dans le monde, il y a plus de 800 millions d'hectares de terre infectée par la salinité (FAO - Food and Agriculture Organisation, 2008). Ce chiffre représente plus de 6% de la superficie totale du monde. La plupart de ces terres infectées est due à des causes naturelles ou à l'accumulation de sels dans les zones arides et semi-arides (Rengasamy, 2002). L'altération des roches mères libère différents types de sels solubles, principalement des chlorures de sodium, de calcium, de magnésium, et une quantité moins importante des sulfates et carbonates (Munns et Tester, 2008). Le chlorure de sodium est le sel le plus soluble et abondamment libéré. L'autre cause de l'accumulation de sel dans le sol est le dépôt de sels océaniques réalisé par le vent et la pluie. L'eau de pluie contient 6 - 50 mg. kg⁻¹ de chlorure de sodium, la concentration diminue avec la distance de la côte. La pluie contenant 10 mg. kg⁻¹ de chlorure de sodium déposerait 10 kg. ha⁻¹ de sel pour chaque 100 mm de précipitations par an (Munns et Tester, 2008).

À part les causes naturelles de salinité des sols, l'agriculture moderne, en raison de défrichage ou de l'irrigation conduit, à l'augmentation de la salinité des terres. L'irrigation combinée à un mauvais drainage est la cause la plus grave, parce qu'elle conduit à des pertes de terres agricoles productives. La raison de cette salinisation secondaire, par opposition à la salinisation primaire des marais salés en bord de mer, est que l'eau s'évapore mais les sels restent et s'accumulent dans le sol (Zhu, 2007). Selon la FAO, au niveau mondial, 10 millions d'hectares des terres cultivées sont abandonnés chaque année à cause des problèmes d'irrigation. Sur les 1,5 milliards d'hectares de terres cultivées par l'agriculture non irriguée, seulement 2% (32 millions d'hectares) sont affectés par la salinité à différents degrés, alors que sur les 230 millions d'hectares des terres irriguées actuellement, ce chiffre s'élève à 20% (45 millions d'hectares).

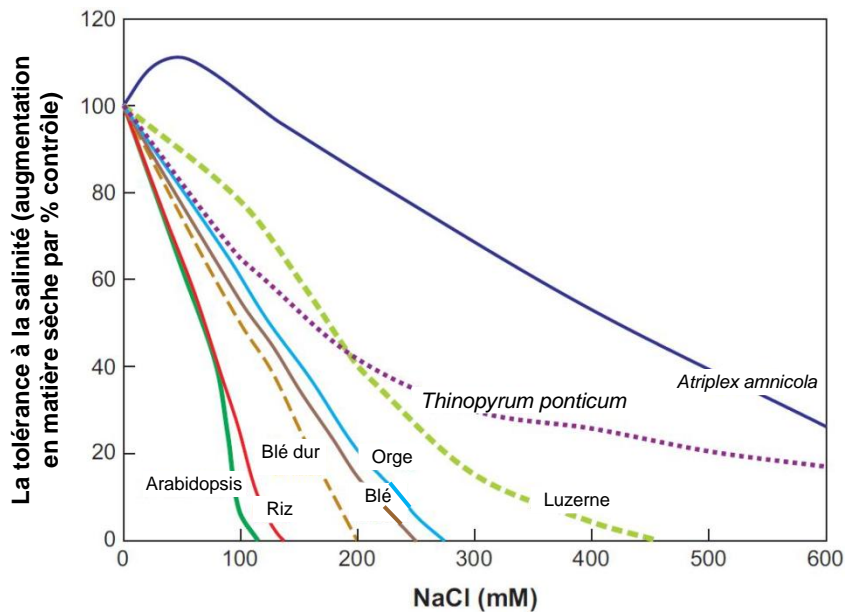


Figure I-1 : Diversité dans la tolérance au sel d'espèces différentes, représentée comme des augmentations en matière sèche des feuilles après 3 semaines de croissance dans la solution ou le sable contenant du NaCl par rapport au contrôle. Les données sont pour le riz (*Oryza sativa*), le blé dur (*Triticum turgidum* ssp *durum*), le blé (*Triticum aestivum*), l'orge (*Hordeum vulgare*), *Thinopyrum ponticum*, *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), la luzerne (*Medicago sativa*), et *Atriplex amnicola* (D'après Munns et Tester, 2008).

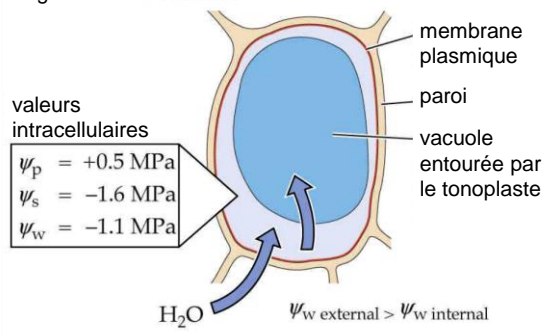
Le sol salin est caractérisé par une forte concentration de sels solubles. Un sol classifié salin a une concentration de sels équivalente à environ 40 mM NaCl et génère une pression osmotique d'environ 0,2 MPa (équivalent à 0,2 N. mm⁻²) (George *et al.*, 2008). Sachant que NaCl est le sel le plus soluble et répandu, dans la situation de stress salin, les plantes ont développé des mécanismes pour réguler l'accumulation de Na⁺ et Cl⁻ ainsi que pour sélectionner d'autres éléments nutritifs couramment présents en faibles concentrations dans le sol, tels que K⁺ et NO₃⁻. Dans la plupart des plantes, Na⁺ et Cl⁻ sont effectivement exclus par les racines tandis que l'eau est reprise à partir du sol (Munns, 2005).

I.2. Stress salin chez les plantes

Chez la plante, la tolérance au sel est la capacité des plantes à croître et à compléter leur cycle de vie sur un substrat qui contient de fortes concentrations de sel soluble (Parida et Das, 2004). Les plantes qui peuvent survivre sur des concentrations élevées de sel dans la rhizosphère et poussent bien sont appelés halophytes, tandis que les plantes glycophytes sont les plantes que l'on ne rencontre pas naturellement sur un substrat salin, ne pouvant tolérer qu'une faible quantité de sels dans le milieu de croissance. Les plantes glycophytes sont très sensibles au sel : leur croissance est sévèrement inhibée voir nulle par 100 - 200 mM NaCl. Par exemple *Arabidopsis*, ou encore le riz, ne peut pas terminer son cycle de vie à 100 mM NaCl *in vitro* ou 200 mM NaCl en terre ; les arbres fruitiers tels que les agrumes et avocatiers sont sensibles à quelques mM NaCl. Les plantes halophytes telles que la luzerne ou *Thinopyrum ponticum* par contre peuvent survivre sur des concentrations supérieures à 300 mM NaCl (Figure I-1). Certaines plantes halophytes peuvent tolérer des niveaux de sel extrêmement élevés, par exemple *Atriplex vesicaria* peut produire des rendements élevés en présence de 700 mM NaCl, tandis que *Salicornia europaea* resterait en vie à 1020 mM NaCl (Zhu, 2007). En fonction de leur capacité à tolérer le sel, les plantes halophytes sont caractérisées par une grande diversité morphologique et physiologique qui leur permet de faire face à des conditions salines.

Le stress salin s'applique sur la plante sous deux types de contraintes. Tout d'abord, le sel exerce un effet osmotique dès que les racines sont en contact avec le sel jusqu'à un niveau seuil de concentration en sel. Ce niveau seuil est d'environ 40 mM de NaCl pour la plupart des plantes, ou moins pour les plantes sensibles comme le riz et *Arabidopsis*

cellule turgescente : $\psi_w \text{ external} = 0 \text{ MPa}$



cellule plasmolysée : $\psi_w \text{ external} = -2.5 \text{ MPa}$

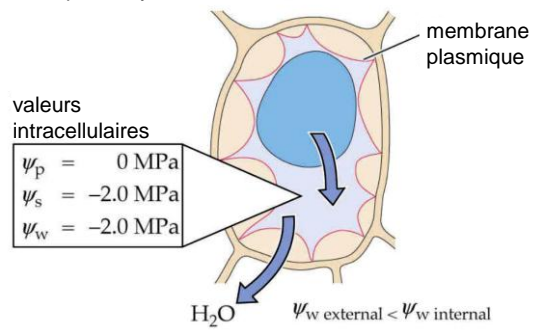


Figure I-2 : Illustration schématique du changement de potentiel hydrique du milieu extérieur sur la cellule végétale (D'après Buchanan *et al.*, 2000).

(Munns et Tester, 2008). Dans un deuxième temps, le sel s'accumule à des concentrations toxiques dans les feuilles et entraîne un stress ionique (Figure I-4).

I.2.1. Stress osmotique

Le stress osmotique est une circonstance défavorable, qui dérange ou est susceptible de perturber le fonctionnement physiologique normal de la plante, qui affecte la croissance immédiatement et est causée par le sel à l'extérieur des racines (Munns, 2005 ; Munns et Tester, 2008). L'eau circule dans la plante du sol vers les feuilles où elle passe à l'état gazeux au niveau des parois cellulaires des cellules du mésophylle avant de s'échapper dans l'air ambiant en traversant l'épiderme, principalement par les stomates. Cette circulation dépend du gradient de potentiel hydrique. Le stress salin exerce une contrainte primaire immédiatement et non spécifique par une baisse de potentiel hydrique du sol.

I.2.1.1. Définition du potentiel hydrique

Le potentiel hydrique (Ψ_w) est une mesure de l'avidité en eau d'un compartiment biologique ou chimique. Toute substance en solution aqueuse exerce sur les molécules d'eau une force d'attraction. Plus la solution est concentrée plus cette force est forte et moins les molécules d'eau peuvent la quitter. Le potentiel hydrique représente donc le potentiel de l'eau à quitter un compartiment donné : plus il est élevé dans un compartiment, plus l'eau a tendance à le quitter et, inversement, l'eau a tendance à rentrer dans les compartiments ayant un faible potentiel hydrique (Figure I-2). Le potentiel hydrique correspond à l'addition de :

$$\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p + \Psi_g$$

où Ψ_s est le potentiel osmotique ou potentiel des solutés ; Ψ_p est le potentiel hydrostatique ou potentiel de pression ; Ψ_g est le potentiel gravitationnel.

Au niveau de la plante entière, la circulation de l'eau est possible : elle se déplace du sol, où le potentiel hydrique est élevé, à l'air ambiant où le potentiel hydrique est le plus faible. Lorsque la plante est dans la situation de stress salin, le potentiel osmotique diminue, ce qui entraîne une diminution du potentiel hydrique du sol. La cellule doit alors ajuster son potentiel osmotique afin d'éviter des pertes d'eau trop importantes. Ainsi le stress osmotique non seulement réduit le potentiel hydrique et provoque un déséquilibre

ionique ou des perturbations dans l'homéostasie des ions (Parida et Das, 2004), mais entraîne également des changements de conductivité hydraulique tissulaire.

I.2.1.2. Effets du stress osmotique

Le statut altéré de l'eau conduit à la réduction de la croissance initiale et de la limitation de la productivité végétale. Par l'effet perte d'eau, le stress osmotique affecte tous les processus importants chez la plante tels que le changement de conductivité hydraulique des tissus, le mouvement des stomates, la photosynthèse ou encore la croissance, etc.

a) Effet du stress osmotique sur le changement de conductivité hydraulique des tissus

La plante est capable de contrôler l'absorption d'eau en ajustant la conductivité hydraulique de la membrane plasmique. Les aquaporines sont des protéines membranaires qui permettent un passage rapide des molécules d'eau d'un compartiment à l'autre. Cette fonction s'effectue par ouverture ou fermeture des pores associés à ces protéines. Chez la plante, les aquaporines sont les principaux facteurs qui exercent le contrôle sur la conductivité hydraulique tissulaire. Elles sont adaptées tant à des conditions de sécheresse que d'inondation, elles sont impliquées dans la préservation des réserves d'eau ou dans l'évacuation des excédents d'eau présents dans la plante (Cochard *et al.*, 2007).

Chez *Arabidopsis*, les aquaporines sont codées par une grande famille multigénique avec 35 membres dont certaines possèdent un motif d'expression spécifique de la racine (Javot et Maurel, 2002). Daniels et collaborateurs (1994) ont montré que des *Arabidopsis* surexprimant des aquaporines de type RD28 possèdent une meilleure tolérance à un stress osmotique en comparaison aux plantes sauvages. Le même résultat a été observé quand l'aquaporine RWC3 est surexprimée chez le riz (Lian *et al.*, 2004). A l'inverse, la surexpression d'une aquaporine *HvPIP2;1* d'orge augmente la sensibilité au sel chez le riz (Katsuhara *et al.*, 2003). Au cours d'un stress hydrique, les aquaporines ne sont pas toutes réprimées, certaines sont surexprimées. En effet, il a été montré que chez *Arabidopsis*, les expressions des gènes codant les aquaporines sont pour la plupart réprimées sauf pour *AtPIP1;4* et *AtPIP2;5* dont l'expression est fortement augmentée, ce qui suggère une redirection de l'eau vers certains types cellulaires afin d'optimiser son utilisation (Martre *et al.*, 2002 ; Alexandersson *et al.*, 2005).

b) Effet du stress osmotique sur le mouvement des stomates

Le stress osmotique perturbe l'absorption de l'eau des plantes et la biosynthèse de l'acide abscissique (ABA) conduisant à un changement rapide de la conductance stomatique (Fricke *et al.*, 2004). La diminution de l'ouverture stomatique de la plante lors du stress osmotique est la réponse la plus dramatique (Munns et Tester, 2008). Le stress osmotique déclenche la production de l'ABA dans les racines, qui est ensuite transporté vers les feuilles causant la fermeture des stomates. Chaves et collaborateurs (2009) ont indiqué que, lors du stress osmotique, le pH du xylème et de l'apoplasme influence la compartimentation d'ABA. Par conséquent, la quantité d'ABA s'accumule dans les cellules de garde et donc accélère la fermeture du stomate. Chez la tomate, l'augmentation d'ABA dans les feuilles est corrélée avec la synthèse d'ABA précoce en réponse au stress salin, ce qui provoque la fermeture des stomates et, par conséquent, une réduction d'échange de gaz de la feuille (Maggio *et al.*, 2007 ; Lovelli *et al.*, 2011).

Chez *Arabidopsis*, il a été démontré que l'expression d'un gène 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) codant une enzyme clé dans la biosynthèse de l'ABA, *AtNCED3*, est induite par la sécheresse et contrôle le niveau de l'ABA endogène en cas des conditions de stress. La surexpression d'*AtNCED3* entraîne une augmentation du niveau d'ABA endogène et donc favorise la fermeture des stomates. L'analyse de ces plantes transgéniques montre une réduction du taux de transpiration des feuilles et une amélioration de la tolérance à la sécheresse (Iuchi *et al.*, 2001). Il a été démontré que les expressions d'autres NCED chez d'autres espèces sont aussi induites par le stress salin. En effet, l'expression du gène *AhNCED1* chez l'arachide est induite par la salinité et la déshydratation. Les transcrits d'*AhNCED1* et l'ABA endogène s'accumulent principalement dans les feuilles et les tiges d'arachide (Wan et Li, 2006).

La fermeture des stomates entraîne des contraintes secondaires du stress osmotique sur la plante, augmente la température foliaire, empêche la transpiration des feuilles et donc éteint le moteur d'absorption et translocation de l'eau et des nutriments. Cela affecte également la disponibilité en CO₂, importante pour le fonctionnement du cycle de Calvin, et entraîne une accumulation des composants intermédiaires réduits, aboutissant au stress oxydatif au niveau des photosystèmes.

c) Effet du stress osmotique sur la photosynthèse

Le stress osmotique non seulement perturbe les balances ioniques et éléments nutritifs des plantes mais également affecte le transport d'électrons photosynthétiques et les activités des enzymes pour la fixation du carbone (Parida et Das, 2004 ; Zhang *et al.*, 2011). Une diminution du taux de photosynthèse chez les plantes qui se développent sur milieu de stress osmotique est observée. Elle est due à plusieurs facteurs : la déshydratation des membranes cellulaires qui réduisent leur perméabilité au CO₂, la réduction de l'offre de CO₂ en raison de la fermeture des stomates, ou les changements de l'activité enzymatique induite par des changements dans la structure cytoplasmique (Parida et Das, 2004). La réduction de la photosynthèse augmente la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui entraîne la dégradation d'ADN, l'oxydation des acides aminés ou encore l'inactivation de certaines enzymes spécifiques. La cellule augmente alors l'activité des enzymes qui détoxifient ces espèces (Apel et Hirt, 2004). Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe plus de 150 gènes codant des éléments de la détoxification des ROS, notamment des composés antioxydants comme l'acide ascorbique et le glutathion ou des enzymes permettant l'élimination des espèces réactives de l'oxygène comme la catalase, la superoxyde dismutase (SOD), l'ascorbate peroxidase (APX), ou encore la glutathione S-transferase (Noctor et Foyer, 1998 ; Mittler *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*, 2012). En réponse à un stress hydrique, l'expression et l'activité de ces enzymes sont très fortement stimulées (Agarwal *et al.*, 2005 ; Kirch *et al.*, 2005 ; Kotchoni et Gachomo, 2006). Il a été également montré que la surexpression des enzymes telles que la réductase déshydroascorbate (DHAR), la glutathion-S-transférase (GST) ou la glutathion réductase (GR) chez le tabac améliore la tolérance au stress salin en modulant le niveau de glutathion (Le Martret *et al.*, 2011).

d) Effet du stress osmotique sur l'accumulation des solutés compatibles

L'ajustement osmotique par l'accumulation des solutés compatibles est un processus omniprésent chez tous les organismes vivants. Les principales propriétés des osmoprotecteurs sont de préserver l'activité des enzymes dans les solutions salines (Yokoi *et al.*, 2002), de stabiliser la structure des protéines ou encore de détoxifier les ROS (Bohnert et Jensen, 1996). Ce sont des composés organiques qui possèdent des propriétés physiques et biologiques compatibles. Ces composés ont en commun la propriété d'être non chargés à pH neutre et d'avoir une haute solubilité dans l'eau. Ils sont localisés dans le

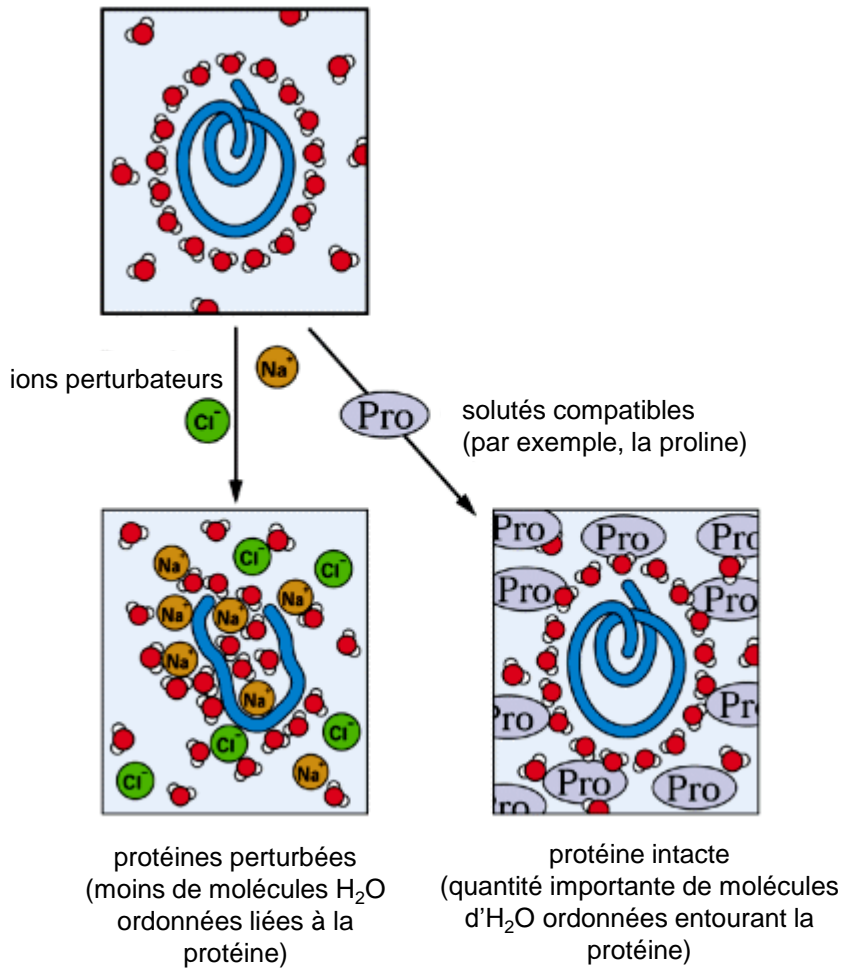


Figure I-3 : Schéma illustrant une molécule de protéine stabilisée par des molécules H₂O (D'après Buchanan *et al.*, 2000).

cytoplasme (cytosol et organelles), plus rarement dans la vacuole. La majorité des osmolytes compatibles sont des solutés organiques comme certains acides aminés (proline notamment), des composés d'ammonium quaternaire par exemple glycine bêtaïne, proline bêtaïne, etc. (Yokoi *et al.*, 2002). Une catégorie importante de solutés organiques se compose également de sucres simples (fructose et glucose principalement), d'alcools de sucre (glycérol et inositol méthyle) ou de sucres complexes (tréhalose, raffinose et fructose). Lors d'un stress salin, les ions inorganiques entrent facilement dans la sphère d'hydratation des protéines et favorisent le déroulement protéique. En revanche, les osmolytes compatibles tendent à être exclus de la sphère d'hydratation des protéines, les molécules d'eau vont alors entourer les protéines de manière ordonnée et stabiliser leurs structures secondaires (Figure I-3). Ces composés sont supposés jouer un rôle important dans l'ajustement osmotique cytoplasmique de la plante en réponse à des contraintes osmotiques. Cependant, l'importance de leur fonction dans la tolérance au stress salin reste encore contrastée. Bien qu'il ait été montré une corrélation de l'accumulation de certains d'entre eux avec une plus forte tolérance, eux seuls ne suffisent pas à conférer cette tolérance (Chen et Murata, 2008 ; Ghars *et al.*, 2008).

e) Effet du stress osmotique sur la croissance et l'architecture

Face au stress osmotique, une diminution soudaine du potentiel hydrique du sol provoque la perte d'eau des cellules foliaires, entraînant une perte transitoire du volume de la cellule par turgescence. Elle réduit immédiatement non seulement l'expansion des cellules dans l'apex racinaire et dans les jeunes feuilles mais également provoque la fermeture des stomates (Munns et Tester, 2008). Bien qu'après quelques heures, les cellules retrouvent leur volume initial, les taux d'allongement des cellules sont réduits (Munns et Tester, 2008). En conséquence, après plusieurs jours, les dimensions des cellules changent : les cellules sont plus petites et épaisses.

Le stress osmotique provoque un retard de croissance remarquable chez la plante glycophyte. Ce stress diminue de façon drastique non seulement les masses fraîches et sèches des tiges mais également le nombre de feuilles et la surface foliaire totale. Par exemple, chez la chicorée, il a été récemment montré que la surface foliaire était moins importante chez des plantes ayant subi un stress osmotique par rapport aux témoins (Vandoorne *et al.*, 2012). Cette réponse est liée à la diminution de la taille des cellules ainsi qu'à une réduction du taux de division cellulaire (Montero *et al.*, 1998 ; Sabirzhanova

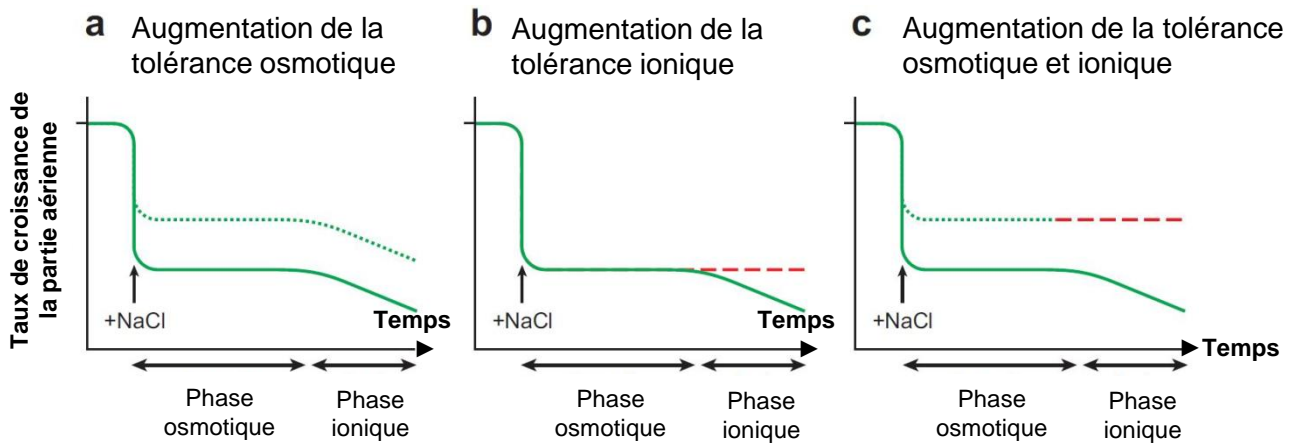


Figure I-4 : Illustration schématique hypothétique de la réponse de la croissance aux deux phases de réponse à la salinité pour les génotypes qui diffèrent par la vitesse à laquelle le sel atteint des niveaux toxiques dans les feuilles. Avec les espèces annuelles, le délai est de quelques jours ou semaines, selon les espèces et le niveau de salinité. Avec des espèces vivaces, le délai est quelques mois ou un an. Pendant la phase 1, la croissance des deux génotypes est réduite en raison de l'effet osmotique de la solution saline à l'extérieur des racines. Pendant la phase 2, la concentration ionique toxique agit sur les génotypes les plus sensibles et réduit la capacité photosynthétique des plantes (D'après Munns et Tester, 2008).

et al., 2005 ; Skirycz *et al.*, 2011). Cela conduit à une diminution de l'expansion foliaire et à une apparition plus lente des jeunes feuilles, afin de préserver la source en carbohydrates et maintenir ainsi le métabolisme basal (Figure I-4).

Lors d'un stress osmotique, le développement du système racinaire est également affecté mais est moins inhibé que la croissance des parties aériennes (Sharp *et al.*, 2004). En revanche, la croissance de la zone apicale de la racine principale est maintenue pour permettre à la plante d'explorer le sol et de rechercher de nouvelles sources en eau mais aussi pour augmenter le volume de stockage des ions toxiques dans la vacuole en cas de stress salin (Sharp *et al.*, 2004). Plusieurs études chez le maïs et la tomate ont suggéré que la forte accumulation d'ABA observée dans la racine en réponse au stress salin serait à l'origine du maintien de la croissance de la zone apicale (Albacete *et al.*, 2008 ; Sharp et LeNoble, 2002 ; Spollen *et al.*, 2000 ; Saab *et al.*, 1990 ; Lovelli *et al.*, 2011). Des travaux récents chez la tomate pour mesurer la dynamique d'ABA et l'accumulation d'ions lors d'un stress salin montrent également que cette hormone pourrait jouer un rôle important dans la répartition de matière sèche entre racines et parties aériennes (Lovelli *et al.*, 2011). D'autres hormones pourraient jouer des rôles clés sur la croissance en réponse au stress salin. Effectuée sur deux cultivars de tomate, une analyse des modifications de contenu en acide jasmonique endogène basale (JAs), une autre hormone végétale, a montré que le niveau de JA dans les deux cultivars a changé en réponse au stress salin. Les changements de contenu en JA endogène en réponse au stress sont différents chez les différents génotypes. Une augmentation constante du JA a été observée dans le cultivar Hellfrucht Frühstamm (HF) au début du traitement salin, tandis que dans le cultivar Pera, le niveau de JA a diminué après 24 h de traitement (Pedranzani *et al.*, 2003). Perez-Alfocea *et al.* (2011) ont montré, qu'en général, les stress osmotique et salin augmentent chez la plante non seulement la concentration d'ABA dans le xylème, mais aussi diminuent la concentration de cytokinines qui stimulent la croissance expansive et préviennent la sénescence prématurée des feuilles.

I.2.1.3. Mécanismes de perception et signalisation lors du stress osmotique

L'adaptation des plantes aux contraintes environnementales dépend de l'activation des cascades de réseaux moléculaires impliqués dans la perception du stress, la transduction des signaux, l'expression des gènes spécifiques relatifs aux stress abiotiques. Il a été montré que les stress salins, par le froid / chaud ou la pollution chimique, utilisent

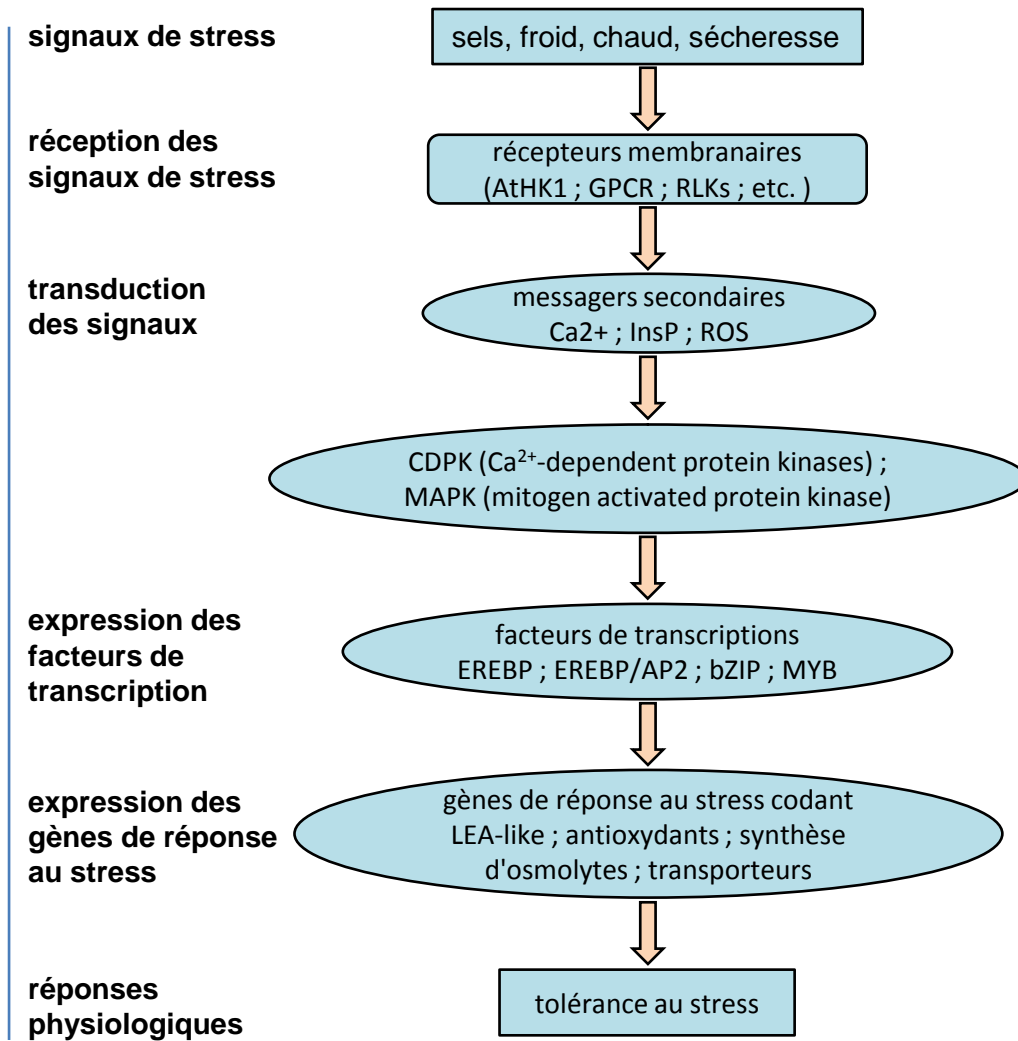


Figure I-5 : Voie générique pour la réponse des plantes au stress salin, stress hydrique, le froid ou le chaud (Adapté de Huang *et al.*, 2012).

en partie la même signalétique conduisant dans chacun des cas au stress osmotique (Xiong *et al.*, 2002 ; Vinocur et Altman, 2005).

Une variété de gènes répond au stress osmotique dans diverses espèces de plante. Dans les premières heures d'un stress osmotique, l'expression d'environ 30% des gènes est régulée (Kreps *et al.*, 2002 ; Seki *et al.*, 2002 ; Leonhardt *et al.*, 2004 ; Zeller *et al.*, 2009). Ces gènes induits lors des conditions de stress ont pour fonction non seulement de protéger les cellules du déficit en eau par la production de protéines importantes pour le métabolisme, mais aussi de réguler l'expression des gènes pour la transduction du signal dans la réponse (Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

Ici sont résumées les connaissances actuelles sur les mécanismes de perception et de signalisation du stress osmotique (Figure I-5) :

- 1) Les signaux de stress extracellulaire sont d'abord perçus par les récepteurs membranaires. La protéine AtHK1 (pour Histidine Kinase) chez *Arabidopsis* fonctionne comme un senseur osmotique et transmet le signal de stress en aval à une cascade MAPK kinases (Urao *et al.*, 1999). La protéine GPCR (G-Protein Coupled Receptor), couplée aux protéines G, perçoit également des signaux extracellulaires, ce qui va activer une voie de signalisation faisant intervenir des protéines G hétérotrimériques. Cette protéine joue ainsi un rôle important dans différentes voies de signalisation en réponse au stress (Tuteja, 2009). Les RLKs (Receptor-Like Kinases) sont une famille de protéines transmembranaires contenant environ 600 membres (Shiu et Bleecker, 2001). Chez la pomme de terre, StLRPK1 (Leucine-rich Repeat Receptor-like Kinase) est un récepteur membranaire qui est induit dans des feuilles par une contrainte salinité, participant dans les réponses contre les stress environnementaux et la résistance aux maladies.
- 2) La réception des signaux de stress par les récepteurs entraîne des apparitions de messagers secondaires. Le calcium joue un rôle en tant que la molécule messager secondaire principale dans la plante sous diverses conditions de stress, y compris la salinité. Il a été montré que la modulation du pH et du Ca^{2+} cytosolique provoque un changement de lipides totaux et donc affecte l'intégrité des membranes (Kader et Lindberg, 2010). La voie inositol polyphosphate

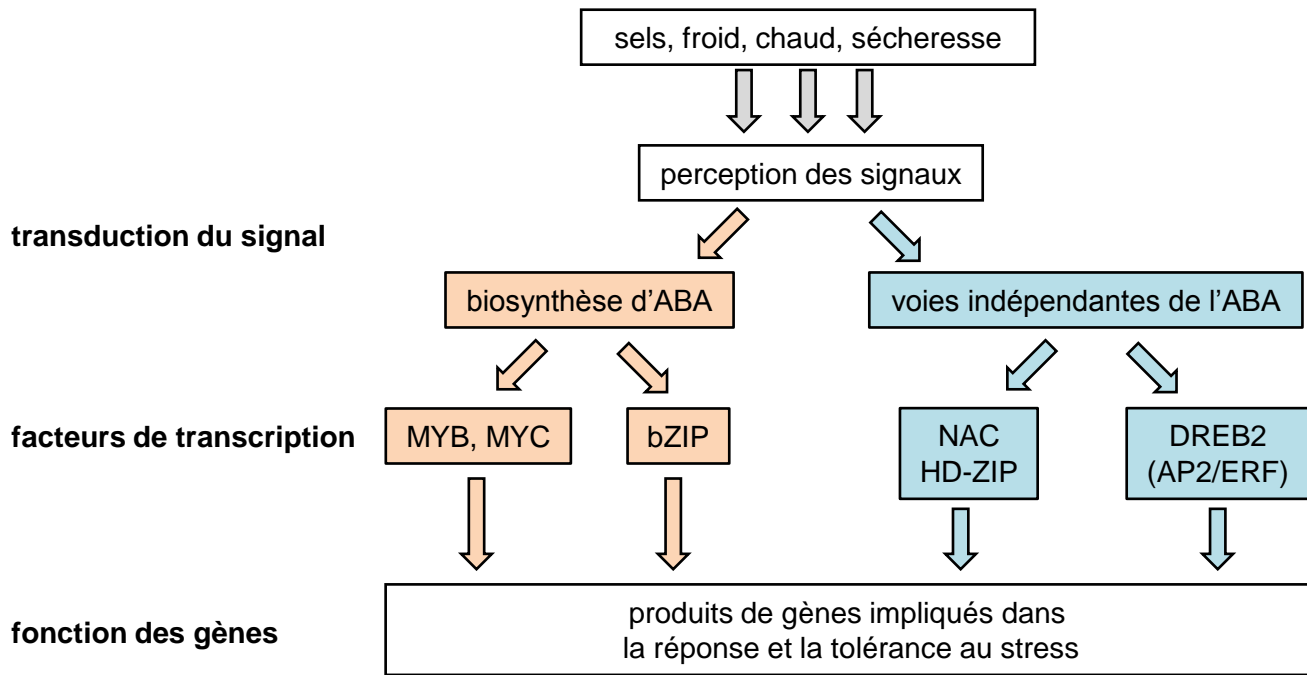


Figure I-6 : Réseaux de régulation transcriptionnelle des signaux de stress abiotiques et expression des gènes (Adapté de Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

(InsP) est également impliquée dans les réactions des plantes au stress abiotique. Les études sur le stress de sécheresse ont révélé, de façon surprenante, que les plantes exprimant l'inositol polyphosphate 5-phosphatase ont perdu moins d'eau et ont augmenté la tolérance à la sécheresse (Perera *et al.*, 2008). Dans les cellules d'*Arabidopsis*, le stress osmotique non seulement stimule initialement l'influx de Ca^{2+} et inhibe son efflux mais, en même temps, favorise une grande accumulation de H_2O_2 dans le milieu extérieur, ce qui est représentatif de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Il a été montré qu'il existe une corrélation étroite entre le pH cytosolique et H_2O_2 formé *via* les H^+ -ATPases membranaires (Beffagna *et al.*, 2005). En outre, les flux de Ca^{2+} induits par le stress osmotique sont liés à l'acide abscissique (ABA) (Diedhiou *et al.* 2008). En effet, l'ABA peut induire la libération de Ca^{2+} . Ce dernier peut à la fois activer des récepteurs Ca^{2+} -dépendants et jouer un rôle dans la transduction du signal.

- 3) Des augmentations transitoires de Ca^{2+} cytosolique sont perçues par les différentes cascades de phosphorylations : CDPK (Ca^{2+} -dependent protein kinases) (Sheen, 1996), MAPK (mitogen activated protein kinase) (Rodriguez *et al.*, 2010), protéines phosphatases, etc.
- 4) Ces protéines kinases par la suite induisent l'expression des facteurs de transcriptions tels que : EREBP (Ethylene-Responsive Element Binding Proteins) (Riechmann et Meyerowitz, 1998), EREBP/AP2 (Liu *et al.*, 1998), bZIP (basic leucine zipper) (Jakoby *et al.*, 2002), MYB (Abe *et al.*, 1997). Ce sont les éléments clés qui contrôlent et modulent les voies d'adaptation de stress abiotique chez la plante (Golldack *et al.*, 2011). Il a été montré que ces facteurs de transcription se divisent en deux catégories, un groupe impliqué dans la voie dépendante de l'ABA (MYB, MYC, bZIP) et l'autre impliqué dans la voie indépendante de l'ABA (AP2/ERF) (Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 2007) (Figure I-6).
- 5) Les facteurs de transcription à leur tour activent l'expression des gènes de réponse au stress tels que les gènes codant des LEA-like, antioxydants, synthèse d'osmolytes, enzymes, transporteurs, etc... qui vont conduire à la mise en place des mécanismes de tolérance au stress.

I.2.2. Stress ionique

Le stress ionique se développe au fil du temps et est dû à une combinaison de l'accumulation d'ions dans la partie aérienne et une incapacité à tolérer les ions qui se sont accumulés dans les tissus végétaux (Munns et Tester, 2008). Le stress ionique est spécifique du stress salin. Il a moins d'effet par rapport au stress osmotique, en particulier à faible concentration en sel. Il accélère la sénescence et la maturité des feuilles.

Dans le cas du stress salin causé par NaCl, il est dû à la toxicité des ions Na^+ et Cl^- accumulés en excès dans la plante qui perturbe l'homéostasie des ions cytosoliques de l'organisme et affecte l'activité de certaines enzymes. Durant le stress salin pour la plupart des espèces, Na^+ atteint une concentration toxique avant Cl^- . Le niveau de toxicité du Na^+ n'a pas été analysé en détail mais il est probable qu'il dépende du type de cellules (Munns et Tester, 2008). La plupart des études se sont concentrées sur la régulation de l'homéostasie du Na^+ . Quand il atteint le seuil de la concentration toxique dans les racines, Na^+ entre dans le flux de transpiration. La concentration de Na^+ dans les parties aériennes est supérieure à celle de la racine en raison du haut influx à partir de la racine et de la faible quantité Na^+ recircularisée au travers du phloème vers la racine (Tester et Davenport, 2003). Pour certaines espèces, telles que le soja, les agrumes, et la vigne, Cl^- est considéré comme l'ion le plus toxique dû à sa vitesse d'accumulation (Munns et Tester, 2008). Cl^- peut être toxique pour les plantes à des concentrations élevées, en général avec une toxicité critique estimée à 4 - 7 mg. g⁻¹ et de 15 - 50 mg. g⁻¹ de poids sec pour les espèces sensibles et les espèces tolérantes respectivement (Xu *et al.*, 2000).

I.2.2.1. La toxicité causée par Na^+ et Cl^-

a) Cas du Na^+

Une cause importante d'endommagement qui perturbe la synthèse des protéines est le haut niveau de concentration de Na^+ . Cet ion peut dérégler les processus métaboliques en entrant en compétition avec K^+ pour sa fixation sur des enzymes et des protéines importantes. Plus de 50 enzymes sont activées par K^+ mais Na^+ ne peut pas assurer la même fonction. Par ailleurs, K^+ est vital pour la synthèse de certaines protéines, pour l'osmorégulation, pour le maintien de la turgescence des cellules, pour la stimulation de la photosynthèse, la fixation des ARNt aux ribosomes ou encore la régulation de la voie d'assimilation de l'azote (Tester et Davenport, 2003).

En situation d'excès de Na^+ , la plante peut entraîner une déficience nutritionnelle en limitant l'absorption et l'accumulation d'autres éléments nutritifs comme K^+ , Ca^{2+} ou Mn^{2+} . Entre autres, il a été montré que Na^+ interfère avec des transporteurs localisés sur la membrane plasmique des cellules racinaires, par exemple les canaux sélectifs de K^+ (Rubio *et al.*, 1995 ; Chen *et al.*, 2007 ; Horie *et al.*, 2011) ou inhibe le développement de la racine par effet néfaste sur la structure du sol (Tester et Davenport, 2003).

b) Cas du Cl^-

Le chlore est un micronutriment essentiel pour les plantes supérieures. Il est surtout présent sous forme d'anion Cl^- . Le chlorure est un soluté majeur dans la vacuole et est impliqué à la fois dans la turgescence, l'osmorégulation cellulaire et le fonctionnement du PSII en tant que cofacteur essentiel (Kawakami *et al.*, 2009). Dans le cytoplasme, le chlorure peut réguler les activités d'enzymes clés. En outre, Cl^- agit également comme contre anion, et est impliqué dans la stabilisation du potentiel de membrane, la régulation des gradients de pH intracellulaire (Xu *et al.*, 2000 ; White et Broadley, 2001) ; Teakle et Tyerman, 2010). Cl^- devient toxique pour les plantes en cas d'accumulation à des concentrations élevées dans le cytoplasme entraînant des déséquilibres de charge électrique cellulaire (Teakle et Tyerman, 2010).

I.2.2.2. Stratégies d'adaptation au stress ionique Na^+ dans le contexte de la plante entière

Il existe deux aspects principaux de la tolérance de la plante au stress ionique Na^+ , c'est l'exclusion ionique et la tolérance des tissus végétaux (Munns et Tester, 2008). Pour répondre au stress salin dont le stress ionique causé par Na^+ , la plante doit contrôler l'entrée de Na^+ dans la racine ainsi que la translocation de cet ion de la racine aux feuilles. Le site principal de la toxicité de Na^+ pour la plupart des plantes est le limbe de la feuille, où Na^+ s'accumule (Munns, 2002). Afin de détoxifier les cellules du mésophylle, la plante doit posséder des mécanismes pour séquestrer Na^+ dans la vacuole ou l'excréter en dehors des feuilles.

a) Contrôle de l'entrée de Na^+ dans les cellules épidermiques et corticales des racines

À ce jour, aucun canal sélectif pour Na^+ n'a été cloné chez la plante. Par contre, il a été montré que l'influx de Na^+ dans les racines peut être régulé par Ca^{2+} . L'ajout de Ca^{2+} à

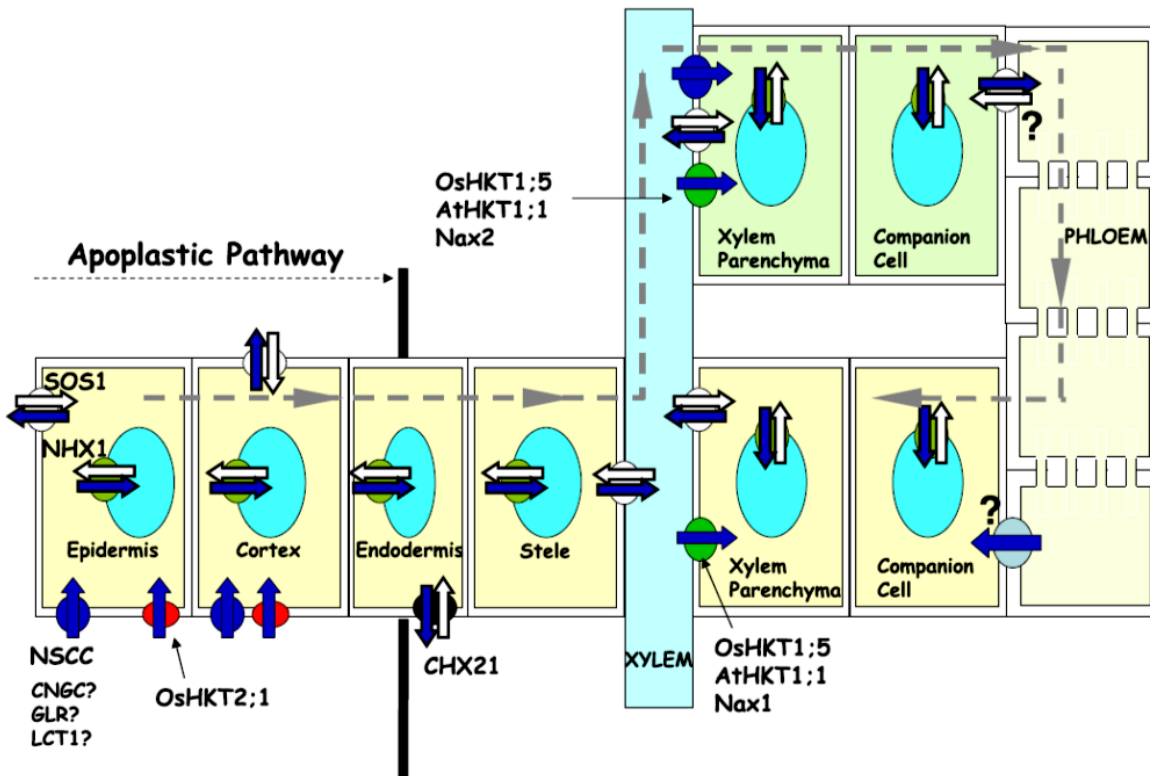


Figure I-7 : Schéma montrant le transport radial et le mouvement longitudinal d'ions Na⁺ à partir du sol dans la racine, dans le xylème, et la recirculation au travers du phloème. Le transport du Na⁺ est représenté par les flèches bleues. Na⁺ entre dans le cytosol des cellules racinaires *via* NSCC et HKT (y compris OsHKT2;1). La faible concentration de Na⁺ cytosolique est maintenue par SOS1 et NHX1. CHX21 contribue au mouvement de Na⁺ à partir des cellules endodermiques vers l'apoplaste de la stèle. Dans la stèle, Na⁺ est chargé dans le xylème par SOS1 et déchargé du xylème par HKT1;1 ; HKT1;5 ou HKT1;4 (= Nax1 chez le blé). Dans les feuilles, Na⁺ peut être déchargé par HKT1;5 ; HKT1;1 et HKT1;5 (= Nax2 chez le blé) ou encore les canaux NSCC. La concentration de Na⁺ cytosolique des cellules foliaires est régulée par SOS1 et NHX1. Les mécanismes de chargement et de déchargement du phloème (flèche grise) et la recirculation de Na⁺ *via* le phloème restent à déterminer (Adapté d'Apse et Blumwald, 2007 ; Cotsaftis *et al.*, 2012).

la solution externe peut réduire les effets toxiques de Na^+ en raison de l'inhibition de l'influx unidirectionnelle de Na^+ par Ca^{2+} (Cramer, 2002). L'influx de Na^+ sensible au Ca^{2+} se produit au travers des canaux cationiques non sélectifs (NSCCs - Non Selective Cation Channels) (Demidchik et Maathuis, 2007), des canaux nucléotides cycliques-dépendants (CNGCs) (Kaplan *et al.*, 2007) ou des récepteurs au glutamate (GLRs) (Davenport, 2002) (Figure I-7). Chez le riz, il a été montré que l'expression d'*OsCNGC1* était réprimé en réponse au stress salin chez un cultivar tolérant au sel par rapport à un cultivar sensible, ce qui conduit à une restriction de l'influx de Na^+ dans les racines observé chez le cultivar tolérant au sel (Senadheera *et al.*, 2009). Chez Arabidopsis, *AtGLR3;7* est responsable de l'influx de Na^+ quand il est exprimé dans des ovocytes de *Xenopus laevis* (Roy *et al.*, 2008). Egalement, dans l'étude de Tapken et Hollmann (2008), il a été montré qu'*AtGLR1,1* et *AtGLR1,4* peuvent prendre en charge le transport de Na^+ au travers de la membrane plasmique. Il a été montré que chez le blé, la protéine TaLCT1 (pour Low-affinity Cation Transporter 1) transporte Na^+ quand elle est exprimée en système hétérologue chez les levures (Schachtman *et al.*, 1997 ; Amtmann *et al.*, 2001) et, diminue le ratio $\text{K}^+ : \text{Na}^+$ intracellulaire (Amtmann *et al.*, 2001). L'activité du transport de Na^+ de cette protéine est sensible à la fois au K^+ et Ca^{2+} (Kronzucker et Britto, 2011).

Comme l'inhibition de l'influx de Na^+ par Ca^{2+} n'est pas complète, une partie de l'influx de Na^+ est insensible au Ca^{2+} et se produit probablement par le biais des canaux cationiques non sélectifs (Davenport et Tester, 2000). Plusieurs autres transporteurs pourraient potentiellement servir de médiateur à cet influx, y compris ceux codés par la famille de gènes *HKT* (pour High-affinity K^+ Transporter) (Platten *et al.*, 2006 ; Kronzucker et Britto, 2011). Entre autres, il a été montré que, chez le riz, *OsHKT2;1* est exprimé dans les cellules de l'exoderme, du rhizoderme et du cortex et, est capable de transporter le Na^+ dans les ovocytes de xénope (Jabnourne *et al.*, 2009) (Figure I-7). Mian et collaborateurs (2011) ont montré que, chez l'orge, le transporteur *HKT2;1*, prédominant dans le cortex racinaire, permet l'entrée du K^+ et Na^+ . La surexpression de *HKT2;1* augmente l'absorption de Na^+ , augmente la concentration de Na^+ dans la sève du xylème, et renforce la translocation du Na^+ vers la partie aérienne lorsque les plantes se développent sur 50 ou 100 mM NaCl. Cela fait penser que la capacité de translocation de Na^+ à la partie aérienne serait plus importante que l'accumulation ou la compartimentation de ce cation dans les tissus foliaires (Mian *et al.*, 2011).

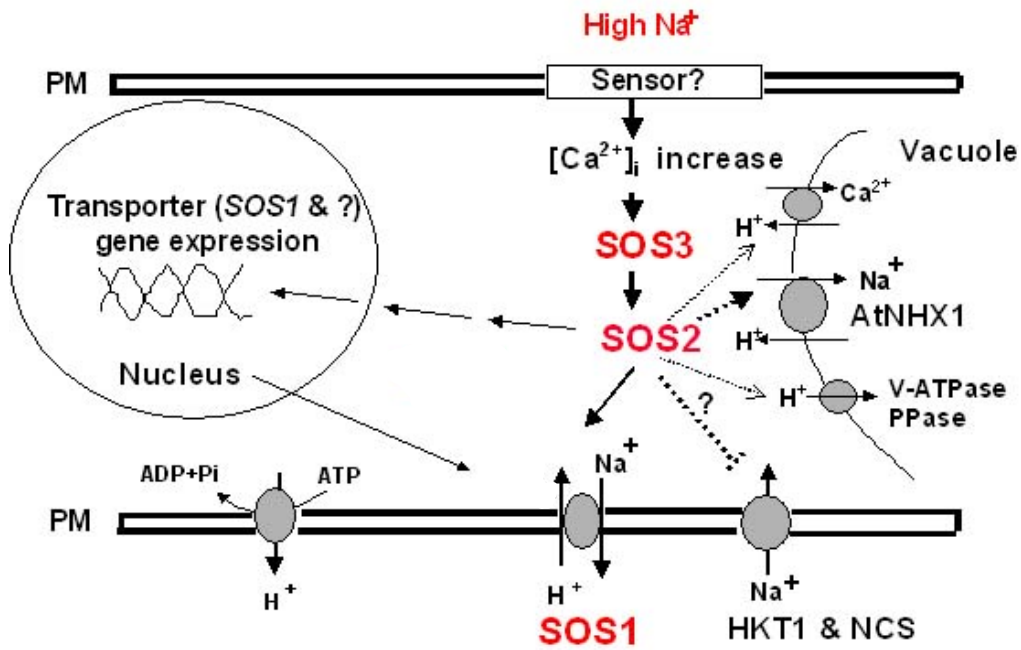


Figure I-8 : Régulation de la concentration de Na⁺ par la voie de SOS. La haute concentration de Na⁺ déclenche un signal de calcium qui stimule le complexe de protéines kinases SOS3-SOS2. Celui-ci active alors l'activité de la pompe d'échange Na⁺ / H⁺ de SOS1 et régule l'expression de certains gènes sensibles au sel. En outre, le complexe SOS3-SOS2 peut activer ou réprimer les activités des autres transporteurs impliqués dans l'homéostasie du Na⁺ (D'après Zhu, 2003).

b) Efflux de Na⁺ de la racine et échange de Na⁺ au niveau du xylème par SOS1

Afin de maintenir une faible concentration de Na⁺ dans la racine, la plante peut augmenter l'entrée de Na⁺ dans le xylème ou activer l'efflux de Na⁺ à partir des cellules racinaires vers le milieu extérieur (Tester et Davenport, 2003). Shi et collaborateurs (2002) ont montré la présence chez *Arabidopsis* d'une protéine AtSOS1, un anti-porteur Na⁺ / H⁺ sur la membrane plasmique, localisée dans les cellules épidermiques à l'extrémité de la racine et dans les cellules du parenchyme à la limite du xylème des racines, des tiges et des feuilles (Figure I-7). Sous stress salin à 25 mM de NaCl, les plantes mutantes *atsos1* accumulent moins de Na⁺ dans la feuille par rapport aux plantes sauvages. Toutefois, en réponse au stress salin sévère (100 mM de NaCl), les mutants *atsos1* accumulent plus de Na⁺, comparé au sauvage. Une plus grande quantité de Na⁺ est également présente dans la sève du xylème chez les plantes mutantes *atsos1* lorsqu'elles sont exposées à 100 mM de NaCl. Ces résultats suggèrent qu'*AtSOS1* est essentiel pour contrôler le transport de Na⁺ à longue distance de la racine à la tige. Shi et collaborateurs (2002) proposent qu'*AtSOS1* puisse jouer un rôle dans la récupération du Na⁺ à partir du xylème sous stress salin sévère, alors que, dans le cas de stress salin modéré, cette protéine pourrait fonctionner dans le chargement du Na⁺ dans le xylème.

La régulation de SOS1 par la voie SOS (Salt Overly Sensitive) a été établie (Shi *et al.*, 2000 ; Zhu, 2002) (Figure I-8). La concentration élevée en Na⁺ est perçue par un senseur membranaire de nature inconnue et provoque un changement de concentration en Ca²⁺ dans le cytosol. La protéine SOS3 codant une protéine myristoylée de liaison au Ca²⁺ est alors activée et se lie à SOS2, une Ser/Thr protéine kinase (Halfter *et al.*, 2000 ; Ishitani *et al.*, 2000). Cette interaction est à l'origine de la régulation de l'expression de *SOS1* et de l'activation de SOS1 par phosphorylation (Quintero *et al.*, 2002 ; Qiu *et al.*, 2002).

c) Contrôle de l'entrée dans le xylème et retrait de la sève du xylème de Na⁺ par les protéines HKT

Les transporteurs HKT ont été identifiés initialement chez les plantes par complémentarité fonctionnelle d'un mutant de levure déficient pour le transport du K⁺ (Schachtman et Schroeder, 1994). Les travaux qui ont suivi ont montré que les protéines HKT sont également perméables au Na⁺ (Corratge-Faillie *et al.*, 2010).

AtHKT1;1 chez *Arabidopsis* est un transporteur situé sur la membrane plasmique sélectif pour Na^+ dont la conductance n'est pas affectée par la présence de K^+ (Uozumi *et al.*, 2000). Il a été montré qu'AtHKT1;1 est exprimé dans les cellules de la stèle des racines et des tissus vasculaires des feuilles (Maser *et al.*, 2002 ; Berthomieu *et al.*, 2003 ; Sunarpi *et al.*, 2005). Le mutant nul hypersensible au NaCl accumule, par rapport au sauvage, Na^+ dans les parties aériennes alors que les concentrations sont diminuées dans les racines (Maser *et al.*, 2002 ; Berthomieu *et al.*, 2003 ; Gong *et al.*, 2004 ; Rus *et al.*, 2004 ; Davenport *et al.*, 2007). AtHKT1;1 est donc essentiel pour la distribution du Na^+ entre les racines et les feuilles en enlevant cet ion du flux de transpiration (Figure I-7). Son expression ectopique dans la stèle ou dans les cellules du rhizoderme ou du cortex conduit à une augmentation de la tolérance au sel chez *Arabidopsis* et le riz (Moller *et al.*, 2009 ; Plett *et al.*, 2010). Des travaux chez d'autres espèces, notamment le riz et le blé, ont montré que certains HKT seulement perméables au Na^+ jouent le même rôle que AtHKT1;1. HKT1;4 et HKT1;5 sont responsables de l'exclusion du Na^+ à partir du xylème au niveau des parties aériennes et des racines respectivement (Ren *et al.*, 2005 ; Byrt *et al.*, 2007 ; James *et al.*, 2006 ; Huang *et al.*, 2006) (Figure I-7).

d) Accumulation de Na^+ dans la vacuole

Au niveau de la cellule foliaire et racinaire, la manière la plus efficace pour maintenir la faible concentration de Na^+ cytosolique est de séquestrer ce dernier dans la vacuole de chaque cellule pour maintenir le potentiel osmotique entre la vacuole et le cytoplasme : les osmolytes solubles doivent être accumulés dans le cytoplasme de telle sorte que ceux-ci ne perturbent pas les processus biochimiques cellulaires. L'entrée du Na^+ est prise en charge par les protéines anti-porteurs Na^+ / H^+ tonoplastique de la famille NHX (pour Sodium-Proton Exchanger) (Jiang *et al.*, 2010). La surexpression de NHX1 augmente la tolérance à la salinité chez *Arabidopsis* (Apse *et al.*, 1999), chez la tomate (Zhang et Blumwald, 2001) ou chez *Brassica napus* (Zhang *et al.*, 2001).

e) Accumulation de Na^+ dans la plante entière

Au niveau de la plante entière, la protection des jeunes feuilles et des jeunes racines est cruciale et nécessaire pour la tolérance au stress salin. En effet, les cellules des tissus juvéniles contiennent des petites vacuoles qui sont inadaptées pour la compartimentation ; leurs processus métaboliques sont très sensibles à la présence de Na^+ (Tester et Davenport,

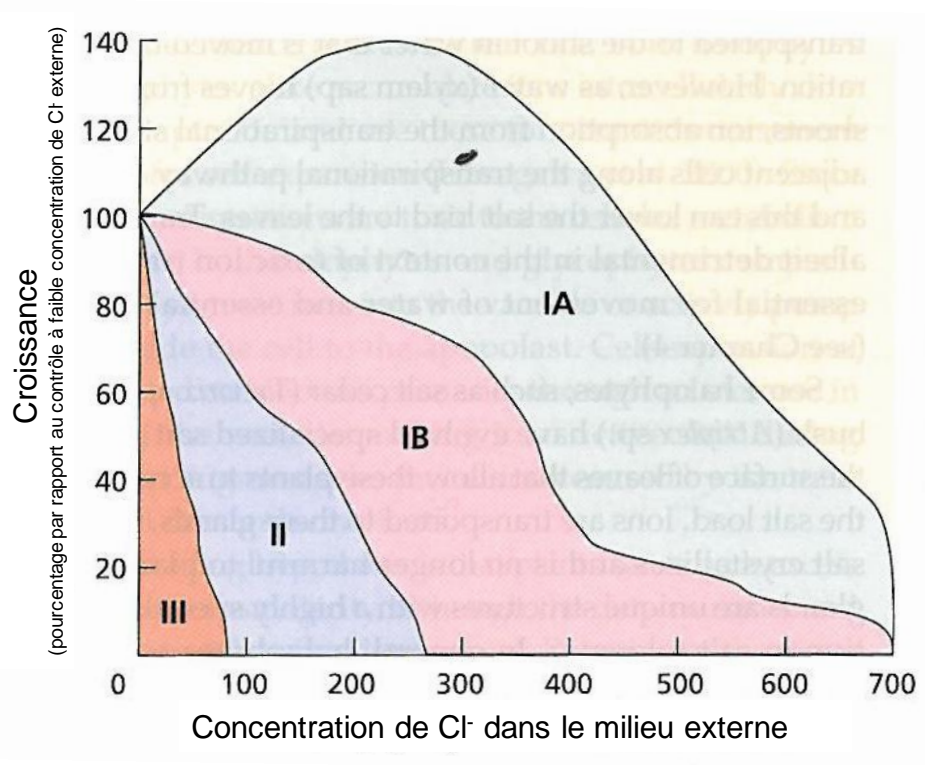


Figure I-9 : Division des groupes de plantes selon leur croissance à une haute concentration de Cl⁻ dans le milieu extérieur (D'après Greenway et Munns, 1980).

2003). Tester et Davenport (2003) ont également montré que pour maintenir la faible concentration du Na^+ dans les tissus juvéniles, les plantes doivent maintenir une faible vitesse de transpiration chez les jeunes feuilles ou accumuler préférentiellement du Na^+ dans les parties aériennes spécifiques (ex. vieilles feuilles). Il a été montré que chez le soja, ^{32}P peut circuler librement à travers des tissus juvéniles tandis que ^{22}Na ne peut pas entrer dans les parties jeunes des racines et des feuilles (Marschner, 1995).

f) Excrétion de Na^+ sur la surface foliaire

Les plantes ne retiennent qu'environ 2% de l'eau qu'elles transpirent, c'est à dire qu'elles prennent environ 50 fois plus d'eau dans le sol que ce qu'elles conservent dans leurs tissus aériens (Munns *et al.*, 2006). Soluble dans l'eau, Na^+ entre dans la plante et cause des effets toxique en forte concentration. En conséquence, l'exclusion des ions Na^+ des limbes est très importante. Chez certaines plantes halophytes, il existe des structures spécifiques qui contribuent à la tolérance au stress salin telles que les glandes excrétrices de sel. L'excrétion de sel semble être un phénomène sélectif permettant aux plantes de protéger les tissus contre les toxicités ioniques, sans pour autant perdre les éléments nutritifs indispensables. Barhoumi et collaborateurs (2007) ont montré que, chez le dactyle des grèves (*Aeluropus litoralis* - plante grasse de la famille des Poaceae), Na^+ est excrété par ces glandes spéciales, qui sont dispersées sur les deux faces des feuilles, alors que K^+ , Ca^{2+} et Mg^{2+} sont retenus. Chez les dactyles des grèves cultivées sous forte salinité (200 - 800 mM NaCl), l'excrétion de sel, qui est reconnaissable par des dépôts de cristaux de sel sur la surface des feuilles, a été observée au microscope. Ces cristaux sont absents chez les plantes témoins et leur densité augmente avec l'augmentation de la salinité.

I.2.2.3. Stratégies d'adaptation au stress ionique Cl^- dans le contexte de la plante entière

Les plantes, selon leurs réponses de croissance à une haute concentration de Cl^- dans le milieu extérieur, peuvent être divisées en trois catégories (Figure I-9) (Greenway et Munns, 1980). Le groupe I comprend les halophytes qui peuvent être subdivisées en I-A des espèces dont la croissance est stimulée par Cl^- (par exemple *Sueda maritima*, *Atriplex nummularia*) ou I-B des espèces dont la croissance est peu affectée par 200 mM Cl^- externe (par exemple *Atriplex hastata*, *Spartina* spp., la betterave à sucre.); Le groupe II comprend les halophytes et les glycophytes dont leur croissance est sensiblement réduite

par 100 mM Cl⁻ externe, qui peuvent être subdivisés en tolérants (par exemple *Festuca rubris*, *Puccinella peisonis*, le coton, l'orge), intermédiaires (par exemple les tomates) et sensibles (par exemple les haricots, soja). Le groupe III comprend des plantes qui sont très sensibles au Cl⁻ (par exemple les agrumes) (White et Broadley, 2001).

La plante possède des mécanismes de détoxification de Cl⁻ qui sont identiques à ceux du Na⁺, mais ces mécanismes physiologiques ont été beaucoup moins étudiés à ce jour. Pour ce qui concerne les données moléculaires dans l'homéostasie de chlorure, il a été montré que plusieurs transporteurs / canaux sont impliqués dans ce processus de manière directe ou indirecte.

a) Réduction d'absorption de Cl⁻ par les racines

Il y a peu d'études électrophysiologiques sur des canaux anioniques dans les racines, en particulier dans le contexte du transport de Cl⁻ en réponse au stress salin. Il a été montré que le contrôle de l'absorption initiale de Cl⁻ à l'interface sol - racine peut limiter la quantité totale de cet ion entrant dans la racine et par la suite transporté vers la partie aérienne de la plante (Teakle et Tyerman, 2010). Pour la plupart des espèces végétales, la limitation d'absorption de chlorure par les racines contribue à la tolérance aux concentrations de sel élevées. Chez plusieurs espèces, le sel induit l'efflux de Cl⁻. Par exemple, chez l'orge, l'utilisation de ³⁸Cl et ³⁹Cl comme radio-traceurs a montré que l'efflux de Cl⁻ au milieu extérieur atteint 90% de l'influx à 100 mM de Cl⁻ externe (Britto *et al.*, 2004). Chez *Arabidopsis*, il a été montré que l'influx d'anions Cl⁻ est passif sous stress salin. Cependant, l'influx du chlorure est limité en présence des cations divalents tels que Mg²⁺ et Ca²⁺ (Lorenzen *et al.*, 2004). Entre autres, il a été montré qu'un co-transporteur cation-chlorure (CCCs pour Cation-Chloride Co-transporters) qui transporte Cl⁻ à la fois avec K⁺ et Na⁺ semble jouer un rôle important dans l'absorption du Cl⁻ par les racines. Ce gène s'exprime principalement dans le parenchyme xylémien, cela suggère que ce transporteur peut également retirer Cl⁻ à partir du xylème (Colmenero-Flores *et al.*, 2007).

b) Contrôle du chargement de Cl⁻ dans le xylème

Malgré l'importance du transport d'ion dans le xylème pour la régulation des concentrations en ions dans la partie aérienne sous stress salin et la nutrition des plantes en général, des mesures précises des ions (y compris les Cl⁻) dans le xylème ont rarement été faites (Teakle et Tyerman, 2010). C'est probablement parce que la collecte de la sève du

xylème des plantes intactes est difficile. Dans l'une des rares études de mesure de la concentration de Cl^- dans le xylème dans la plante intacte sous stress salin, Teakle et collaborateurs (2007) ont constaté que, en condition de stress salin, *Lotus corniculatus* sensible au sel contient deux fois de plus de Cl^- par rapport à l'espèce tolérante *L. tenuis*. De même, les mesures à l'aide de micro-analyse aux rayons X chez le blé, en présence de 50 mM de NaCl après 10 jours, ont montré que la concentration de Cl^- dans le xylème d'une lignée tolérante au sel est seulement de 8 mM, tandis que celle d'une lignée sensible est de 21 mM (Lauchli *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent qu'un des facteurs qui réduit la tolérance au sel est la réduction du chargement du xylème en Cl^- .

Il a été montré que des canaux observés dans les protoplastes d'*Arabidopsis*, dérivés de cellules épidermiques de la racine, sont les canaux anioniques activés par la dépolarisation et impliqués dans l'efflux des anions. Ces canaux sont perméables à SO_4^{2-} , ainsi qu'au NO_3^- et Cl^- (Frachisse *et al.*, 1999 ; Diatloff *et al.*, 2004 ; Diatloff *et al.*, 2010). Plusieurs études utilisant la technique de « patch-clamp » menées sur des protoplastes isolés à partir de cellules de la stèle révèle la présence de différentes familles de protéines impliquées dans le passage d'anions dont le chlorure. La famille X-IRAC (pour Inwardly Rectifying Anion Channel) semble perméable à NO_3^- et Cl^- (Kohler et Raschke, 2000). Il a été montré que le contrôle du transport de Cl^- vers la partie aérienne dans des conditions salines peut être le résultat d'une charge réduite de Cl^- *via* X-QUAC (pour Quickly Activating Anion Conductance), une famille de protéines de conductance d'anions activées rapidement (Kohler et Raschke, 2000 ; Kohler *et al.*, 2002). Cependant, bien que caractérisés par électrophysiologie, tous ces canaux n'ont pas encore été identifiés moléculairement.

c) Excrétion de Cl^- sur la surface foliaire

Le chlorure peut être accumulé dans les glandes excrétrices de sel sur la surface des feuilles pour abaisser sa concentration. Ce sont des structures cellulaires hautement spécialisées et uniques pour certaines plantes halophytes. Jeschke et collaborateurs (1995) ont montré que la sécrétion de Cl^- *via* ces glandes excrétrices de sel représente environ 20% de Cl^- foliaire chez *Leptochloa fusca* (herbe de la famille des Poacées) à 100 mM de NaCl. Chez *Arabidopsis*, il a été montré que la protéine co-transporteur cation - chlorure AtCCC (pour Cation-Chloride Cotransporter), ayant probablement un rôle dans le transport de Cl^- à longue distance, est localisé dans les trichomes et les hydathodes (Colmenero-

Flores *et al.*, 2007). Il serait intéressant d'étudier si les CCCs sont également localisés dans les glandes excrétrices de sel pour probablement excréter de Cl^- (et/ou Na^+) à partir des feuilles (Teakle et Tyerman, 2010).

d) Accumulation de Cl^- dans la plante

Il a été montré que le chlorure s'accumule dans la plupart des tissus foliaires, en particulier dans les cellules épidermiques adaxiales. La quantité de chlorure est beaucoup plus élevée chez les cellules foliaires que chez d'autres types cellulaires. Il est intéressant de remarquer que la concentration de Cl^- dans les cellules du mésophylle où se déroule la plus grande partie de la photosynthèse, cependant, reste faible. Une étude menée chez un cultivar d'orge tolérant au sel et un cultivar du blé sensible a montré que Cl^- s'accumule préférentiellement dans les cellules de l'épiderme par rapport à celles du mésophylle chez ces deux cultivars. Donc, la forte accumulation de Cl^- dans l'épiderme ne contribue pas de manière directe à la tolérance au sel (James *et al.*, 2006).

Sasaki *et al.* (2004) a isolé un gène codant un transporteur de malate activé par Al^{3+} , TaALMT1 (pour Al^{3+} -activated Malate Transporter), chez le blé. Ensuite, l'expression hétérologue de TaALMT1 dans des ovocytes de *Xenopus* et des cellules de tabac en culture a montré que cette protéine transporte les anions (Pineros *et al.*, 2008). Il serait intéressant d'examiner l'accumulation de Cl^- chez des variétés de blé tolérant à l'aluminium en condition de salinité, parce que si TaALMT1 est partiellement active sans aluminium, elle peut contribuer à l'influx de Cl^- à travers la membrane plasmique (Teakle et Tyerman, 2010). Une nouvelle famille de canaux/transporteurs d'anions de type l'activation lente S-Type, SLAC1 (pour Slow Anion Channel-associated 1) a été découverte dans les cellules de garde chez *Arabidopsis* (Negi *et al.*, 2008 ; Vahisalu *et al.*, 2008). L'étude sur des protoplastes isolés à partir de cellules de garde a montré que non seulement l'accumulation de malate et fumarate, mais également de Cl^- et K^+ , chez le mutant *atslac1* a augmenté par rapport au sauvage, ce qui correspond à un déficit de la libération d'anions à partir des cellules de garde (Vahisalu *et al.*, 2008).

Chez la plante, la faible concentration de Cl^- dans la partie aérienne n'est pas toujours corrélée à la tolérance au sel. Dans un genre, et même au sein d'une espèce, il y a des génotypes qui peuvent tolérer des concentrations de Cl^- élevées et/ou des génotypes qui possèdent la capacité d'excréter le Cl^- (Teakle et Tyerman, 2010). Cependant, la tolérance

au sel serait améliorée par la séquestration de Cl^- dans les vacuoles pour empêcher son accumulation à des niveaux toxiques dans le cytoplasme. Dans une recherche classique de Hajibagheri et Flowers (1989), il a été montré que dans les cellules corticales des racines de la plante halophyte *Suaeda maritima* se développant sur 200 mM de NaCl, les concentrations de Cl^- varient de 430 à 465 mM dans la vacuole, de 86 à 95 mM dans le cytoplasme, et de 111 à 130 mM dans la paroi cellulaire. Chez la vigne, un génotype tolérant au sel possède une faible concentration de Cl^- foliaire, mais sa concentration de Cl^- racinaire est plus forte par rapport au génotype sensible (Storey *et al.*, 2003). Ceci suggère une compartimentation plus efficace de Cl^- dans les vacuoles des cellules racinaires chez le génotype tolérant. Chez l'avocat, il a été montré que la forte concentration de Cl^- foliaire est également associée à la tolérance au sel (Xu *et al.*, 2000).

Chez *Arabidopsis*, une étude récente sur une protéine CLC (« ChLoride Channel »), AtCLCc, a suggéré que cette protéine serait responsable de l'entrée du Cl^- dans la vacuole et à l'origine de la détoxification du cytoplasme lors d'un stress salin (Jossier *et al.*, 2010).

Ainsi, parmi les facteurs qui jouent des rôles importants dans la tolérance au stress salin chez la plante, notamment dans l'homéostasie de chlorure où les recherches scientifiques restent modestes, les canaux de chlorure CLCs, qui seront abordés dans la partie suivante, peuvent être de bons candidats pour étudier les mécanismes de transport / stockage du Cl^- au sein de la plante.

Nom	Localisation subcellulaire	Fonction	Références
CLC-0	Membrane plasmique	Canal Cl ⁻	Miller, 1982 ; Miller et White, 1984 ; Accardi et Miller, 2004 ; Chen et Hwang, 2008 ; Lisal et Maduke, 2008 ; Zifarelli et Pusch, 2010 ; Middleton <i>et al.</i> , 1994 ; Ludewig <i>et al.</i> , 1996 ; Jentsch <i>et al.</i> , 1990, 2002 ; Meyer et Dutzler, 2006
hCLC-1	Membrane plasmique	Canal Cl ⁻	Jentsch, 2008 ; Mindell, 2012 ; Pedersen <i>et al.</i> , 2004 ; Dutka <i>et al.</i> , 2008 ; Weinberger <i>et al.</i> , 2012 ; Tang et Chen, 2011
hCLC-2	Membrane plasmique	Canal Cl ⁻	Jentsch, 2008 ; Mindell, 2012
hCLC-3	Endomembrane	Echangeur Cl ⁻ / H ⁺	Jentsch, 2008
hCLC-4	Endomembrane	Inconnue	Picollo et Pusch, 2005 ; Scheel <i>et al.</i> , 2005
hCLC-5	Endomembrane	Echangeur Cl ⁻ / H ⁺	Picollo et Pusch, 2005 ; Scheel <i>et al.</i> , 2005 ; Meyer <i>et al.</i> , 2007 ; Bergsdorf <i>et al.</i> , 2009 ; Novarino <i>et al.</i> , 2010 ; Rickheit <i>et al.</i> , 2010
hCLC-6	Endomembrane	Echangeur Cl ⁻ / H ⁺	Poët <i>et al.</i> , 2006 ; Neagoe <i>et al.</i> , 2010
hCLC-7	Endomembrane	Echangeur Cl ⁻ / H ⁺	Leisle <i>et al.</i> , 2011 ; Graves <i>et al.</i> , 2008 ; Mindell, 2012 ; Weinert <i>et al.</i> , 2010
CLC-Ka	Membrane plasmique	Inconnue	Markovic et Dutzler, 2007 ; Jentsch, 2008 ; Mindell, 2012 ; Devuyst et Guggino, 2002 ; Jentsch <i>et al.</i> , 2005
CLC-Kb	Membrane plasmique	Inconnue	Jentsch, 2008 ; Mindell, 2012 ; Devuyst et Guggino, 2002 ; Jentsch <i>et al.</i> , 2005
CLC-ec1	Membrane plasmique	Transporteur Cl ⁻	Iyer <i>et al.</i> , 2002 ; Accardi et Miller, 2004 ; Accardi <i>et al.</i> , 2004 ; Dutzler <i>et al.</i> , 2002 ; Dutzler <i>et al.</i> , 2003 ; Mindell <i>et al.</i> , 2001
StCLC	Membrane plasmique	Transporteur Cl ⁻	Dutzler <i>et al.</i> , 2002 ; Dutzler <i>et al.</i> , 2003 ; Mindell <i>et al.</i> , 2001 ; Cohen et Schulten, 2004 ; Rychkov <i>et al.</i> , 1996
GEF1	Membrane plasmique ; Réseau trans-Golgien	Transporteur Cl ⁻	Huang <i>et al.</i> , 1994 ; Greene <i>et al.</i> , 1993 ; Lopez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2007 ; Schwappach <i>et al.</i> , 1998
CLC-Nt1	Mitochondrie	Inconnue	Lurin <i>et al.</i> , 2000
AtCLCa	Tonoplaste	Echangeur NO ₃ ⁻ / H ⁺	De Angeli <i>et al.</i> , 2006 ; Geelen <i>et al.</i> , 2000 ; Monachello <i>et al.</i> , 2009 ; Zifarelli et Pusch, 2010 ; Barbier-Brygoo <i>et al.</i> , 2011 ; Wege <i>et al.</i> , 2009 ; De Angeli <i>et al.</i> , 2009
AtCLCb	Tonoplaste	Echangeur NO ₃ ⁻ / H ⁺	von der Fecht-Bartenbach <i>et al.</i> , 2010
AtCLCc	Tonoplaste	Echangeur Cl ⁻ / H ⁺	Jossier <i>et al.</i> , 2010 ; Harada <i>et al.</i> , 2004 ; Lv <i>et al.</i> , 2009
AtCLCd	Golgi	Transporteur Cl ⁻	von der Fecht-Bartenbach <i>et al.</i> , 2007 ; Dettmer <i>et al.</i> , 2006 ; Zifarelli et Pusch, 2010
AtCLCe	Chloroplaste	Inconnue	Marmagne <i>et al.</i> , 2007
AtCLCf	Golgi	Inconnue	Marmagne <i>et al.</i> , 2007
AtCLCg	Tonoplaste	Inconnue	Lv <i>et al.</i> , 2009 ; Chang <i>et al.</i> , 2009

Tableau I-1 : Récapitulatif des connaissances sur les CLCs

II. La famille des CLCs

II.1. La découverte des CLCs

Les canaux chlorures (CLCs pour ChLorides Channels) font partie d'une grande famille de protéines présentes de façon ubiquitaire dans différents organismes comme les bactéries, les levures, les animaux et les plantes (Tableau I-1). Leur existence dans des espèces différentes au travers des milliards d'années d'évolution suggère que les canaux CLCs sont essentiels pour la vie (Figure I-10).

Le premier canal chlorure CLC-0 a été découvert pour la première fois par White et Miller en 1979 dans la membrane plasmique des cellules des organes électriques du poisson torpille (White et Miller, 1979). Il permet le passage du chlorure de la cellule vers le milieu extérieur, provoquant ainsi une décharge électrique. Ses fonctions ont donné le nom à la famille des CLCs. Miller et ses collègues (White et Miller, 1979 ; Miller, 1982 ; Miller et White, 1984 ; Richard et Miller, 1990), par la reconstitution des membranes des organes électriques dans des bicouches lipidiques, ont caractérisé l'activité du canal chlorure. Ensuite, CLC-0 a été cloné à partir de l'organe électrique du poisson marin *Torpedo marmorata* (Jentsch *et al.*, 1990). L'expression de CLC-0 en ovocyte de xénopes a permis de mettre en évidence son activité de canal chlorure dépendant du voltage (Bauer *et al.*, 1991).

CLC-0 a été décrit très tôt sous la forme dimérique à 2 pores au sein d'une molécule (Miller, 1982 ; Miller et White, 1984). Par la suite, il a été montré que chaque sous-unité possède un pore indépendant qui s'homodimérise pour former une protéine fonctionnelle (Middleton *et al.*, 1994 ; Ludewig *et al.*, 1996). Ainsi, CLC-0 est utilisé comme modèle, car d'une part, ce canal possède une conductance assez grande (~10 pS - picosiemens) et, d'autre part, la facilité avec laquelle les pores individuels (rapides) ou communs (lents) peuvent être séparés expérimentalement offre des possibilités uniques pour étudier l'ouverture du pore, la perméation et les relations structure - fonction d'un canal Cl⁻ (Jentsch *et al.*, 2002).

Depuis ces travaux pionniers, les CLCs ont été étudiés chez d'autres organismes. Pendant de nombreuses années, les scientifiques pensaient que toutes les protéines CLCs fonctionnaient comme des canaux Cl⁻, mais il est devenu clair que beaucoup d'entre eux

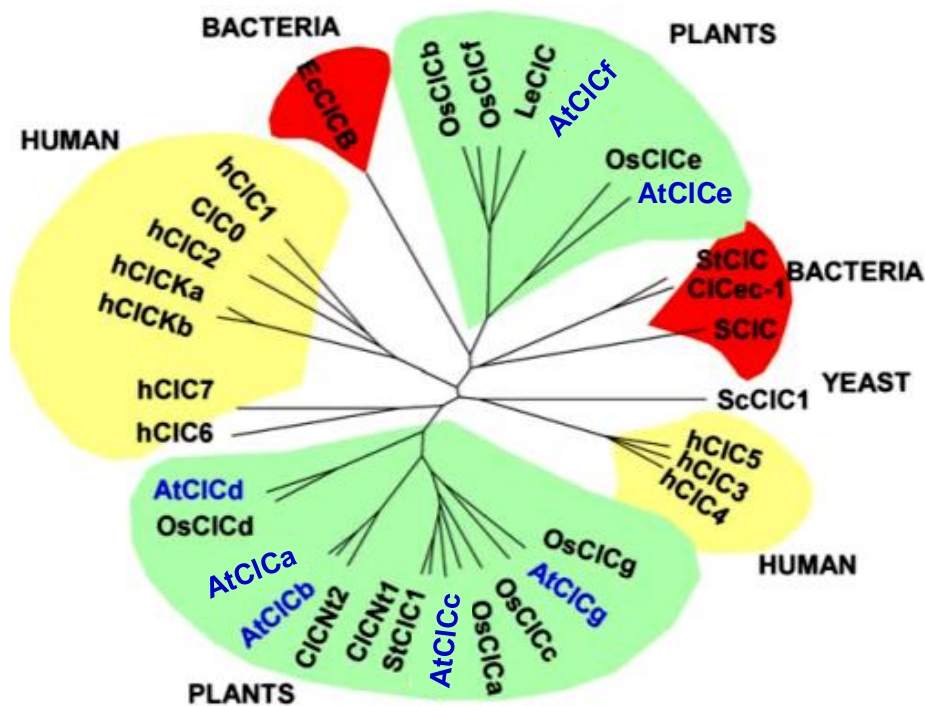


Figure I-10 : Arbre phylogénétique présentant les CLCs chez les différentes espèces. Les CLCs végétaux sont divisés en deux sous-groupes avec d'un côté constitué les CLCs relatifs aux CLCs procaryotes et de l'autre CLCs proches des CLCs eucaryotiques. Nt : *Nicotiana tabacum* ; At : *Arabidopsis thaliana* ; St : *Solanum tuberosum* ; Le : *Lycopersicon esculentum* ; Os : *Oryza sativa* ; h : humain ; Ec : *Escherichia coli* ; St : *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* ; Sc : *Saccharomyces cerevisiae* (D'après Marmagne *et al.*, 2007 et la thèse de De Angeli, 2008).

fonctionnent plutôt comme des échangeurs $2 \text{Cl}^- / 1 \text{H}^+$ électrogéniques (appelé aussi anti-porteur) comme le CLC d'*Escherichia coli* CLC-ec1 ou EcCLC (Iyer *et al.*, 2002 ; Accardi et Miller, 2004 ; Accardi *et al.*, 2004) ou les CLCs humains hCLC-4 et hCLC-5 (Picollo et Pusch, 2005 ; Scheel *et al.*, 2005). Une même famille CLC présentant des activités de canal ou de transporteur réduit ainsi la frontière entre canal et transporteur à quelques acides aminés.

II.2. Le modèle structural des CLCs

II.2.1. Les deux polypeptides antiparallèles des CLCs

L'étude des structures aux rayons X sur des cristaux de deux CLCs procaryotiques homologues, StCLC (*Salmonella enterica* serovar *typhimurium*) et CLC-ec1 (*Escherichia coli*) à 3.0 et 3.5 angström a permis de construire le modèle structural de base et la topologie des CLCs (Dutzler *et al.*, 2002 ; Dutzler *et al.*, 2003).

La structure de CLC-ec1 est essentiellement la même que celle de StCLC. Ce sont des protéines dimériques résultant de la juxtaposition de deux sous-unités (Figure I-11A) (Mindell *et al.*, 2001). Chaque sous-unité contient 18 hélices (étiqueté A - R) et présente une topologie complexe (Figure I-12A). La structure tridimensionnelle révèle un motif répété : la moitié N-terminale du polypeptide (alpha hélices B - I, vert) est structurellement liée à la moitié C-terminale (J - Q, bleu). Les deux structures similaires ont des orientations opposées dans la membrane, et créent un axe de symétrie antiparallèle. Les hélices transmembranaires à l'intérieur d'une sous-unité sont remarquablement inclinées et possèdent des longueurs variables. Les deux moitiés de la sous-unité s'enroulent autour d'un centre commun de manière à réunir les extrémités N-terminale (qui possèdent la charge positive) des hélices des segments disparates de la chaîne polypeptidique (Dutzler *et al.*, 2002). Cet arrangement des hélices a pour but de créer un environnement favorable pour la liaison électrostatique avec l'anion. Ces acides aminés chargés positivement forment le filtre de sélectivité du pore au centre de la membrane. L'existence de deux pores au sein d'une molécule CLC confirme les résultats du groupe de Miller montrant l'existence de 3 « sous-états » de conductances dans lesquelles un niveau correspond au canal fermé et deux niveaux correspondent à l'ouverture d'un seul ou des deux pores du canal (Ludewig *et al.*, 1996).

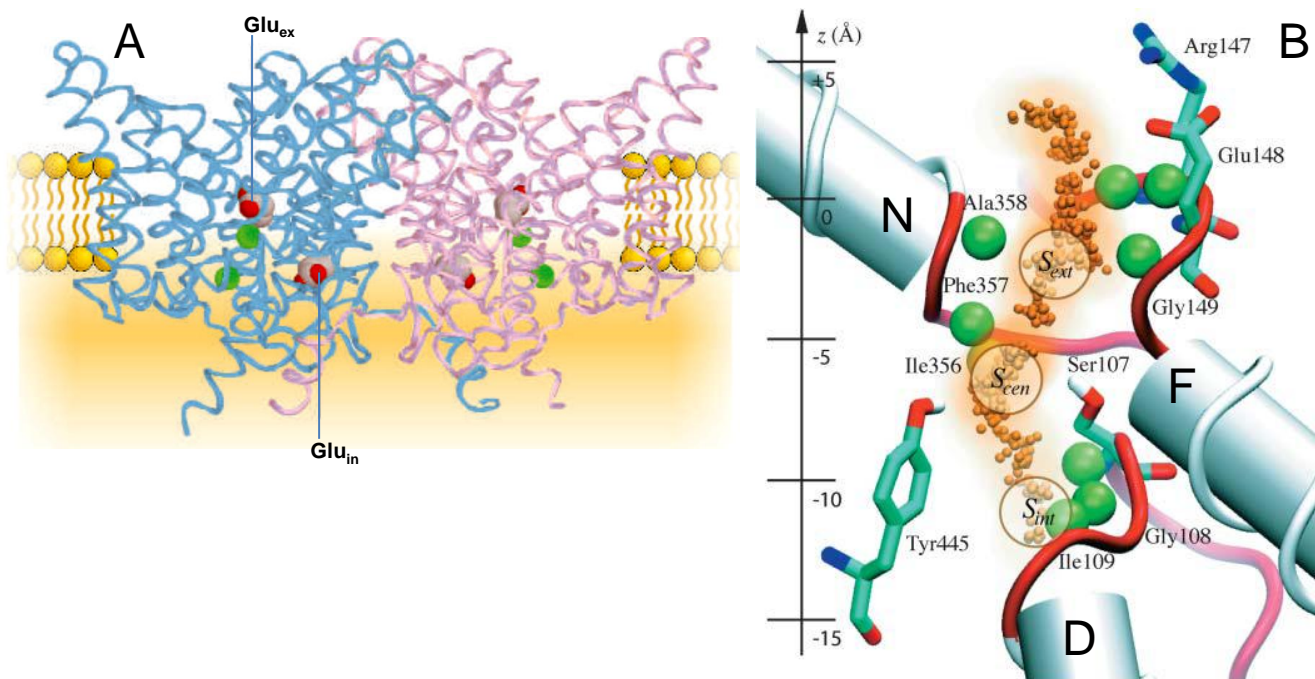


Figure I-11 : (A) La protéine CLC dimérique résulte de la juxtaposition de deux sous-unités (bleu et rouge). Les glutamates externe et interne sont représentés sous forme de sphère rouge, le chlorure est coloré en vert. (B) Structure du pore de StCLC illustrant les trois sites de liaison (en cercle), les chlorures sont sous forme des petites sphères jaunes. Les sphères vertes correspondent aux acides aminés formant le squelette du pore et stabilisant l'interaction entre les anions et les acides aminés. Le Glu_{in} (E203) ne fait pas partie du pore et donc n'est pas illustré dans cette figure (D'après Miller, 2006 ; Cohen et Schulten, 2004).

II.2.2. Domaines CBS

Les CLCs eucaryotes ainsi que certains CLCs procaryotes possèdent une large partie cytosolique en C-terminale. Cette partie contient 2 domaines CBS (pour l'enzyme cystathionine- β -synthase, première enzyme chez laquelle ce domaine a été identifié) en tandem inversés, CBS1 et CBS2 (Figure I-12B). La structure de ces domaines chez différentes protéines a été résolue : elle contient 2 hélices α et 3 feuillets β pour chaque domaine CBS chez CLC-0 (Meyer et Dutzler, 2006), hCLC-Ka (Markovic et Dutzler, 2007), hCLC-5 (Meyer *et al.*, 2007) ou encore chez AMPK de la levure (adenosine monophosphate activated protein kinase) (Townley et Shapiro, 2007). Le rôle de ces domaines n'est pas toujours évident. Dans le cas de hCLC-5, la structure 3D des domaines CBS à l'extrémité C-terminale a montré que l'ATP et l'ADP peuvent se fixer sur cette protéine (Meyer *et al.*, 2007). Par contre, chez CLC-0, il a été montré que ces domaines permettraient l'interaction des deux sous-unités de la protéine (Meyer et Dutzler, 2006).

II.3. La structure du pore des CLCs

Il a été montré que les CLCs sont des dimères dans lesquels chacune des deux sous-unités identiques contient son propre pore indépendamment. Chaque sous-unité possède un pore qui présente trois sites principaux de liaisons aux anions Cl^- (Dutzler *et al.*, 2003): S_{ext} (pour Site externe), S_{cen} (pour Site central), et S_{int} (pour Site interne), du côté extracellulaire vers le côté intracellulaire. Les simulations de Cohen et Schulten (2004) basées sur la structure de *Salmonella serovar typhimurium* (StCLC) et publiées par Dutzler et collaborateurs (2002) avec trois sites de liaison au Cl^- , sont représentées dans la figure I-11B. Les sites S_{int} et S_{ext} en périphérie du pore sont à l'interface avec les milieux aqueux cytoplasmiques et extra-cytoplasmiques respectivement, le site S_{cen} est totalement isolé dans une poche hydrophobe au milieu de la bicouche lipidique membranaire. Comme détaillé précédemment, chaque sous-unité comprend deux parties polypeptidiques présentant des structures très similaires, juxtaposées de manière antiparallèle (Cohen et Schulten, 2004). Cette architecture permet aux trois hélices α (D, F et N) d'avoir leurs extrémités N-terminales positives pointées vers le pore. Il a été suggéré que, avec un tel alignement, les hélices dipôles peuvent créer un environnement électrostatique favorable au passage d'anions dans un pore composé principalement des hélices polaires (Dutzler *et al.*, 2002).

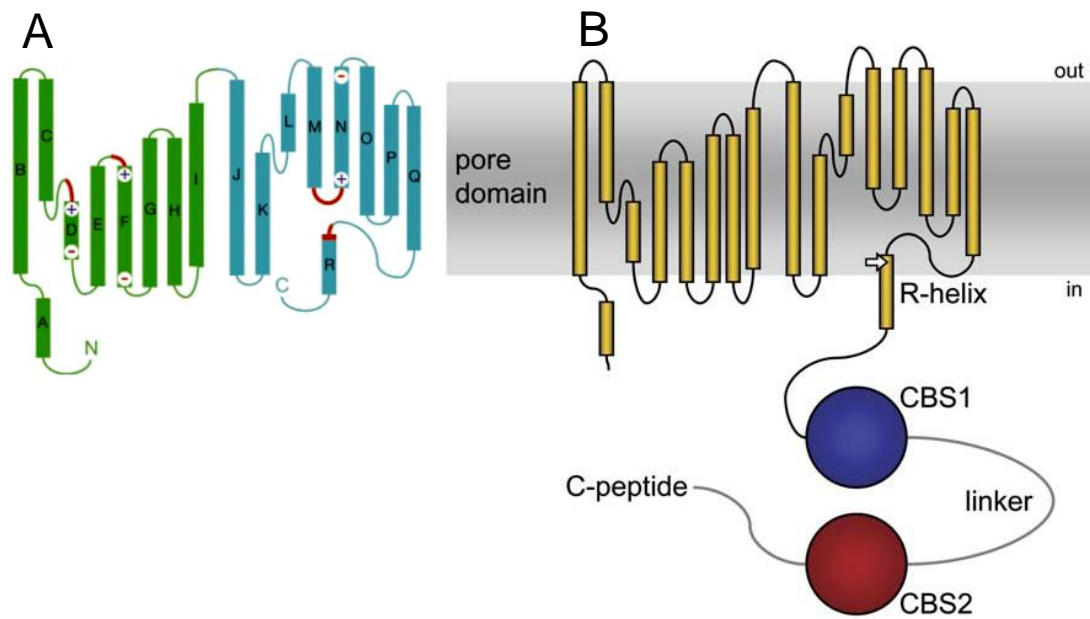


Figure I-12 : (A) Topologie d'une sous-unité de CLC bactérien contenant 18 hélices (étiquetées A - R), les séquences d'acides aminés conservées importantes pour le fonctionnement de la protéine sont colorées en rouge ; (B) Une sous-unité de CLC eucaryotique possédant une large partie cytosolique : en C-terminale, cette partie contient 2 domaines CBS (D'après Dutzler *et al.*, 2002; Meyer et Dutzler, 2006).

II.3.1. Le site de liaison externe S_{ext}

Le site S_{ext} , le plus extérieur à la membrane et en contact avec le milieu extra cellulaire, est composé par les acides aminés G(R/K)EGP, situé à l'extrémité N-terminale de l'hélice F. Chez CLC-ec1 d'*E. coli*, le glutamate à la position 148 (Glu 148 = E148) de cette séquence est essentiel à l'activation du pore. Miller (2006) a proposé le nom à cet acide aminé de « glutamate externe - Glu_{ex} » tandis que Zdebik et collaborateurs (2008) l'ont nommé « gating glutamate ».

Pour ce qui concerne le mécanisme d'activation de ce Glu_{ex} , Rychkov et collaborateurs (1996) ont montré que l'activation du pore nécessite l'occupation du Glu_{ex} du côté extra-cytoplasmique par un anion Cl^- et que cela dépend de la concentration en anion Cl^- externe. CLC-ec1 dans lequel le résidu Glu_{ex} a été substitué par une glutamine E148Q (un acide aminé non chargé) ou une alanine E148A (un acide aminé apolaire) conduit à l'obtention d'une structure du pore dans laquelle il est en position ouverte de manière permanente (Dutzler *et al.*, 2003 ; Accardi et Miller, 2004). Des résultats similaires ont été obtenus chez d'autres CLCs tels que hCLC-4 et hCLC-5 (Piccolo et Pusch, 2005 ; Scheel *et al.*, 2005). Le mécanisme proposé est que: lorsque le S_{ext} est occupé par le groupement carboxyle du Glu_{ex} , le pore est fermé ou bloqué. Par contre quand le S_{ext} est occupé par un ion Cl^- , le pore est ouvert ou conducteur (Dutzler *et al.*, 2003). Donc, le passage des anions Cl^- est contrôlé par une compétition entre l'anion et le groupement carboxyle du Glu_{ex} au niveau de S_{ext} et c'est ce groupement carboxyle qui va fermer ou ouvrir le pore.

II.3.2. Le site de liaison interne S_{int}

Le site S_{int} se situe à l'extrémité cytoplasmique du pore et est le plus intérieur à la membrane. Il est en interaction avec le milieu cytoplasmique. Chez CLC-ec1 d'*E. coli*, ce site comprend un autre acide aminé glutamate important à la position 203 (Glu 203 = E203), situé à l'extrémité C-terminale de l'hélice H. Ce glutamate est nommé « glutamate interne - Glu_{in} » ou « proton glutamate ». Glu_{in} est caractéristique des CLCs transporteurs et celui-ci est substitué par une valine, un acide aminé non protonable, chez les CLCs canaux caractérisés (Miller, 2006 ; Lisal et Maduke, 2008). Ainsi, situé près de la surface intracellulaire, Glu_{in} est nécessaire pour le transport de H^+ et semble agir comme un site de transfert interne de H^+ (Miller, 2006). Parmi les différents résidus pouvant être protonés,

seule une mutation du Glu_{in} permet d'abolir le transport de H⁺ chez le CLC transporteur d'*E. coli* CLC-ec1 (Accardi *et al.*, 2005), chez le CLC transporteur végétal d'*Arabidopsis* AtCLCa et chez le CLC transporteur d'humain hCLC-5 (Bergsdorf *et al.*, 2009). Accardi et collaborateurs (2005) ont montré que des mutations de ce Glu_{in} perturbent le transport de H⁺ et permettent le découplage du transport de Cl⁻ à partir du flux H⁺, suggérant que H⁺ et Cl⁻ prennent des routes différentes pour arriver au Glu_{ex} où les deux voies convergent (Zdebik *et al.*, 2008). Donc, le Glu_{ex} semble important également pour le couplage H⁺ / anion (Bergsdorf *et al.*, 2009 ; Accardi *et al.*, 2005). Ainsi, il a été montré que Glu_{ex} participe à trois réactions, étroitement liés entre elles, requises pour le mécanisme d'échange Cl⁻ / H⁺ : la liaison au Cl⁻, la protonation et le changement de conformation qui conduit à la formation d'une voie d'accès au pore. Bien que les protéines CLCs bactériennes fonctionnent comme des échangeurs H⁺ / Cl⁻, leurs structures sont représentatives pour les deux catégories canal et transporteur de la famille CLC (Dutzler, 2007). Miller (2006) a montré que chez les CLCs transporteurs bactériens CLC-ec1 et StCLC, la présence de Glu_{ex} et Glu_{in} est nécessaire pour leur fonction. Si Glu_{ex} est muté en un acide aminé neutre, le mouvement de H⁺ est complètement abolit, mais le transport de Cl⁻ est maintenu (Accardi *et al.*, 2005 ; Scheel *et al.*, 2005 ; Zdebik *et al.*, 2008 ; Bergsdorf *et al.*, 2009 ; Picollo *et al.*, 2010). L'ouverture du pore est provoquée par une modification de l'orientation du Glu_{ex} suite à l'acceptation sur son groupement carboxyle d'un proton H⁺ venant du Glu_{in}. Cette acceptation induit un changement conformationnel du Glu_{ex}, résultant à l'ouverture du pore et laisse entrer deux ions Cl⁻ dans le milieu cytoplasmique.

D'un point de vue évolutif, la fonction canal est apparue après la fonction de transporteur (Chen et Hwang, 2008). Très récemment, Feng et collaborateurs (2012) ont démontré que le transport de H⁺ au travers du pore d'échangeur H⁺ / Cl⁻ chez CLC-ec1 ne dépend pas seulement de la présence de Glu_{ex}, mais aussi de la présence d'ions Cl⁻ dans le milieu intracellulaire. Ils ont montré qu'il existe une forte interaction entre l'ion Cl⁻ et le groupement carboxyle du Glu_{ex}. Ils ont supposé que Cl⁻ et le groupement carboxyle du Glu_{ex} se concurrencent et se déstabilisent entre eux. La présence de Cl⁻ dans la voie de transport de l'anion perturbe susceptiblement l'affinité (pKa) du groupement carboxyle du Glu_{ex}, et le rend sensible à l'échange de proton H⁺. Leurs résultats confirment le mécanisme moléculaire dans lequel le proton H⁺ est transporté par le groupement carboxyle du Glu_{in} qui entre dans la voie de transport de l'anion. Ensuite, le proton H⁺ est

transféré vers le groupement carboxyle du Glu_{ex} qui, par la suite, le transfère du S_{cen} vers le S_{ext} et le libère finalement dans la solution extracellulaire (Feng *et al.*, 2012).

II.3.3. Le site de liaison central S_{cen}

Le site S_{cen}, localisé dans la portion centrale hydrophobe de la membrane, est constitué des acides aminés GSGIP (situé à l'extrémité N-terminale de l'hélice D), GXFXP (situé à l'extrémité N-terminale de l'hélice N) et la tyrosine (situé à l'extrémité N-terminale de l'hélice R). La fonction du motif GXFXP conservé chez les CLCs transporteurs et canaux reste encore inconnue. La sérine de l'hélice D (nommé Ser_{cen}) et la tyrosine de l'hélice R (nommé Tyr_{cen}) sont essentielles pour l'interaction avec les ions chlorures au niveau de ce site. Il est supposé que l'existence de ces résidus est de garder un anion en permanence dans le pore pour prévenir les événements tels que le passage de H⁺ par les canaux ou le passage des anions hydrophobes (Rychkov *et al.*, 1998). En effet, Ser_{cen} et Tyr_{cen} fournissent un rétrécissement brusque et important du pore et interagissent simultanément avec les anions (Cohen et Schulten, 2004).

La séquence complète de la perméabilité déterminée pour la plupart des CLCs est : SCN⁻ ~ ClO₄⁻ > Cl⁻ > Br⁻ > NO₃⁻ ~ ClO₃⁻ > I⁻ > BrO₃⁻ > HCO₃⁻ ~ F⁻ (Rychkov *et al.*, 1998). L'étude de la structure cristallographique du transporteur CLC-ec1 a permis de mettre en évidence que le domaine S_{cen} joue un rôle déterminant dans la sélectivité ionique. Picollo et collaborateurs (2009) ont montré que dans ce domaine, le Ser_{cen} détermine la sélectivité pour les CLCs transporteurs. La substitution à cette sérine d'un proline confère à ce site une sélectivité pour le NO₃⁻ plus importante que pour Cl⁻ non seulement chez le transporteur CLC-ec1 mais également chez le canal CLC-0 (Picollo *et al.*, 2009). Le rôle essentiel de cette Ser_{cen} dans les propriétés de sélectivité des CLCs a été démontré également chez les autres membres CLC-0 (Ludewig *et al.*, 1996 ; Bergsdorf *et al.*, 2009 ; Picollo *et al.*, 2009), hCLC-4 (Zdebik *et al.*, 2008), hCLC-5 (Zdebik *et al.*, 2008 ; Bergsdorf *et al.*, 2009 ; Zifarelli et Pusch, 2009). Ces observations ont montré qu'en présence de la sérine, la sélectivité s'effectue en faveur des ions chlorures, contrairement à la proline qui favorise le passage des ions nitrates (voir la partie II.5.1. AtCLCa).

II.4. Les rôles des CLCs chez différents organismes

II.4.1. CLC chez la levure

Une seule séquence de la famille des *CLCs* a été identifiée au sein de l'ensemble du génome de *Saccharomyces cerevisiae* (Huang *et al.*, 1994 ; Greene *et al.*, 1993). La suppression de ce gène, nommé *GEF1* (pour Glycerol / Ethanol Fe-requiring) provoque une croissance plus lente des cellules sur des milieux pauvre en fer contenant des sources de carbone non fermentable (Greene *et al.*, 1993 ; Gaxiola *et al.*, 1998). La protéine GEF1 est localisée au niveau du réticulum, du réseau *trans*-Golgien tardif, dans les vésicules post-Golgiennes (Schwappach *et al.*, 1998) et de la membrane plasmique (Lopez-Rodriguez *et al.*, 2007). Schwappach *et al.*, (1998) ont indiqué que son rôle pourrait participer à l'acidification des compartiments intracellulaires. Ceci est soutenu par le fait que le phénotype du mutant *gef2*, très similaire à celui du mutant *gef1*, est lié à une mutation d'une sous-unité de la pompe à proton ATPase vacuolaire (Eide *et al.*, 1993). Plus récemment, il a été montré que GEF1 neutralise l'acidification vésiculaire au cours de la carence en fer. Dans cette condition, les compartiments intracellulaires contenant GEF1 sont ajustés à un pH plus alcalin (Braun *et al.*, 2010).

II.4.2. CLCs chez l'homme

Chez l'homme, il existe neuf CLCs qui diffèrent dans la distribution tissulaire et la localisation subcellulaire. Certains d'entre eux sont des canaux Cl^- , situés sur la membrane plasmique, qui jouent des rôles importants dans la stabilité du potentiel membranaire, la régulation du volume cellulaire et le transport transépithélial. D'autres CLCs sont des anti-porteurs Cl^- / H^+ , localisés principalement aux vésicules d'endosome ou lysosome où ils peuvent faciliter l'acidification ou régler la concentration de chlorure (Jentsch, 2008).

II.4.2.1. L'activité des canaux CLCs

Les canaux CLCs se situent sur la membrane plasmique de cellules de nombreux organes (Thiemann *et al.*, 1992). Ce groupe comprend CLC-1, CLC-2, CLC-Ka et CLC-Kb (Jentsch, 2008 ; Mindell, 2012). Le canal chlorure CLC-1 joue un rôle important pour les fonctions physiologiques des muscles squelettiques (Pedersen *et al.*, 2004 ; Dutka *et al.*, 2008 ; Weinberger *et al.*, 2012). L'ouverture de ce canal non seulement est dépendante du voltage mais est également régulée par H^+ et Cl^- . Des mutations de ce gène résultent en une maladie génétique appelée myotonie congénitale chez l'homme. Cette maladie peut

apparaître sous deux formes de myotonie, une forme à transmission dominante (ou maladie de Thomsen) et une forme à transmission récessive (ou maladie de Becker) (Tang et Chen, 2011). CLC-2, très largement exprimé sur la membrane plasmique des cellules épithéliales, neurones, ou cellules gliales, est un canal chlorure qui pourrait être impliqué dans l'homéostasie des ions extracellulaires ainsi que dans le transport transépithélial (Jentsch, 2008). Les canaux CLC-Ka et CLC-Kb sont impliqués dans le transport de Cl⁻ transépithélial dans le rein et l'oreille interne (Devuyst et Guggino, 2002 ; Jentsch *et al.*, 2005).

II.4.2.2 L'activité des anti-porteurs Cl⁻ / H⁺

Les anti-porteurs CLCs, comprenant CLC-3 à -7, sont localisés sur la membrane des compartiments intracellulaires (Jentsch, 2008). Ils sont caractérisés par leur rôle dans l'acidification des vésicules endosomales ou lysosomales en fournissant une conductance anionique qui neutralise les courants des pompes à protons vacuolaires de type V-ATPase. CLC-3 fonctionne comme un échangeur Cl⁻ / H⁺ putatif des vésicules endosomales et synaptiques (Jentsch, 2008). CLC-4 est un échangeur Cl⁻ / H⁺ (Picollo et Pusch, 2005 ; Scheel *et al.*, 2005) mais son rôle biologique reste très peu connu. CLC-5 est un échangeur Cl⁻ / H⁺ endosomal impliqué dans les maladies dentaires et rénales chez l'homme (Novarino *et al.*, 2010 ; Rickheit *et al.*, 2010). CLC-6 (43% identique à CLC-7) est presque exclusivement exprimée dans le système nerveux où elle est localisée dans les endosomes tardifs (Poet *et al.*, 2006) et fonctionne comme un anti-porteur Cl⁻ / H⁺ (Neagoe *et al.*, 2010). CLC-7 est un échangeur Cl⁻ / H⁺ lysosome nécessitant Ostm1 pour assurer l'activité de transport (Leisle *et al.*, 2011) et la perméation de chlorure dans les lysosomes (Graves *et al.*, 2008). Le chlorure fournit le contre-ion pour l'acidification du lumen lysosomal *via* les V-ATPases (Mindell, 2012). Les mutations de cette protéine sont à l'origine des maladies de stockage lysosomal (Weinert *et al.*, 2010).

II.4.3. CLCs chez les plantes

En contraste avec leurs homologues d'origine animale, les recherches effectuées sur les CLCs végétaux sont assez modestes. Le premier CLC chez le tabac, CLC-Nt1, a été étudié pour la première fois par Lurin et collaborateur (2000). L'utilisation d'anticorps polyclonaux spécifiques a révélé la localisation subcellulaire mitochondriale pour cette protéine. La fonction de cette protéine reste à ce jour inconnue. Chez le soja, GmCLC1 a

été étudiée par Li et collaborateurs (2006). Les études microscopiques confocales en utilisant des protéines fusions YFP-GmCLC1 ont révélé que GmCLC1 est localisée sur le tonoplaste. L'expression de *GmCLC1* est induite par le stress NaCl. Ces résultats suggèrent que GmCLC1 vacuolaire peut posséder la capacité de séquestrer les ions Cl⁻ cytoplasmiques dans la vacuole pour réduire ses effets toxiques lors d'un stress salin (Li *et al.*, 2006). Chez le riz, il a été montré que la famille de CLC comprend 10 membres (Diedhiou et Gollmack, 2006 ; Barbier-Brygoo *et al.*, 2011). Nakamura et collaborateurs (2006) ont isolé OsCLC-1 et OsCLC-2, deux CLCs identiques à 87,9%, localisés dans les membranes vacuolaires. *OsCLC-1* s'exprime dans la plupart des tissus (Diedhiou et Gollmack, 2006), tandis qu'*OsCLC-2* ne s'exprime que dans les racines, les nœuds, et les entre-nœuds. L'expression d'*OsCLC-1* est induite par un traitement avec du NaCl. Les scientifiques ont montré que ces protéines peuvent jouer un rôle dans le transport des ions chlorures à travers la membrane vacuolaire par complémentation du mutant *gef1* de *S. cerevisiae* (Nakamura *et al.*, 2006). Plus récemment, chez le maïs, Tampieri et collaborateurs (2011) ont indiqué que ZmCLCc se situe dans la mitochondrie et contribue à la tolérance au froid de la plante.

II.5. CLCs chez *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana a été choisie comme un organisme modèle pour la recherche végétale, l'évolution, la génétique et la recherche fondamentale grâce à ses nombreux atouts : sa petite taille, son cycle de vie court de 6 semaines et sa capacité à s'autoféconder (Fink, 1998).

Depuis plusieurs années, des études des canaux chlorures chez *Arabidopsis thaliana* (AtCLCs) ont été menées. Les premiers CLCs chez *Arabidopsis* ont été clonés par Hechenberger *et al.* (1996). Il existe sept gènes *AtCLCs* qui sont présents dans son génome, leur nom *AtCLCa* à *g*, leur localisation et leur fonction sont indiqués dans le tableau I-1. Basé sur l'analyse de séquence, *AtCLCa* à *-d* et *-g* définissent une branche phylogénétique distincte (Lv *et al.*, 2009). *AtCLCe* et *-f* ont une homologie très faible avec les autres CLCs et sont liées aux CLCs procaryotiques (Figure I-10).

II.5.1. AtCLCa

AtCLCa est le CLC végétal le plus étudié. C'est également le premier membre de la famille *AtCLC* chez *Arabidopsis* à avoir été caractérisé par les techniques

d'électrophysiologie. Il a été montré que c'est un anti-porteur, localisé sur le tonoplaste, qui fait entrer 2 NO₃⁻ et sortir 1 H⁺ de la vacuole. Il joue un rôle crucial dans l'homéostasie du nitrate vacuolaire (De Angeli *et al.*, 2006). AtCLCa serait, en partie, responsable du stockage de nitrate dans la vacuole d'où une sous-accumulation de NO₃⁻ dans des plantes mutantes *atclca* (Geelen *et al.*, 2000 ; Monachello *et al.*, 2009). La découverte de la fonction d'AtCLCa en tant que transporteur du nitrate a été une grande surprise et a montré que, pour la première fois, la sélectivité ionique des CLCs végétaux n'est pas limitée aux ions chlorures. AtCLCa présente deux résidus glutamate conservés « gating » et « proton » aux positions 203 et 270 dans la séquence d'acides aminés, respectivement. Ceci est caractéristique des CLCs échangeurs de couplage de protons / anions (De Angeli *et al.*, 2009 ; Zifarelli et Pusch, 2010). Lorsque le glutamate « gating » E203 est muté en un acide aminé non chargé, comme alanine E203A, le transport des anions devient découplé à celui des protons (Bergsdorf *et al.*, 2009) et augmente la conductivité pour le chlorure (Barbier-Brygoo *et al.*, 2011). Cette observation concorde avec les résultats obtenus chez d'autres CLCs animaux tels que CLC-5, et CLC-7 (Novarino *et al.*, 2010 ; Weinert *et al.*, 2010) ou chez *E. coli* CLC-ec1 (Zifarelli et Pusch, 2010). La mutation du glutamate « proton » E270 en une alanine chez AtCLCa entraîne une perte du transport de proton H⁺ (Bergsdorf *et al.*, 2009). Le courant de chlorure couplé est restauré seulement lorsque les deux glutamates « gating » et « proton » sont mutés. Cela indique que la translocation des protons par E270 est un préalable pour l'échange de protons / anions par E203 (Accardi *et al.*, 2005 ; Bergsdorf *et al.*, 2009) (renvoi au II.3). En accord avec l'importance du motif de sélectivité ionique GS/PGIP (Dutzler *et al.*, 2002), Wege et collaborateurs (2010) ont montré que chez AtCLCa, la proline en position 160 localisée dans le filtre de sélectivité, P160, est essentielle pour l'accumulation de nitrate dans la plante. D'autre part, De Angeli et collaborateurs (2009) ont montré que la fixation d'ATP à la partie C-terminale au niveau des 2 domaines CBS d'AtCLCa inhibe le transport du nitrate dans la vacuole.

II.5.2. AtCLCb

AtCLCb, une protéine homologue à AtCLCa (79,2% d'identité entre les deux ADNc), est un échangeur NO₃⁻ / H⁺ localisé sur le tonoplaste (von der Fecht-Bartenbach *et al.*, 2010). Le gène *AtCLCb* est fortement exprimé dans les jeunes racines, l'hypocotyle et dans les cotylédons. Contrairement au mutant *atclca*, le mutant nul *atclcb* ne présente aucun phénotype vis-à-vis de son contenu en nitrate par rapport aux plantes sauvages. Ces

résultats suggèrent que AtCLCb n'est pas complètement indispensable ou que sa perte a été compensée par d'autres transporteurs, potentiellement AtCLCa. Von der Fecht-Bartenbach *et al.* (2010) concluent également que la formation d'hétérodimères entre AtCLCa et AtCLCb n'a que peu d'importance physiologique au niveau cellulaire. Ces résultats sont maintenant à nuancer car, très récemment, dans le laboratoire, Astrid Agorio a trouvé que dans certaines conditions azotées du milieu, le double mutant *atclca/atclcb* présente un phénotype accentué par rapport aux simples mutants (Agorio, communication personnelle).

II.5.3. AtCLCc

AtCLCc est le troisième membre de la famille AtCLC localisé sur le tonoplaste à avoir été bien étudié (Harada *et al.*, 2004 ; Lv *et al.*, 2009 ; Jossier *et al.*, 2010). L'analyse de la séquence d'AtCLCc affiche les caractéristiques d'un transporteur avec une sélectivité pour le chlorure (Zifarelli et Pusch, 2010). *AtCLCc* est fortement exprimé dans des cellules de garde et le pollen et, plus faiblement dans les racines (Jossier *et al.*, 2010).

Au laboratoire, Mathieu Jossier et collaborateurs (2010) ont mené les études sur quatre lignées mutantes d'insertion ADN-T indépendantes d'*Arabidopsis* d'accession Col-0 et WS. L'ouverture des stomates chez les mutants *atclcc* est réduite en réponse à la lumière ainsi que la fermeture des stomates en réponse à l'ABA. Les plantes mutantes *atclcc* sont hypersensibles au traitement de NaCl lorsqu'elles sont cultivées sur le sol ou *in vitro*. Le phénotype des mutants est associé à des modifications de contenu en chlorure dans les cellules de garde et dans les racines. Ainsi, ils ont montré que la protéine AtCLCc est essentielle pour les mouvements stomatiques et la tolérance au sel par la régulation de l'homéostasie du chlorure. AtCLCc participerait alors à l'entrée du Cl⁻ dans la vacuole (Jossier *et al.*, 2010). D'autres travaux suggèrent que AtCLCc pourrait être responsable du passage du nitrate au travers du tonoplaste car les mutants *atclcc* présentent un phénotype de sous accumulation de nitrate dans la partie foliaire (Harada *et al.*, 2004).

II.5.4. AtCLCd

La séquence d'AtCLCd suggère qu'il pourrait être un échangeur de chlorure / proton (Zifarelli et Pusch, 2010). La fonction d'AtCLCd chez *Arabidopsis thaliana* reste obscure. Selon von der Fecht-Bartenbach *et al.*, (2007), AtCLCd peut être co-localisée avec une sous-unité de V-type ATPase VHA-a1 et jouer un rôle dans le réseau de *trans-*

Golgi. L'invalidation de la fonction d'AtCLC*d* rend le mutant *atclcd-1* hypersensible à la concanamycin A, un inhibiteur spécifique de V-ATPase ce qui suggère son implication dans l'acidification du *trans*-Golgi (Dettmer *et al.*, 2006).

II.5.5. AtCLC*e* et AtCLC*f*

Marmagne *et al.* (2007) ont montré qu'AtCLC*e* et AtCLC*f*, apparentées aux protéines CLC procaryotiques, sont associées aux membranes des thylakoïdes et à l'appareil de Golgi respectivement. En accord avec sa localisation, AtCLC*e* est impliquée dans l'activité de la machinerie photosynthétique de la plante. La fonction d'AtCLC*f* reste inconnue à ce jour.

II.5.6. AtCLC*g*

En ce qui concerne le dernier membre de la famille AtCLC, AtCLC*g*, les travaux de Lv et collaborateurs (2009) suggèrent une localisation tonoplastique de cette protéine. Parallèlement, une analyse protéomique a montré que la protéine AtCLC*g* est présente dans la cellule *Arabidopsis thaliana* (Chang *et al.*, 2009). Mais, en ce qui concerne de la fonction d'AtCLC*g*, aucune information n'a été publiée.

PROJET DE THÈSE

Le génome d'*Arabidopsis thaliana* comporte 7 membres de la famille CLC, tous localisés au niveau d'endomembranes (Lv *et al.*, 2009). Avant mon arrivée au laboratoire, en 2006, A. De Angeli avait pour la première fois caractérisé AtCLCa comme étant un transport préférentiel de nitrate par rapport aux ions chlorures. En 2007, A. Marmagne a démontré qu'AtCLCe était localisé dans la membrane des thylacoïdes et impliqué dans l'activité photosynthétique et, qu'AtCLCf est localisé dans la membrane de l'appareil de Golgi. M. Jossier en 2010 a montré qu'AtCLCc était localisé dans le tonoplaste et impliqué dans la tolérance au stress salin. Pour ce qui concerne d'AtCLCg, des travaux protéomiques sur l'isolement d'interacteur avec les protéines 14.3.3 montrent que cette protéine est présente dans les plantes d'*Arabidopsis* et pourrait y avoir un rôle (Chang *et al.*, 2009). Lv et collaborateurs (2009) ont suggéré une localisation tonoplastique de cette protéine. Mais jusqu'à ce jour, aucune recherche concernant le rôle d'AtCLCg n'a été publiée, d'où son étude approfondie dans le cadre de mes travaux de thèse.

Dans une première partie, j'ai voulu caractériser la fonction d'AtCLCg *in planta*. J'ai, entre autres, étudié les localisations subcellulaire de la protéine et tissulaire de l'expression génique. J'ai ensuite analysé le phénotype de deux mutants d'insertion d'ADN-T dans ce gène et montré l'implication d'AtCLCg dans la réponse au stress salin.

AtCLCc, étant un autre AtCLC impliqué dans la résistance au stress salin, j'ai voulu étudier, dans une deuxième partie, la redondance fonctionnelle entre AtCLCc et AtCLCg en analysant le phénotype de la plante double mutante *atclcc/atclcg*. L'ensemble de ces travaux m'ont permis ainsi de compléter l'ensemble des connaissances sur la famille des CLCs chez *Arabidopsis*.

RÉSULTATS

Tableau R-1 : Liste des différentes formes d'ADNc contenant des changements repérés auprès des colonies bactériennes

Type de changement	Nombre de colonies testées	Pourcentage (%)
+ 72 nu	16	36
+ 14 nu	2	4
- 5 nu	23	51
+ 1 nu	4	9

RÉSULTATS

Chapitre I - Identification et caractérisation d'AtCLCg

I. Clonage d'AtCLCg - plusieurs formes différentes d'ADNc

Lors de l'initiation de l'étude d'AtCLCg, aucune information concernant l'identification et la caractérisation de cette protéine n'avait été publiée. D'après les bases de données (The Arabidopsis Information Resource (TAIR), www.arabidopsis.org), le gène *AtCLCg*, situé dans la région péricentromérique du chromosome 5, est composé de 3228 paires de bases et contient 7 exons et 6 introns.

Nous avons commencé le projet en clonant l'ADNc d'AtCLCg afin d'obtenir les outils pour étudier entre autres la localisation subcellulaire de la protéine. Pour ce faire, les ARN totaux ont été extraits à partir des plantules entières d'*Arabidopsis thaliana* d'accession Columbia (Col-0) ou Wassilewskija (WS), âgées de 14 jours, pour synthétiser les ADNc (cf. Matériels et Méthodes). La PCR sur cette population d'ADNc a été réalisée en utilisant les amorces spécifiques attBCLCgF et attBCLCgR+stop (cf. tableau M-1) afin d'amplifier l'ADNc complet d'AtCLCg. Les fragments PCR ont été ensuite introduits dans le vecteur donneur pDONR207 par la réaction BP (BP Clonase® II Invitrogen).

I.1. Description des différentes formes d'ADNc

Malgré 3 clonages répétés indépendants à partir des matériaux végétaux de l'accession Col-0 ou WS, nous n'avons pas pu cloner l'ADNc d'AtCLCg prédit par TAIR pour des raisons inconnues. Par contre, en analysant la population d'ADNc, on s'est aperçu qu'il existe plusieurs types d'ADNc d'AtCLCg qui sont tous différents par rapport à l'ADNc prédit par les bases de données. Les changements se situent essentiellement dans la région du cinquième intron, entre les exons 5 et 6. La proportion d'apparition de chaque forme est

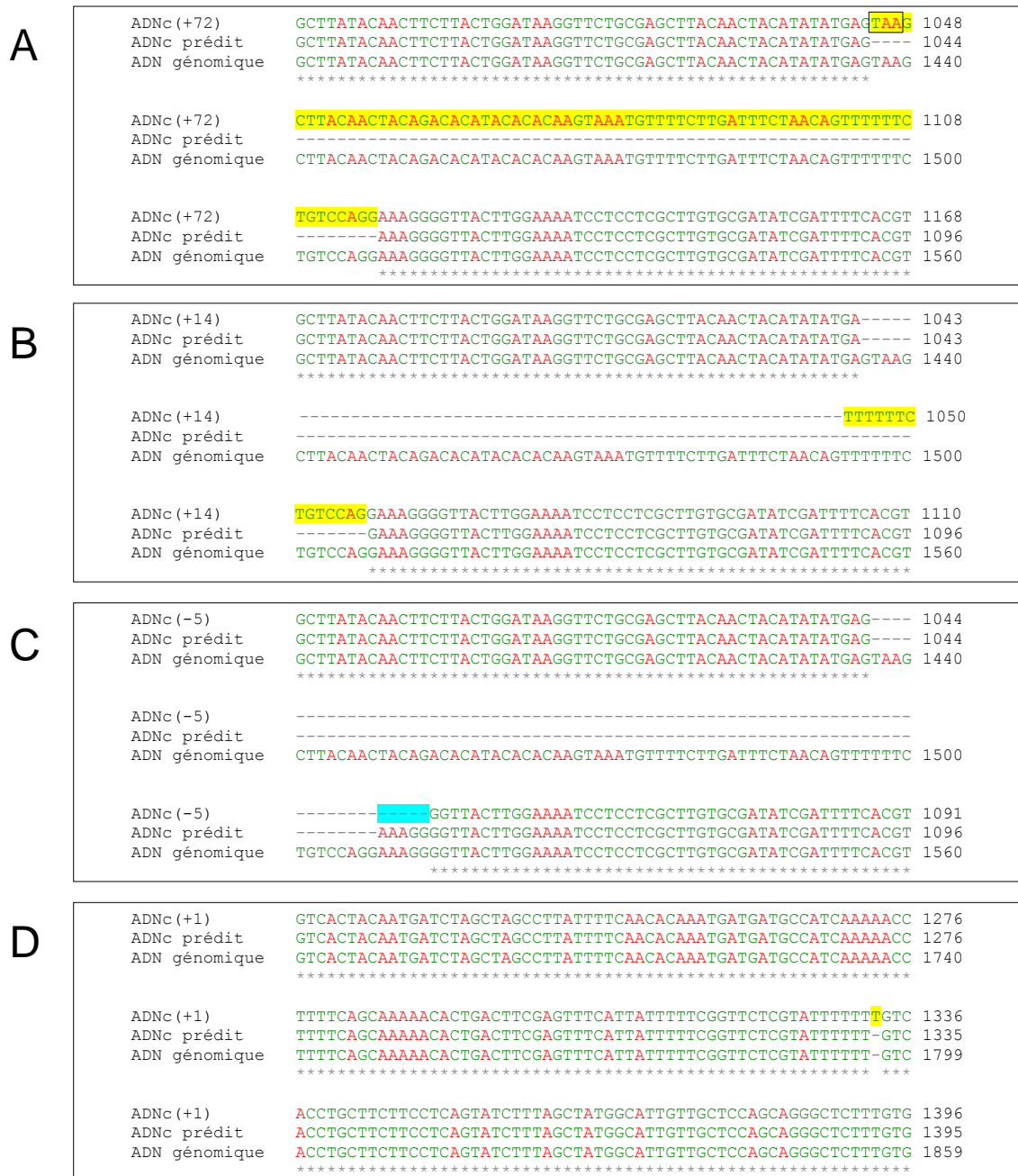


Figure R-1 : Quatre formes d'ADNc d'*AtCLCg* obtenues au cours des clonages

Dans la forme ADNc (+72) (A), le carré indique le codon stop TAA. Dans les autres formes ADNc (+14) (B), ADNc (-5) (C) et ADNc (+1) (D), le codon stop apparaît plus loin dans la séquence et ne peut pas être illustré sur l'image. Les couleurs surlignées indiquent les positions de changement des formes d'ADNc. Le jaune indique les ajouts de nucléotides, le bleu indique les délétions de nucléotides. Les séquences ont été séquencées par GATC - Biotech™. L'alignement a été réalisé grâce à ClustalW2.

notée et est reportée dans le tableau R-1. Nous décrivons ci-dessous les formes d'ADNc en fonction du nombre des nucléotides changés.

La première forme d'ADNc contenant un ajout de 72 nucléotides, nommé ADNc (+72), est présente à 36% par rapport au nombre total des colonies bactériennes que nous avons testées. Ces 72 nucléotides correspondent parfaitement au cinquième intron d'*AtCLCg* prédit dans les bases de données. Dans cette séquence, nous pouvons observer qu'elle présente un codon stop (TAA) qui apparaît dans la région au début de l'insertion (Figure R-1A).

La deuxième forme d'ADNc contenant un ajout de 14 nucléotides, nommé ADNc (+14), représente 4% des colonies testées au cours de nos 3 clonages indépendants. Ces 14 nucléotides correspondent à une partie du cinquième intron (Figure R-1B). À cause de cette séquence, la phase de lecture est changée et un codon stop apparaît précocement dans le sixième exon.

La troisième forme d'ADNc contenant un changement de 5 nucléotides, nommé ADNc (-5), représente 50% des colonies testées au cours de nos 3 clonages. Différente par rapport aux deux formes d'ADNc précédentes, cette forme d'ADNc représente une délétion de 5 nucléotides au début du sixième exon par rapport à la séquence d'ADNc prédite dans les bases de données. Cette délétion change la phase de lecture et fait apparaître un codon stop peu après la délétion (Figure R-1C).

Enfin, la quatrième forme d'ADNc contient une insertion d'un seul nucléotide au milieu du sixième exon, nommé ADNc (+1). Cette forme présente une proportion de 10% des colonies testées. L'insertion d'un nucléotide entraîne l'apparition d'un codon stop situé peu après le changement (Figure R-1D).

I.2. Proportion des formes d'ADNc (+72) et (+14) dans la population totale d'ADNc

Avec l'apparition de ces différentes formes d'ADNc, nous avons voulu savoir la proportion de chaque forme dans la population d'ADNc grâce à la technique PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR). Pour ce faire, nous avons désigné des couples d'amorces spécifiques I72 - E6 et I14 - E6 qui sont capables de reconnaître les formes ADNc (+72) et ADNc (+14) respectivement. Pour les formes ADNc (-5) et ADNc (+1), les changements ne sont pas suffisants pour être repérés par des amorces spécifiques. En conséquence, nous n'avons pas pu analyser la proportion de ces 2 formes par rapport à la

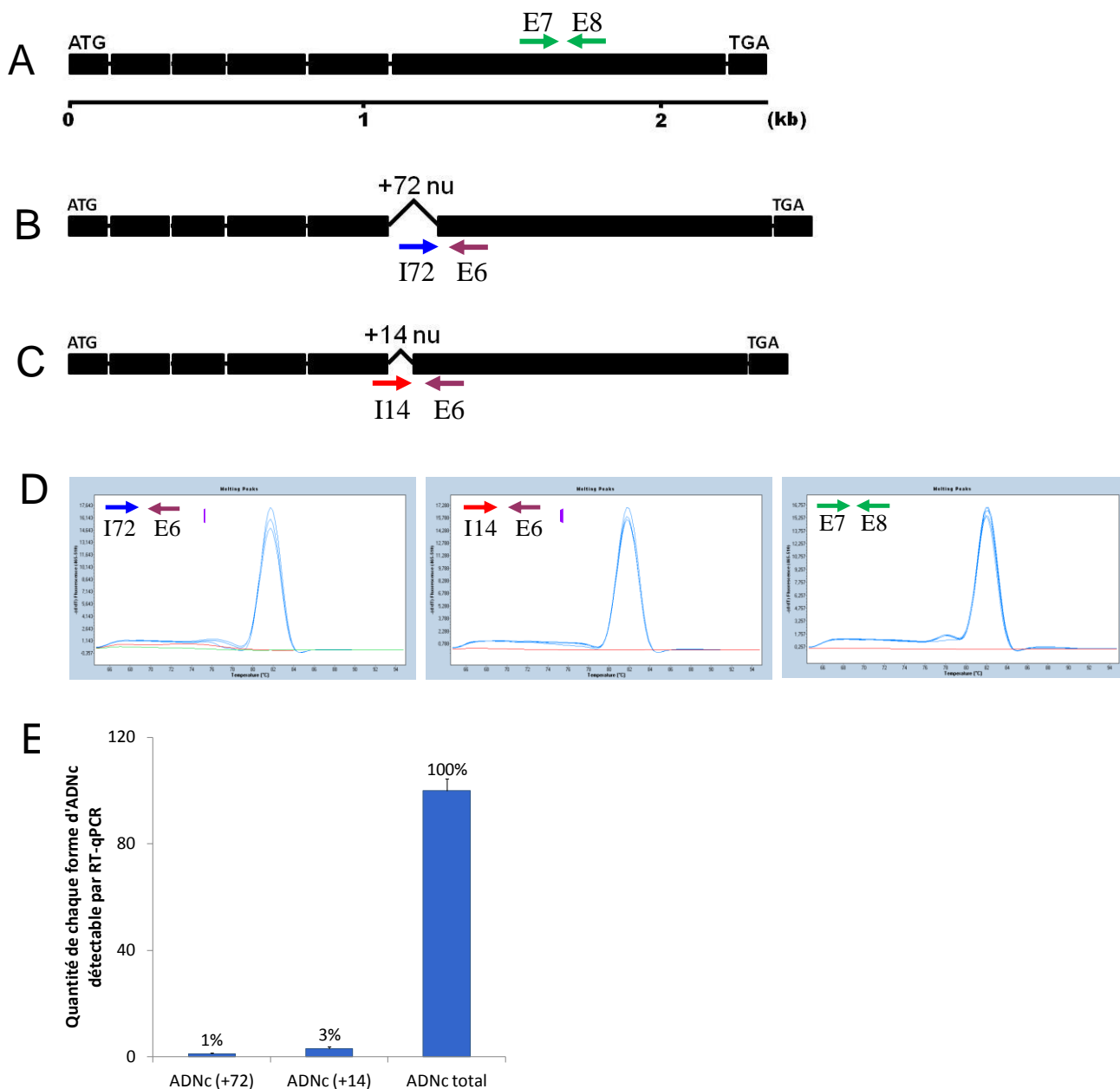


Figure R-2 : Quantification des différentes formes d'ADNc d'*AtCLCg* au sein d'une population totale d'ADNc

Les flèches indiquent la position des amorces. (A) Position des amorces E7 et E8 dans l'exon 6. (B) La forme d'ADNc (+72) a été détectée grâce aux amorces I72 se situant dans la région de 72 nucléotides et E6. (C) La forme d'ADNc (+14) a été détectée grâce à l'amorce I14 qui englobe 2 parties, une première partie correspond aux 14 nucléotides, une deuxième partie correspond à la séquence de la fin du cinquième exon, et l'amorce E6. (D) Profil de fluorescence donné par le logiciel LightCycler™480 reflétant la spécificité des couples d'amorces. L'axe Y montre l'intensité du signal de fluorescence émis lors du changement de la température de fusion (axe X). L'obtention d'un seul pic du signal de fluorescence signifie que le couple d'amorces est spécifique. (E) la quantité d'ADNc total d'*AtCLCg* est ramenée à 100%, les valeurs représentées sont la moyenne de trois expériences indépendantes.

population totale d'ADNc. Nous avons également désigné un couple d'amorces spécifiques E7 - E8 qui repère la région centrale d'*AtCLCg*. Ce couple d'amorces reconnaît toutes les formes d'ADNc décrites ci-dessus et évidemment la forme d'ADNc prédite par TAIR, autrement dit l'ADNc d'*AtCLCg* total. La position de chaque amorce est indiquée dans la figure R-2A, B et C. La spécificité et l'efficacité des couples d'amorces ont été vérifiées avant de réaliser la PCR quantitative en temps réel en réalisant des courbes de fusion des produits d'amplification (Figure R-2D) et en effectuant la qRT-PCR sur une gamme de dilution d'ADNc. Les valeurs d'efficacité sont de 1,907 ; 1,918 et 1,902 pour les couples d'amorces I72 - E6 ; I14 - E6 et E7 - E8 respectivement.

Comme nous montre le résultat de la PCR quantitative dans la figure R-2E, les quantités des formes d'ADNc (+72) et d'ADNc (+14) ne représentent que 1% et 3% de la population d'ADNc totale d'*AtCLCg* respectivement.

II. Localisation subcellulaire et tissulaire d'*AtCLCg*

II.1. Localisation subcellulaire d'*AtCLCg*

La localisation subcellulaire d'*AtCLCg* était incertaine au début de mon travail de thèse. En 2009, utilisant comme témoin positif une protéine localisée spécifiquement sur le tonoplaste (water channel protein CFP- δ -TIP), Lv *et al.* ont conclu que la protéine *AtCLCg* est située sur cette membrane. Comme l'image de la localisation d'*AtCLCg* montre, selon nous, une localisation sur une membrane d'un compartiment intracellulaire autre que la vacuole, la confirmation de sa localisation sur membrane vacuolaire était préférable (Figure R-3A).

Afin d'éviter les difficultés liées au clonage de l'ADNc, nous avons cloné l'ADN génomique d'*AtCLCg* et l'avons introduit dans le vecteur d'expression pMDC43 qui permet de former la protéine fusion GFP-*AtCLCg* en N-terminale. Ce vecteur a été ensuite introduit transitoirement dans des protoplastes d'*Arabidopsis thaliana* par la technique de transformation transitoire en présence de PEG (Thomine *et al.*, 2003). La formation de la protéine fusion ainsi que sa localisation sont observées après 48 h sous microscope à fluorescence de type confocal, nous avons observé le signal de la GFP sur le tonoplaste (Figure R-3B). Cette expérience a été répétée 3 fois et nous avons toujours obtenu le même résultat. Ceci confirme la localisation tonoplastique d'*AtCLCg*.

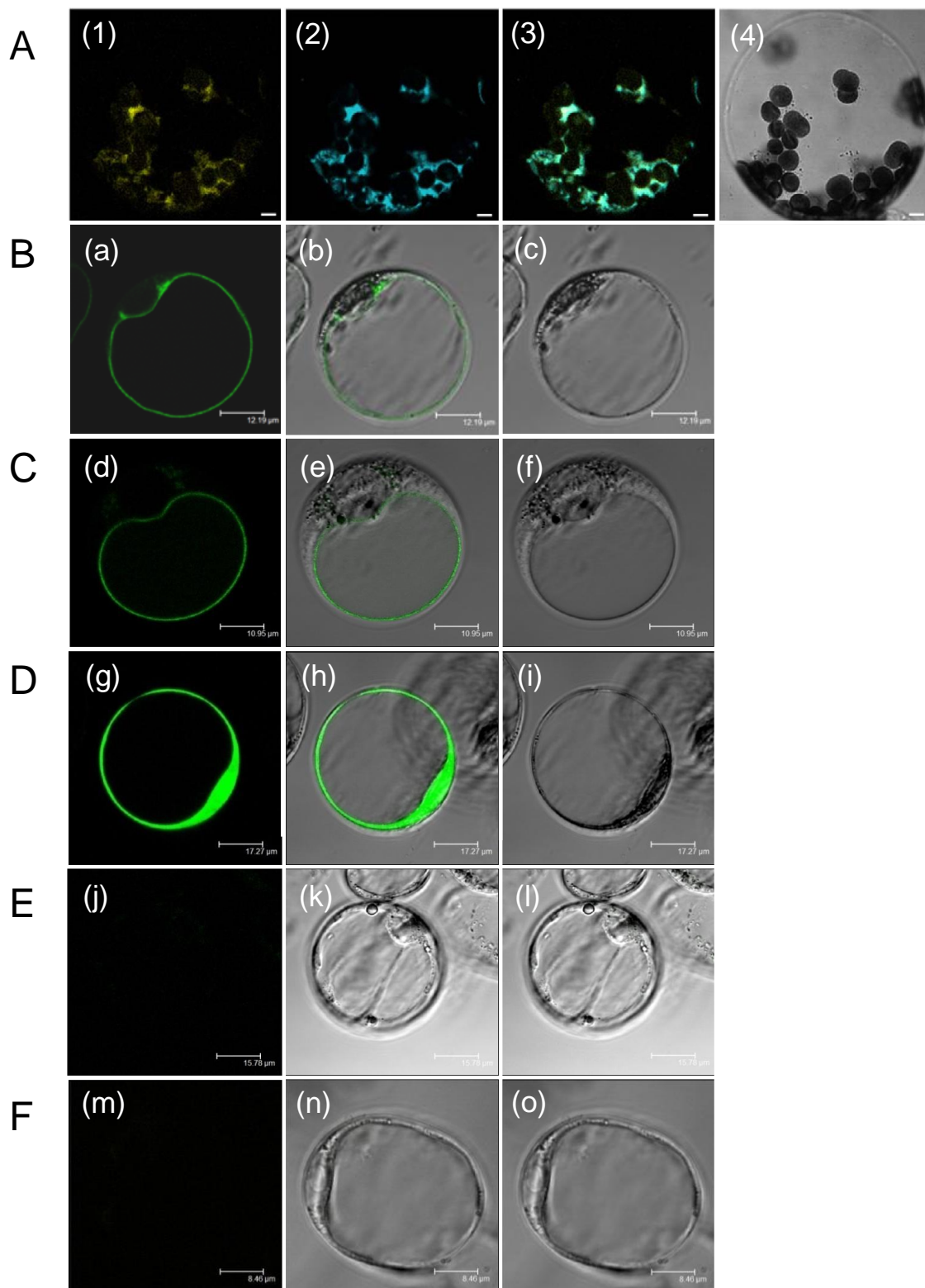


Figure R-3 : Localisation subcellulaire d'AtCLCg

(A) La localisation tonoplastique d'AtCLCg d'après Lv *et al.*, 2009, (A1) image de fluorescence de la protéine fusion AtCLCg-YFP, (A2) image de fluorescence de la protéine fusion CFP- δ -TIP, (A3) image fusionnée et (A4) image prise en transmission, la barre d'échelle est de 5 μ m, les protoplastes utilisés sont des protoplastes de cellules du mésophylle du tabac. (B, C, D, E et F) Images du microscope confocal sur des protoplastes d'*Arabidopsis thaliana* transformés transitoirement avec les constructions suivantes pMDC43::GFP-AtCLCg génomique, pMDC43::GFP-ADNc(+72), pMDC43::GFP-ADNc(+14), pMDC43::GFP-ADNc(-5) et pMDC43::GFP-ADNc(+1) respectivement. Les protoplastes transformés ont été observés sous microscope confocal (a, d, g, j, m) ou en transmission (c, f, i, l, o). Les images fusionnées sont présentées en b, e, h, k et n.

II.2. Localisation subcellulaire des protéines issues de différentes formes d'ADNc

L'apparition de trois formes d'ADNc (+72), ADNc (+14) et ADNc (-5) nous suggère éventuellement un problème dans le phénomène d'épissage d'*AtCLCg* car les changements de nucléotides dans ces formes correspondent à l'intron 5 ou à la région entre l'intron 5 et l'exon 6. Pour la forme ADNc (+1), cette hypothèse d'épissage n'est plus valable car le changement a eu lieu au milieu du sixième exon.

Afin d'étudier les raisons d'existence et rôles respectifs des différentes formes d'ADNc, nous avons mené l'étude de la localisation subcellulaire des protéines issues de ces formes d'ADNc en introduisant ces ADNc dans le vecteur d'expression pMDC43, utilisé pour étudier la localisation protéique comme précédemment. La formation de la protéine de fusion ainsi que sa localisation sont observées après 48 h sous microscope à fluorescence de type confocal. Il est nécessaire de rappeler que dans tous les cas, à partir de la séquence de 4 formes d'ADNc obtenus, la traduction en protéine prédite donne toujours une protéine tronquée. Les changements ont modifié la phase ouverte de lecture (ORF), faisant apparaître un nouveau codon stop en amont de celui prédit.

Comme le montre la figure R-3C, D, E et F, seule la protéine de fusion GFP-*AtCLCg* issue de la forme ADNc (+72) s'adresse au tonoplaste, la protéine de fusion GFP-*AtCLCg* issue de la forme ADNc (+14) est présente dans le cytosol, tandis que celles issue de la forme ADNc (-5) et ADNc (+1) ne donnent pas de signal de fluorescence. Ces observations peuvent être expliquées par les hypothèses suivantes.

D'abord pour la forme d'ADNc (+72), il est possible que l'épissage se soit déroulé correctement - ces 72 nucléotides correspondant au cinquième intron seraient éliminés - et donne une protéine ayant la même fonction que la protéine prédite ou protéine non tronquée. Une autre hypothèse serait que cette forme d'ADNc donne une protéine tronquée qui s'adresse au tonoplaste; on peut se demander si cette protéine tronquée peut posséder d'autre(s) fonction(s) sur le tonoplaste que celle de la protéine sauvage. Pour vérifier si notre hypothèse d'épissage proposé est correcte, une expérience de « Western blot » a été réalisée avec l'anticorps anti-GFP disponible au laboratoire pour préciser la taille de la protéine. Malheureusement cela n'a pas fonctionné et il nous faudrait recommencer l'expérience.

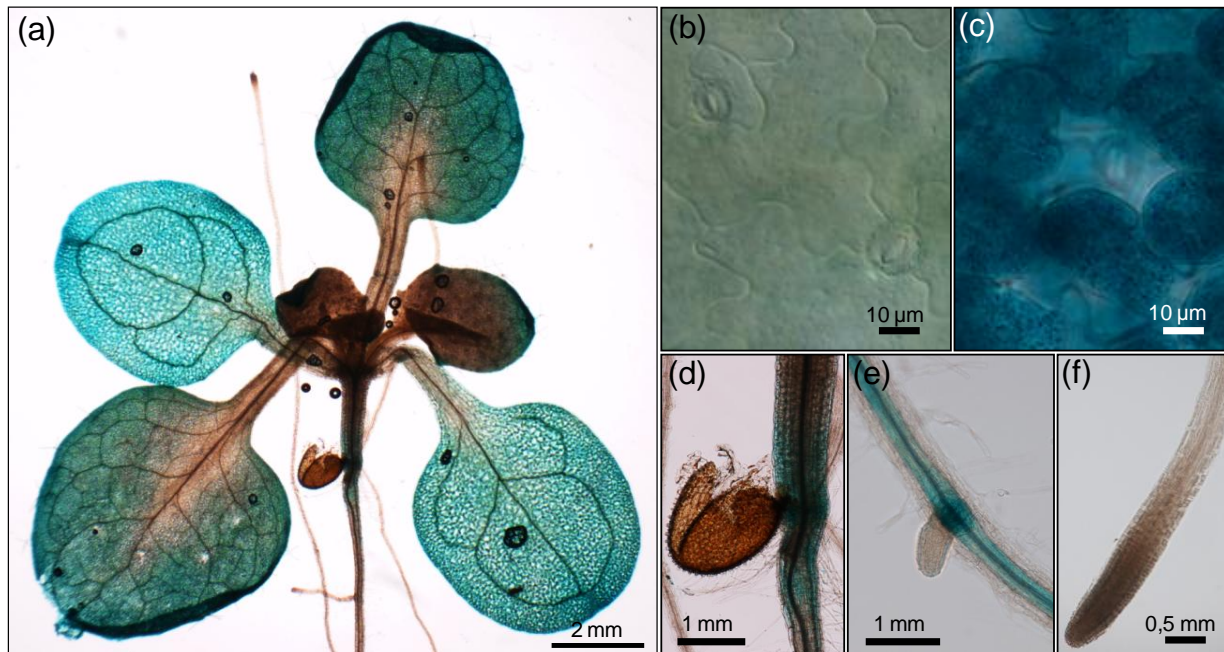


Figure R-4 : Expression tissulaire d'*AtCLCg*

Analyses histochimiques des plantes transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* Col-0 exprimant $P_{AtCLCg}::GFP-GUS$. Les photographies présentées sont : (a) une plantule de 10 jours; (b) la face inférieure de la feuille montrant des cellules de garde de stomates; (c) des cellules du mésophylle; (d) la partie du collet; (e) la racine principale; (f) l'apex de la racine principale.

Avec la forme d'ADNc (+14), les protoplastes observés en microscope confocal présentent un signal de fluorescence GFP dans le cytosol. Ainsi la protéine issue de cette forme a perdu sa capacité à s'adresser au tonoplaste. Cela montre que la partie manquante dans la protéine tronquée pourrait jouer un rôle important pour l'adressage au tonoplaste et que la protéine tronquée posséderait éventuellement d'autre(s) fonction(s).

Quant aux formes d'ADNc (-5) et ADNc (+1), nous n'avons pas pu observer de signal de fluorescence dans les protoplastes. Ces changements ont probablement provoqué une perturbation majeure dans la formation de la protéine fusion GFP-AtCLCg: soit la fusion aboutit à la déformation de la protéine GFP ne lui permettant pas d'émettre un signal de fluorescence, soit l'ARNm a été dégradé et mène à une absence de traduction des ARNm en protéine.

II.3. Expression tissulaire d'*AtCLCg*

Nous avons voulu ensuite caractériser l'expression tissulaire d'*AtCLCg*. La région promotrice de 1859 paires de base en amont du codon « start » a été clonée. Cette séquence a été introduite dans le vecteur d'expression pKGWFS7 contenant les gènes *uidA* et *GFP* fusionnés. Le vecteur généré a été utilisé pour la transformation de la plante sauvage d'accession Col-0. Nous avons obtenu 12 lignées de plantes transgéniques indépendantes de la génération T2 présentant une ségrégation de $\frac{3}{4} : \frac{1}{4}$ pour le marqueur de sélection. Parmi ces lignées, 4 lignées transgéniques indépendantes de la génération T3 qui présentent une descendance 100% pour le marqueur de sélection, et qui sont donc homozygotes pour le transgène, ont été étudiées. L'activité de la β -glucuronidase codée par le gène *uidA* a été testée dans des plantes âgées de 10 jours poussées *in vitro* après ajout de X-Gluc. Au niveau de la plante entière, le promoteur d'*AtCLCg* s'exprime très fortement dans les feuilles, particulièrement au niveau des cellules du mésophylle et non de l'épiderme (Figure R-4a, b et c), assez fortement dans la région du collet et à la base de l'hypocotyle et enfin plus faiblement dans la racine au niveau du cylindre central (Figure R-4e) alors qu'aucune activité n'a été détectée dans l'apex de la racine (Figure R-4f).

Ce profil correspond aux prédictions d'expression d'*AtCLCg* disponibles dans les bases de données (www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi ; Winter *et al.*, 2007).

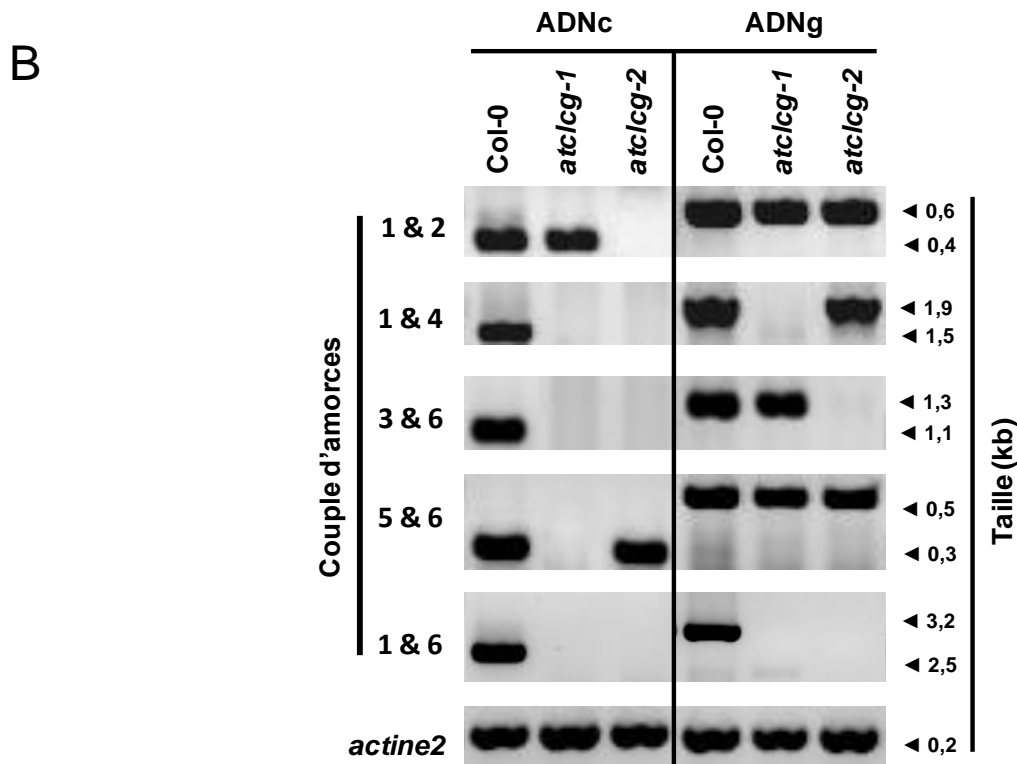
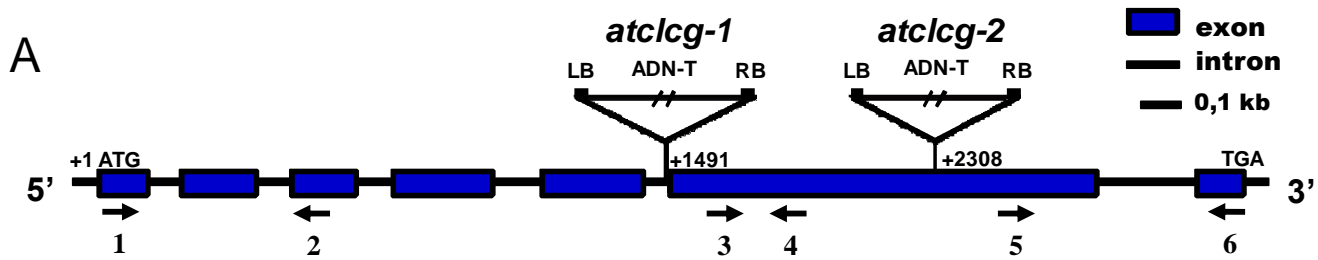


Figure R-5 : Position des insertions ADN-T et analyse des transcrits chez les mutants *atclcg*

(A) Schéma représentant la position des ADN-T selon les données fournies par GABI-Kat collection et des amorces spécifiques utilisées pour l'analyse de la transcription d'*AtCLCg* dans les 2 mutants *atclcg*.

(B) Confirmation par PCR du positionnement des ADN-T et détection des transcrits d'*AtCLCg* chez les mutants. Les ADNg et ARNs totaux ont été extraits à partir des plantules sauvages et mutantes *atclcg*, âgées de 7 jours cultivées sur milieu *in vitro* ½MS. La synthèse d'ADNc a été réalisée suivie d'une PCR en utilisant les amorces spécifiques 1 à 6. Les expériences similaires ont été réalisées sur l'ADN génomique avec les mêmes couples d'amorces pour vérifier que les couples d'amorces ont bien fonctionné et pour confirmer l'endroit de l'insertion ADN-T dans chaque mutant. L'expression de l'*actine2* a été également analysée dans les différents échantillons comme contrôle.

III. Criblage des mutants *atclcg* et production des plantes complémentées

Parmi 7 membres de la famille protéique AtCLCs chez *Arabidopsis thaliana*, AtCLCg est la quatrième protéine identifiée sur le tonoplaste. Ceci montre le rôle important de cette famille dans les échanges de molécules au travers du tonoplaste. Les AtCLCs tonoplastiques peuvent être divisées en deux groupes, un groupe impliqué dans l'homéostasie du nitrate vacuolaire (AtCLCa et AtCLCb) et l'autre groupe impliqué dans le passage du chlorure au travers le tonoplaste (AtCLCc). Quant à AtCLCg, nous n'avons aucune information concernant son rôle physiologique : serait-elle impliquée dans l'homéostasie du nitrate et/ou dans le passage de chlorure? Pour mieux comprendre sa fonction, il était nécessaire de chercher des plantes mutantes *atclcg* pour pouvoir avoir des outils génétiques.

III.1. À la recherche des mutants *atclcg*

Afin d'étudier la fonction d'AtCLCg *in planta*, les plantes mutantes invalidées par l'insertion d'un ADN-T ont été recherchées auprès du Centre européen de stock d'*Arabidopsis* (NASC - <http://arabidopsis.info/>). Nous avons trouvé 2 mutants provenant de la collection GABI (GK-506B12-019732 appelé *atclcg-1* et GK-214E12-014139 appelé *atclcg-2*). Les positions des insertions d'ADN-T chez ces deux mutants sont indiquées dans la figure R-5A. Les plantes mutantes *atclcg* homozygotes sont sélectionnées par PCR avec une amorce spécifique de l'ADN-T et une amorce spécifique d'AtCLCg (cf. tableau M-1). Elles sont utilisées pour la suite des expériences.

En analysant l'extinction d'AtCLCg chez ces deux mutants, nous avons observé que les deux mutants possèdent toujours des transcrits partiels alors qu'aucun transcrit de pleine longueur n'a pu être détecté (Figure R-5B). Comprenant un ADN-T à la jonction entre le cinquième intron et le sixième exon, le mutant *atclcg-1* présente un transcrit partiel avant de la position de l'insertion ADN-T. Cette insertion n'empêcherait pas la transcription du gène qui pourrait commencer au début du gène jusqu'à l'insertion et s'arrêterait probablement dans l'insertion ADN-T. Le mutant *atclcg-2* portant un ADN-T au milieu du sixième exon du gène, donne un transcrit après l'insertion d'ADN-T. Ce dernier pourrait contenir des séquences nucléotides particulières telles qu'un codon «start»

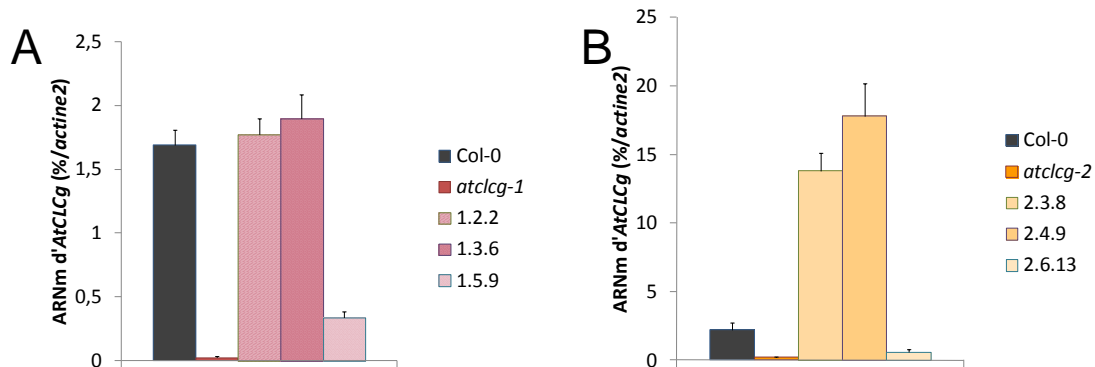


Figure R-6: Sélection des plantes complémentées.

Pour détecter le niveau d'expression du transgène, les ARNm sont extraits à partir du matériel végétal des plantules âgées de 2 semaines développées *in vitro* sur milieu $\frac{1}{2}$ MS, suivi d'une synthèse d'ADNc. La qRT-PCR a été réalisée par les couples d'amorces spécifiques qgS et qgAS reportés dans le tableau M-1 (cf. la partie Matériel et Méthodes). (A) Sélection des plantes complémentées pour le mutant *atclcg-1*. Nous avons pris trois lignées 1.2.2, 1.2.6 et 1.5.9 comme exemple pour les lignées complémentées *atclcg-1 35S::CLCg*. Le niveau d'expression d'*AtCLCg* chez deux lignées 1.2.2 et 1.3.6 est restauré par rapport au sauvage Col-0 et non chez la lignée 1.5.9. (B) Sélection des plantes complémentées pour le mutant *atclcg-2*. Pour les lignées complémentées *atclcg-2 35S::CLCg*, nous avons obtenu deux lignées 2.3.8 et 2.4.9 qui ont une expression d'*AtCLCg* de 5 à 6 fois plus forte par rapport au sauvage Col-0, inversement chez la lignée 2.6.13. L'expression d'*AtCLCg* est bien évidemment éteinte dans les mutants *atclcg-1* et *atclcg-2*.

qui permet d'initialiser la transcription jusqu'à la fin du gène. Nous pouvons constater qu'il existe des cas similaires à ces mutants tels que les mutants *atsar3-3* (pour Suppressor of Auxin Resistance) (Parry *et al.*, 2006) ou *atarr1-3* (pour Arabidopsis Response Regulators) (Argyros *et al.*, 2008) ou encore *atire1b-2* (pour Inositol-Requiring Enzyme 1) (Chen et Brandizzi, 2011). Chez ces mutants, aucun transcrite de pleine longueur n'a été détecté et la protéine tronquée pourrait jouer un rôle dans le phénotype du mutant.

III.2. Production des plantes complémentées

Nous avons généré les plantes mutantes *atclcg* complémentées par transformation avec *Agrobacterium tumefaciens* portant le vecteur pAlligator2::AtCLCg_{génomique} qui permet d'exprimer *AtCLCg* sous le contrôle d'un double promoteur fort et constitutif CaMV 35S. Plusieurs lignées transgéniques ont été obtenues. Les graines des générations suivantes de ces lignées ont été obtenues par autofécondation. Les plantes de la génération T2 présentant une ségrégation de $\frac{3}{4} : \frac{1}{4}$ pour le marqueur de sélection ont été sélectionnées. Parmi ces lignées, des lignées homozygotes de la génération T3 qui présentent une descendance 100% pour le marqueur de sélection ont été sélectionnées. Nous avons d'abord vérifié l'expression de la transcription d'*AtCLCg* chez toutes les lignées homozygotes obtenues par qRT-PCR (Figure R-6). Nous avons observé pour chaque mutant *atclcg* deux types de plantes complémentées: des plantes complémentées avec une très forte expression du transgène comme la lignée 2.3.8 et 2.4.9 ; et des plantes complémentées avec des niveaux d'expression équivalents à ceux du sauvage, par exemple lignée 1.2.2 et 1.3.6. Par la suite, seules les lignées complémentées phénotypiquement ont été choisies finalement pour les expériences physiologiques ultérieures. Ici les lignées complémentées 1.3.6 et 2.4.9 ont été respectivement sélectionnées pour les mutants *atclcg-1* et *atclcg-2*.

IV. Caractérisation fonctionnelle d'AtCLCg

Au vu du rôle connu des AtCLCs dans le transport du NO_3^- et/ou Cl^- , nous nous sommes posés la question : est-ce que *AtCLCg* est impliquée dans l'homéostasie du nitrate et/ou dans la réponse au stress salin ? Pour ce faire, dans un premier temps, nous avons commencé par chercher le phénotype des mutants *atclcg* comparés au sauvage vis-à-vis de l'homéostasie du nitrate et, dans un deuxième temps, par voir si cette protéine joue un rôle dans la réponse de la plante au stress salin.

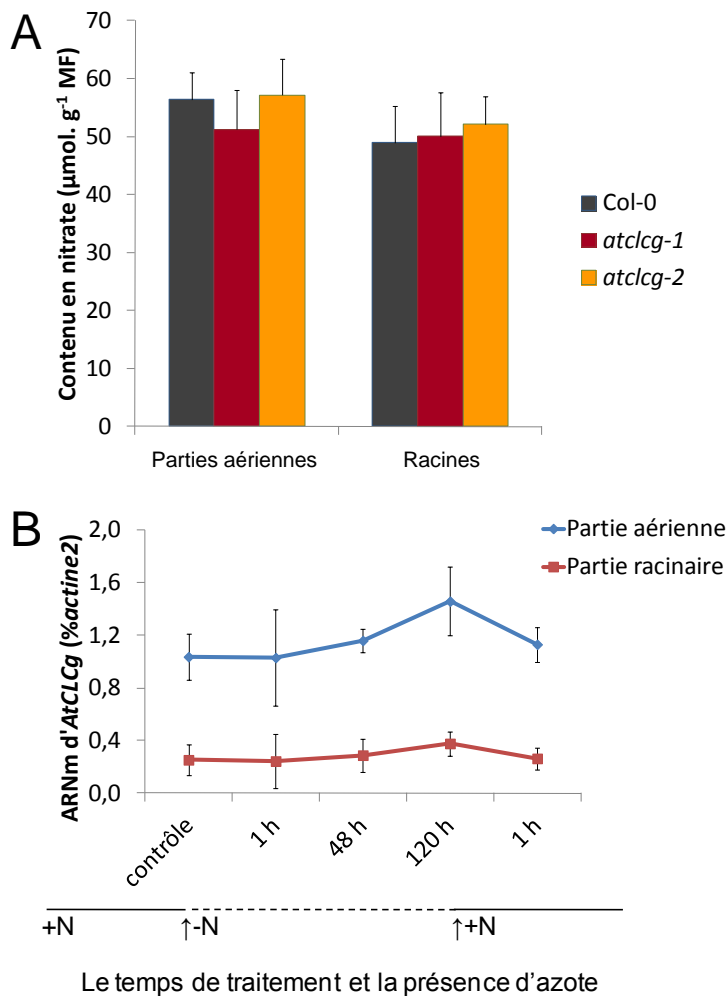


Figure R-7: Implication d'*AtCLCg* dans l'homéostasie du nitrate.

(A) Contenu en nitrate dans les parties foliaires et racinaires chez les plantes sauvages et chez les mutants *atclcg*. Les plantes sauvages et mutants sont mises à pousser *in vitro* sur milieu ABIS dont le contenu de nitrate est fixé à 7 mM. Après trois semaines de croissance, les parties foliaires et racinaires sont récupérées séparément, puis le contenu en nitrate est mesuré. L'expérience a été répétée trois fois, les valeurs sont des moyennes de trois répétitions indépendantes. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types.

(B) Expression d'*AtCLCg* en réponse à la limitation et la remise en azote dans le milieu de croissance. Les plantes ont poussé pendant 2 semaines sur milieu hydroponie contenant d'azote (+N), puis pendant 5 jours sur milieu limitant en azote (-N) et enfin pendant 1 heure dans le milieu initial en rajoutant le nitrate afin d'obtenir une réinduction par le nitrate. Le prélèvement de matériel biologique est effectué au moment de changement de contenu en nitrate de 6 mM (+N) à 0,2 mM (-N) (point contrôle), après 1 heure, 48 heures et 120 heures sur milieu limitant en azote et 1 heure après la remise à condition initiale. Les ARNm ont été extraits suivi d'une synthèse d'ADNc. L'expression d'*AtCLCg* a été quantifiée par qRT-PCR en utilisant le couple d'amorces qgS et qgAS. L'expérience a été réalisée une fois, les valeurs sont la moyenne de trois répétitions biologiques. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types.

A noter, nos conditions de culture sur sol en serre n'ont pas permis de mettre en évidence des différences macroscopiques entre les deux lignées mutantes *atclcg-1* et *atclcg-2* et les plantes sauvages, ce qui suggère qu'AtCLCg n'intervient pas dans le développement général de la plante.

IV.1. AtCLCg ne joue pas de rôle dans l'homéostasie du nitrate dans les conditions testées

Comme le mutant *atclca* contient moins de nitrate par rapport au sauvage en condition de culture *in vitro* standard ABIS (Geelen *et al.*, 2000), ou le mutant *atclcb* dans certaines conditions de culture accumule moins de nitrate par rapport au sauvage (A. Agorio, communication personnelle), nous avons voulu vérifier si les mutants *atclcg* montraient des différences de contenu en nitrate vis-à-vis du sauvage. Pour ce faire, les plantes sauvages et mutantes ont été mises à pousser *in vitro* sur milieu ABIS dont le contenu de nitrate était fixé à 7 mM. Après trois semaines de développement sur ce milieu, les parties foliaires et racinaires ont été récupérées séparément puis le contenu en nitrate a été mesuré. En observant le résultat dans la figure R-7A, nous trouvons qu'il n'y a pas de différence de contenu en nitrate entre le sauvage et les mutants, ni dans la partie foliaire ni dans la partie racinaire. Ces résultats suggèrent que, dans ces conditions, la protéine AtCLCg ne participe pas au déplacement du nitrate de la vacuole vers le cytosol ou inversement.

Sachant que les expressions des gènes connus, par leur rôle dans l'homéostasie du nitrate, sont tous régulés selon les conditions environnementales en azote (Forde, 2000 ; Peng *et al.*, 2007 ; Ho et Tsay, 2010), nous avons alors voulu tester s'il y avait éventuellement des changements d'expression d'AtCLCg suivant les conditions environnementales en azote. Nous avons pu effectuer une expérience en hydroponie dans laquelle on a fait varier les conditions nutritionnelles en azote: après 2 semaines sur milieu à forte concentration en NO_3^- (6 mM NO_3^-), les plantes ont été transférées sur un milieu limitant en azote (0,2 mM NO_3^-) pendant 120 heures avant d'être replacées sur milieu standard 6 mM NO_3^- . Nous avons pu constater qu'AtCLCg ne répondait pas à la limitation d'azote dans le milieu de croissance, aussi bien dans la partie foliaire que dans la partie racinaire, à court terme de même qu'à long terme. Son expression n'est pas induite lorsque l'on rajoute du NO_3^- dans le milieu (Figure R-7B).

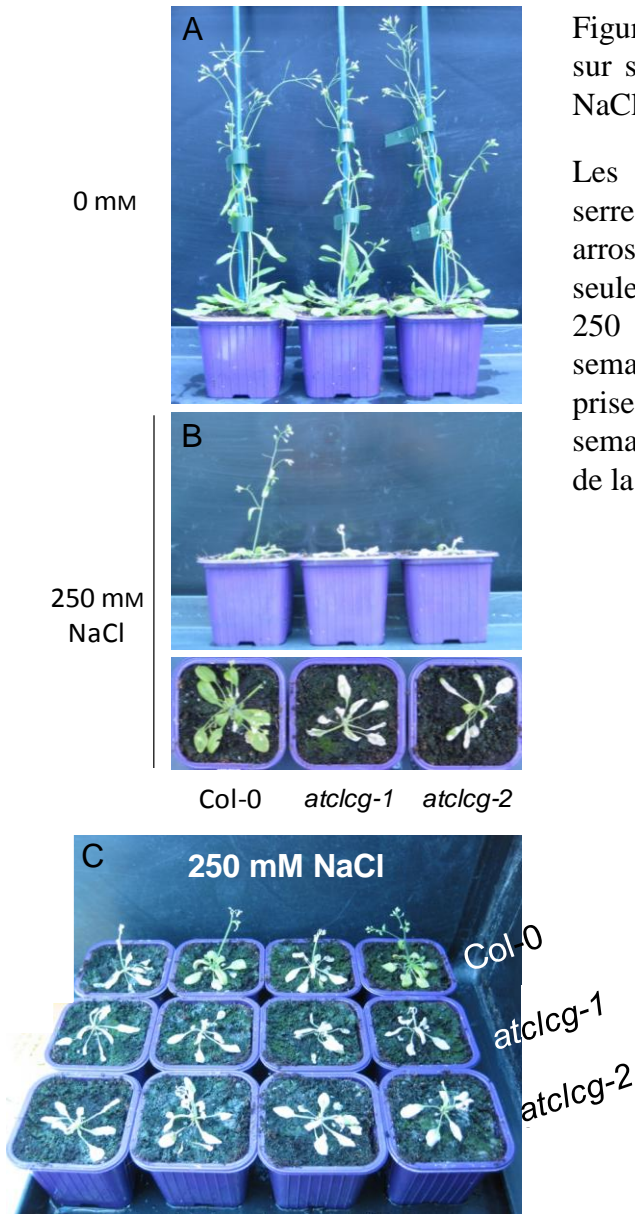


Figure R-8: Les mutants *atclcg* cultivés sur sol en serre sont hypersensibles au NaCl

Les plantes sont cultivées sur sol en serre pendant 2 semaines et ensuite sont arrosées avec de l'eau déionisée seulement (A) ou de l'eau contenant 250 mM de NaCl (B,C) pendant 5 semaines. Les photos des plantes ont été prises 7 semaines après germination (5 semaines après le début du traitement de la salinité).

À partir de ces résultats, nous avons constaté que l'expression d'*AtCLCg* est indépendante du changement d'azote environnemental. Cette protéine ne joue pas de rôle dans l'homéostasie du nitrate de la plante dans les conditions testées.

IV.2. *AtCLCg* est impliqué dans la réponse au stress NaCl

IV.2.1. Les plantes mutantes *atclcg* sont hypersensibles au NaCl par rapport au sauvage

IV.2.1.1. Phénotype des mutants en condition de culture en serre

Les plantes mutantes *atclcg-1*, *atclcg-2* et sauvages d'accession Col-0 ont d'abord été cultivées sur sol en serre. Au début de l'expérience, les plantes ont été arrosées pendant 2 semaines normalement afin d'homogénéiser leurs croissances. Ensuite, elles ont été arrosées pendant 5 semaines avec de l'eau déionisée seulement ou de l'eau supplémentée avec 250 mM NaCl. Les plantes sauvages et les deux mutantes arrosées avec de l'eau présentent une croissance et un développement identiques. En revanche, avec le sol arrosé par 250 mM NaCl, les plantes mutantes présentent un phénotype d'hypersensibilité au NaCl par rapport aux plantes sauvages (Figure R-8B et C). Chez les plantes mutantes, les rosettes sont plus petites, les feuilles sont chlorotiques et les hampes florales sont plus courtes que celles du sauvage.

IV.2.1.2. En condition de culture *in vitro* les mutants montrent:

a) Une réduction de leur matière fraîche

Afin d'analyser ce phénotype en détail, nous avons d'abord fait pousser *in vitro* les plantes sauvages Col-0, les mutants *atclcg-1*, *atclcg-2* et les plantes complémentées *atclcg-1 35S::AtCLCg*, *atclcg-2 35S::AtCLCg* sur le milieu de contrôle ½MS (pour Murashige et Skoog) (Murashige et Skoog, 1962) et sur une série du milieu ½MS contenant différentes concentrations de NaCl (25, 50, 75 et 100 mM de NaCl). Nous avons également réalisé l'expérience *in vitro* pour deux durées différentes (2 et 3 semaines). Lorsque les plantes poussent sur le milieu de contrôle ½MS, que ce soit après deux ou trois semaines de développement, on peut constater que les mutants sont identiques aux sauvages. Par contre, sur le milieu de NaCl, on peut d'abord observer l'effet du stress NaCl sur la croissance de tous les géotypes, c'est-à-dire que les plantes se développent de moins en moins bien quand on augmente de plus en plus la concentration de NaCl dans le milieu. Nous avons

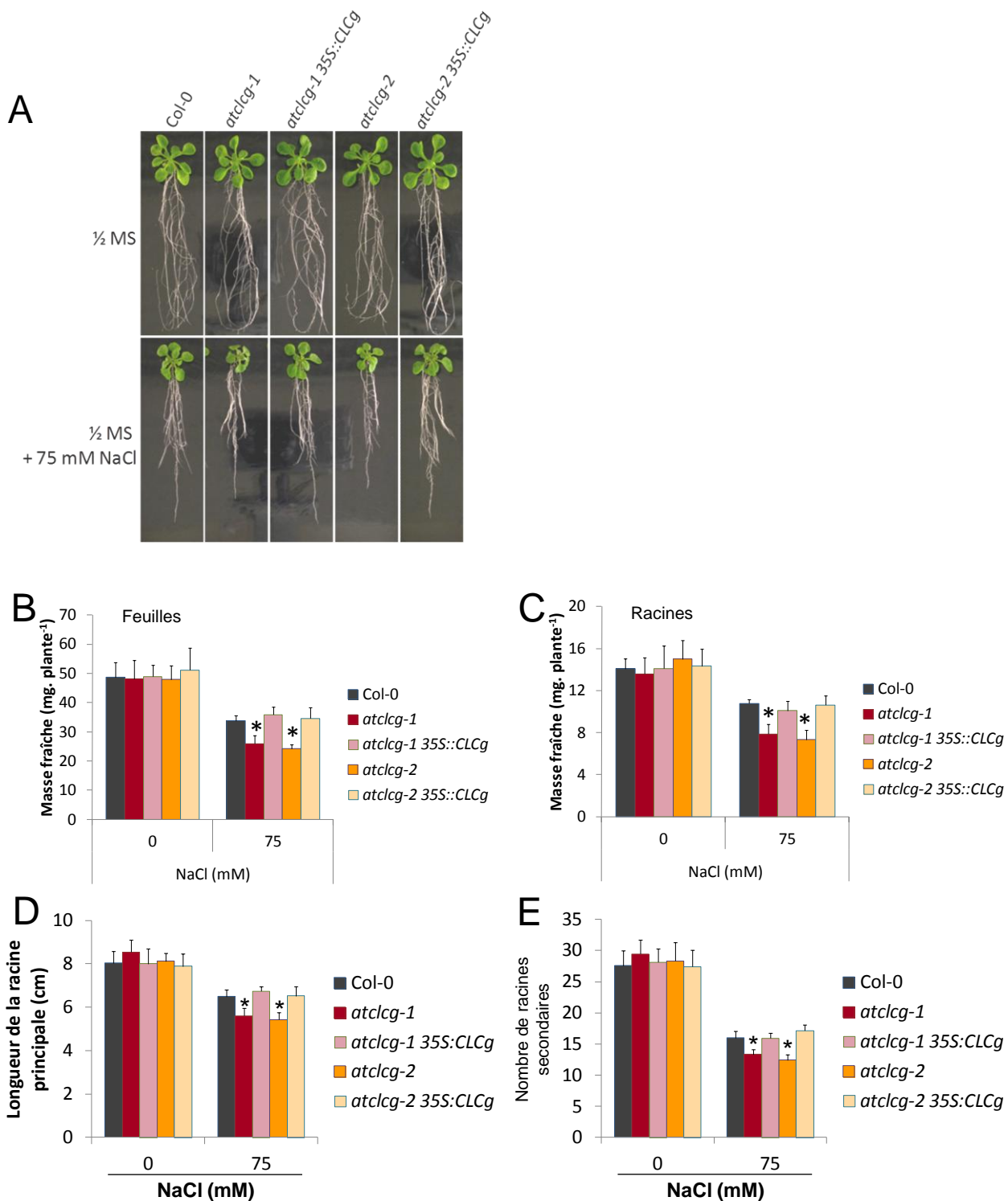


Figure R-9: Les mutants *atclcg* se développent moins bien sur NaCl que le sauvage

Les plantes sauvages (Col-0), mutants (*atclcg-1* et *atclcg-2*) et complétées (*atclcg-1 35S::CLCg* et *atclcg-2 35S::CLCg*) ont été cultivées 3 semaines *in vitro* sur du ½MS seul ou complété par 75 mM de NaCl (A). Les masses fraîches des parties foliaires (B) et racinaires (C), la longueur de la racine principale (D) et le nombre des racines secondaires (E) ont été mesurées. Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions indépendantes (n = 20). Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives ($P < 0,05$) entre les mutants et le sauvage (test de « student »).

constaté qu'aux concentrations 25 et 50 mM NaCl, il n'y a pas de différence significative de masse fraîche entre mutants et sauvages, alors qu'à la concentration de 100 mM NaCl, tous les génotypes semblent avoir arrêté leur croissance à l'état de deux cotylédons (données non montrées). C'est à la concentration de 75 mM NaCl que nous pouvons observer une différence phénotypique entre les plantes mutantes et sauvages (Figure R-9A). Cette différence est accentuée avec le temps : les plantes mutantes présentent un phénotype plus fort à 3 semaines qu'à 2 semaines.

Après 3 semaines de développement *in vitro* sur milieu contenant 75 mM de NaCl, nous avons pu voir une diminution significative de la biomasse chez les mutants par rapport au sauvage, aussi bien dans la partie aérienne (diminution de 15%; Figure R-9B) que dans la partie racinaire (diminution de 35%; Figure R-9C). Ce phénotype est absent chez les plantes complémentées. Malgré que les différences soient faibles entre le sauvage et les mutants, ce résultat est reproductible et significatif.

À noter que pour la suite des expériences, nous avons utilisé le milieu ½MS avec la concentration de 75 mM NaCl pour le milieu de stress salin et une croissance des plantes *in vitro* d'une durée de 3 semaines.

b) Une diminution de la longueur de racine principale et du nombre de racines secondaires

Pour étudier l'impact du stress NaCl sur la structure du système racinaire des plantes, les photos des boîtes de culture *in vitro* des plantes décrites dans l'expérience ci-dessus ont été prises, et ont ensuite été traitées par le logiciel EZ-Rhizo (Armengaud *et al.*, 2008) pour obtenir les données sur la longueur de la racine principale. Le nombre de racines secondaires a été compté manuellement. Après avoir analysé les données entre tous les génotypes, nous avons pu observer que sur milieu ½MS, il n'y a pas de différence de longueur pour la racine principale et pour le nombre de racines secondaires. Mais lorsque les plantes poussent sur milieu ½MS contenant 75 mM NaCl, les mutants présentent une diminution significative de 15% pour la longueur de la racine principale et de 18% pour le nombre de racines secondaires par rapport au sauvage (Figure R-9D et E). Les plantes complémentées présentent un phénotype similaire à celui du sauvage.

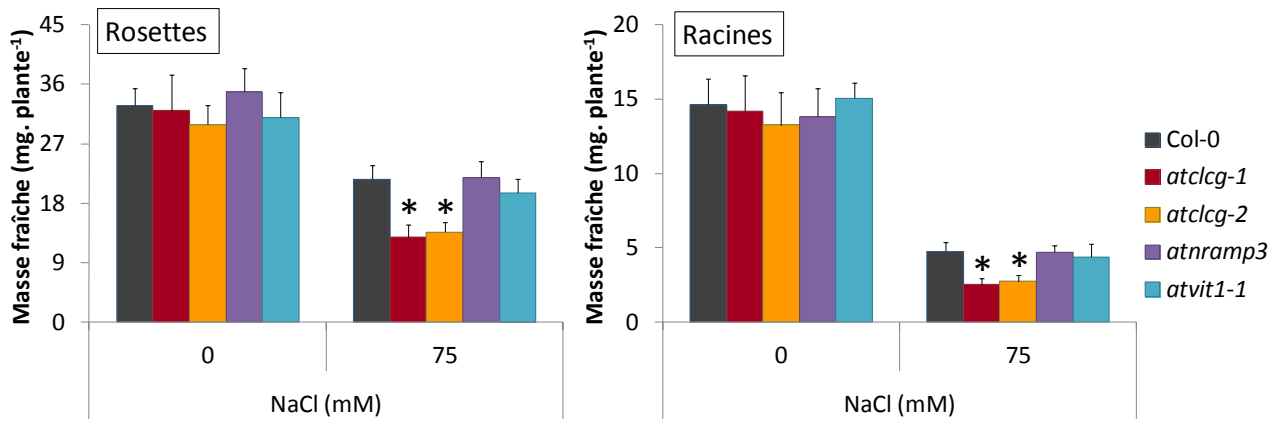


Figure R-10: Impact de l'ADN-T sur le phénotype NaCl

Les plantes sauvages Col-0, mutantes *atclcg*, *atnrap3* et *atvit1-1* sont cultivées *in vitro* sur milieu $\frac{1}{2}$ MS et $\frac{1}{2}$ MS ajouté 75 mM NaCl pendant 14 jours. Les masses fraîches des rosettes et des racines sont mesurées séparément. Cette expérience a été répétée 2 fois avec le nombre de plantes par génotype $n = 15$ à chaque fois. Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives entre les plantes mutantes *atclcg* et les plantes sauvages ($P < 0,05$, test de « student »).

IV.2.2. Le phénotype des plantes mutantes *atclcg* est spécifiquement lié à l'insertion de l'ADN-T

Pour mieux comprendre le rôle d'AtCLCg, nous avons voulu vérifier que le phénotype des plantes mutantes analysées ci-dessus était bien lié à la présence de l'insertion ADN-T dans le gène *AtCLCg* et non à l'ADN-T lui-même. Pour ce faire, nous avons choisi deux autres mutants d'ADN-T ayant le même type d'insertion d'ADN-T, dans le même fond d'accèsion Col-0, qui sont tout à fait différents par rapport au mutant *atclcg* et disponibles dans le laboratoire: *atnramp3* et *atvit1-1*. AtNRAMP3 est une protéine vacuolaire dans la famille NRAMP (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein) qui est responsable du transport du manganèse, du cadmium et du fer chez *A. thaliana* (Thomine *et al.*, 2000). AtVIT1 est un membre de la famille AtVIT (Vacuolar Iron Transporter) qui prend en charge la séquestration de fer dans la vacuole (Ravet *et al.*, 2009). Nous avons cultivé *in vitro* les plantes sauvages, les deux mutants *atclcg*, les mutants *atnramp3* et *atvit1-1* sur milieu de culture ½MS seul ou additionné de 75 mM NaCl. Après 14 jours de développement, nous avons mesuré la masse fraîche de ces plantes en séparant les racines et les feuilles. Le résultat est montré dans la figure R-10. Nous pouvons observer que sur le milieu ½MS, aucune différence entre ces génotypes n'a été repérée. Les masses fraîches des plantes mutantes sont toutes identiques à celles du sauvage. En revanche, sur milieu de stress salin avec la concentration de 75 mM NaCl, nous retrouvons le phénotype d'hypersensibilité au sel uniquement pour les mutants *atclcg*, tandis que les deux mutants *atnramp3* et *atvit1-1* montrent un phénotype similaire au sauvage Col-0. Cela veut dire que le phénotype observé chez les mutants *atclcg* est bien lié à la disruption de ce gène.

IV.2.3. Le phénotype des plantes mutantes *atclcg* est spécifiquement lié au chlorure

Les plantes mutantes *atclcg* présentent un phénotype quand elles se développent sur milieu en excès de sodium et chlorure. Nous avons voulu tester si le phénotype d'hypersensibilité des plantes mutantes *atclcg* est spécifiquement lié à la sensibilité au chlorure et non au sodium. Nous avons réalisé le test de stress salin en changeant le milieu ½MS contenant 75 mM NaCl par du ½MS contenant 75 mM KCl. Dans ce contexte, le milieu de croissance contient la même concentration d'anion chlorure que dans l'expérience précédente, sauf que Na⁺ a été remplacé par K⁺. Après trois semaines de développement, les plantes sur milieu ½MS sans KCl sont identiques les unes aux autres.

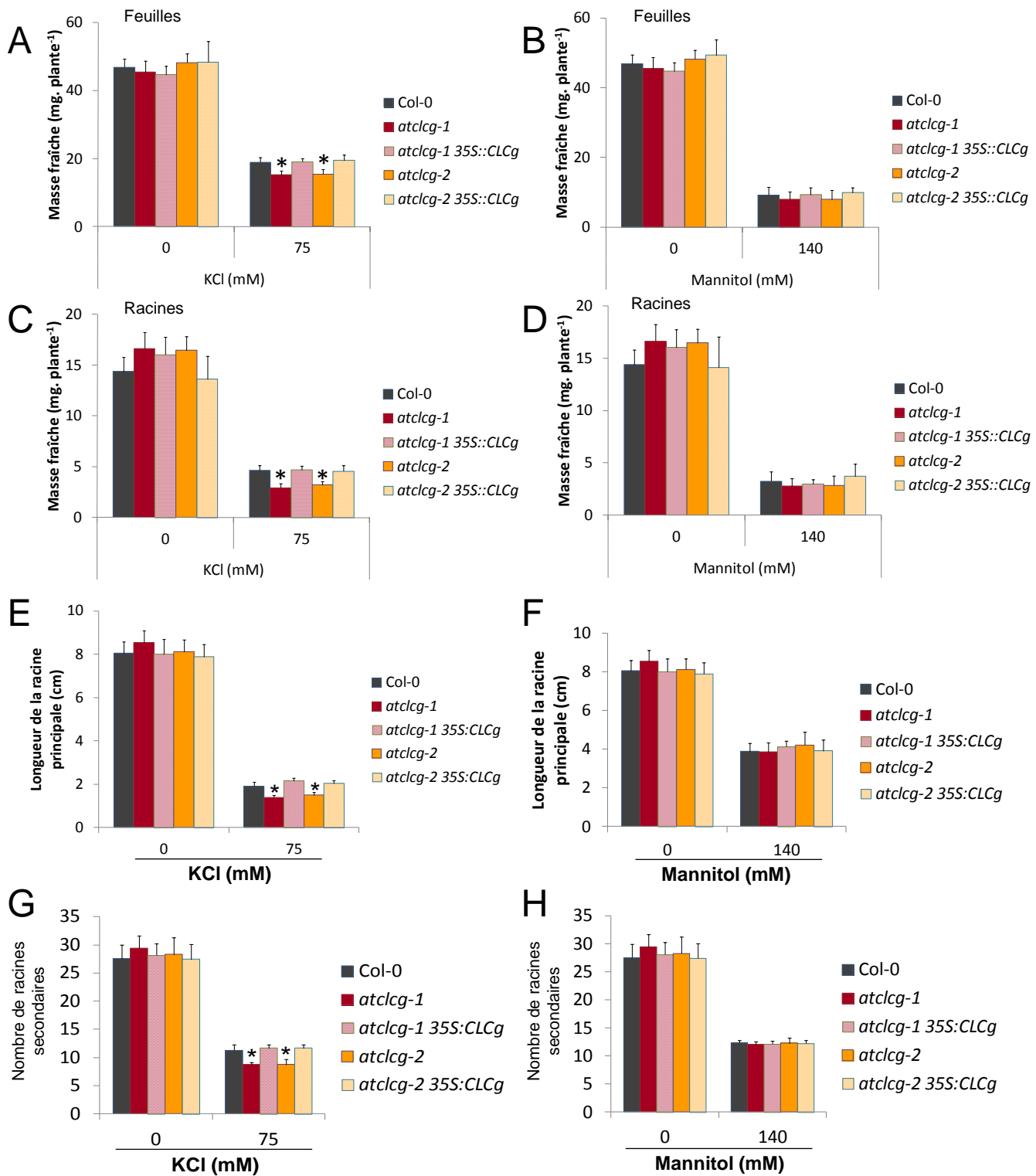


Figure R-11: Les mutants *atclcg* sont hypersensibles au KCl mais non au mannitol

La masse fraîche en milligrammes des parties foliaires (A et C), des partie racinaires (B et D), la longueur de la racine principale en centimètre (E et F) et le nombre de racines secondaires (G et H) ont été mesurés sur les plantes sauvages (Col-0), les mutants (*atclcg-1* et *atclcg-2*) et les plantes complétées (*atclcg-1 35S::CLCg* et *atclcg-2 35S::CLCg*) cultivées 3 semaines *in vitro* sur du ½MS seul ou complété par 75 mM de KCl, ou par 140 mM de mannitol. Le logiciel EZ-Rhizo a été utilisé pour mesurer la longueur de la racine principale, le nombre de racines secondaires a été compté manuellement. Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions indépendantes (n = 15). Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives ($P < 0,05$) entre les mutants et le sauvage (test de « student »).

Sur milieu ½MS avec 75mM de KCl, le même phénotype de diminution de biomasse chez les mutants *atclcg* a été observé (Figure R-11A et C). Quant à la longueur de la racine principale et au nombre de racines secondaires, quand les plantes se développent sur milieu ½MS avec ajout de 75 mM KCl, nous avons observé une diminution de ces données de l'ordre de 24% et de 22% chez les plantes mutantes (Figure R-11E et G). Les plantes complémentées présentent un phénotype comme le sauvage. Cependant, les ions K⁺ semblent plus toxiques que les ions Na⁺ car les plantes sur KCl présentent une croissance plus faible au niveau des feuilles et des racines que celles sur NaCl. Ce résultat suggère que le phénotype des mutantes *atclcg* est spécifiquement lié à l'anion chlorure.

Pour confirmer que le phénotype d'hypersensibilité des mutants *atclcg* sur milieu salin n'était pas dû au stress osmotique causé par NaCl ou KCl, des expériences identiques ont été réalisées sur milieu ½MS contenant du mannitol qui n'est pas métabolisé par les plantes et provoque une contrainte osmotique constante (Arenas-Huertero *et al.*, 2000). Les plantes sauvages Col-0, les mutants *atclcg-1*, *atclcg-2* et les plantes complémentées ont été cultivées pendant 3 semaines sur milieu ½MS additionné de 55, 110 ou 140 mM mannitol, générant une gamme d'osmolarité de 100, 155 ou 185 mOsm respectivement. La pression osmotique de la solution à 140 mM mannitol est équivalente à celle du milieu 75 mM NaCl ou 75 mM KCl (Figure R-11). Après 21 jours de développement dans la chambre de culture sur ces milieux, de manière générale, les plantes présentent une croissance très réduite par rapport à celles développées sur milieu ½MS seul. Ceci est caractéristique d'une perte d'eau par plasmolyse et déshydratation des cellules durant le stress osmotique (Flowers et Yeo, 1986 ; Munns, 2002). En analysant le résultat, nous pouvons constater qu'aucune différence significative de biomasse, de longueur de racine principale, de nombre de racines secondaires n'a été observée pour les deux mutants *atclcg* par rapport au sauvage lorsque les plantes ont poussées sur milieu ½MS additionné de différentes concentrations de mannitol (Figure R-11B, D, F et H). Nous pouvons en conclure que la diminution de la biomasse observée sur NaCl chez les mutants *atclcg* est liée à un stress anionique et non osmotique.

IV.2.4. Le contenu des anions chez les plantes mutantes est modifié par rapport au sauvage

Lorsque les plantes poussent sur milieu de stress NaCl, des mécanismes physiologiques se mettent en place pour permettre à la plante de tolérer ce stress, surtout

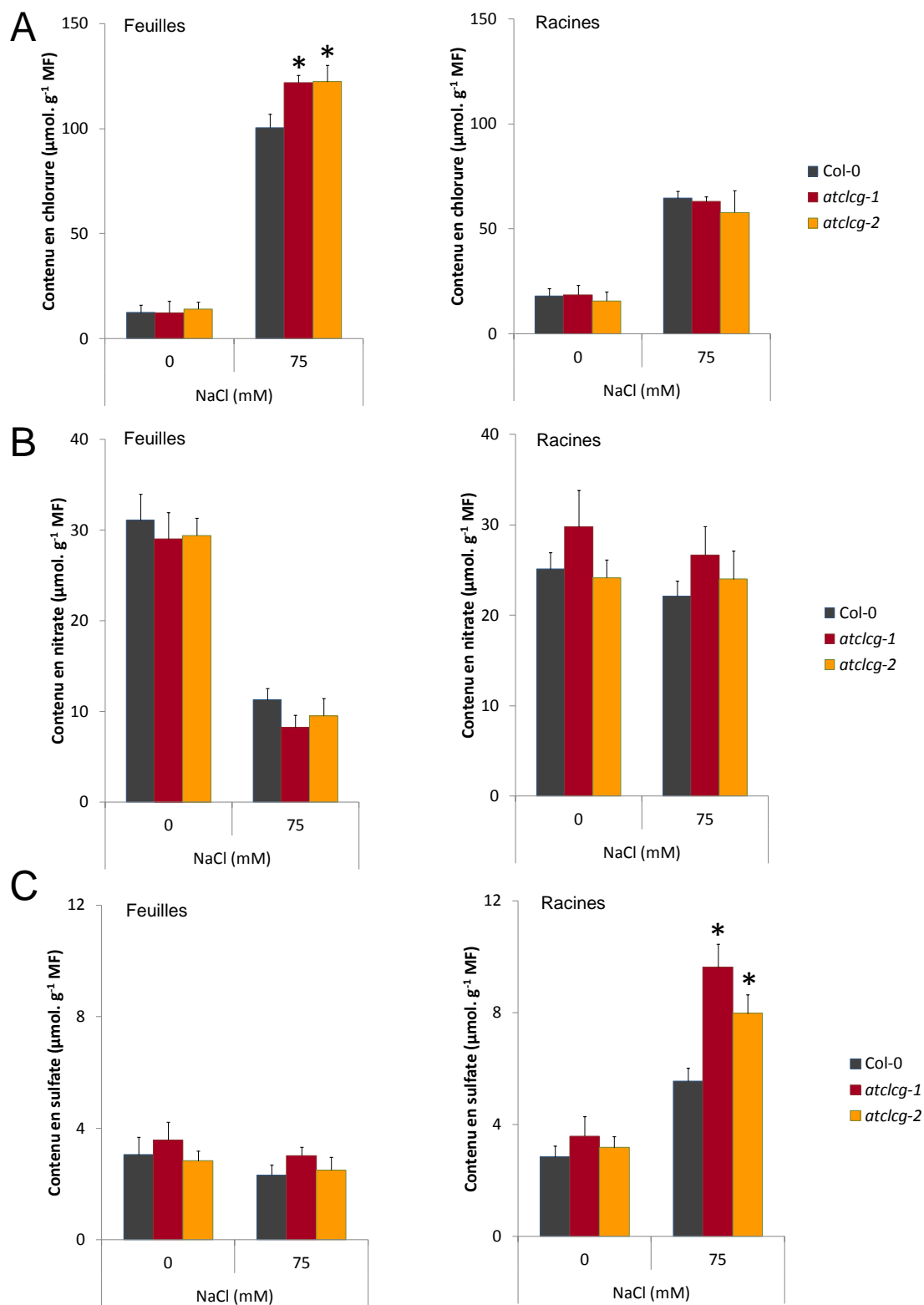


Figure R-12: Contenu en anions des plantes sauvages et mutantes *atclcg* en réponse au NaCl

Les contenus en chlorure (A), nitrate (B) et sulfate (C) en μmol par gramme de masse fraîche (MF) ont été mesurés dans les parties foliaires et racinaires des plantes sauvages et mutantes après 21 jours de développement sur milieu de culture *in vitro* $\frac{1}{2}\text{MS}$ et $\frac{1}{2}\text{MS}$ contenant 75 mM de NaCl. Les valeurs sont les moyennes des trois expériences indépendantes avec le nombre de plantes pour chaque génotype sur chaque condition de culture $n = 15$. Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives entre le traitement NaCl et le témoin ($P < 0,05$, test de « student »)

aux fortes concentrations des ions Na^+ et Cl^- dans la feuille où a lieu la photosynthèse (Munns et Tester, 2008). Nous avons effectué des dosages de contenus en anions inorganiques sur des plantes sauvages et mutantes cultivées *in vitro* en présence ou non de 75 mM de NaCl pour voir s'il y avait des différences. Nous avons voulu spécifiquement mesurer les quantités de chlorure, nitrate et sulfate. La concentration de phosphate a été mesurée également mais pour des raisons de dilutions des extraits végétaux cohérentes avec la gamme des autres anions, nous n'avons pas pu obtenir les valeurs de concentration pour cet anion. Ces dosages ont été réalisés par S. Citerne de la plateforme Chimie du Végétal (PFCV) de l'Institut national de la recherche agronomique de Versailles.

a) Contenu en chlorure

En analysant les résultats obtenus lorsque les plantes ont poussé sur milieu $\frac{1}{2}$ MS, nous pouvons constater qu'aucune différence de contenu en chlorure dans les parties foliaires et racinaires n'a été observée entre le sauvage Col-0 et les mutants *atclcg*. Par contre, lorsqu'elles ont poussées sur milieu $\frac{1}{2}$ MS additionné de 75 mM NaCl, nous avons observé qu'il y a une sur-accumulation de 21% de chlorure ($121,97 \pm 3,6$ μmol par gramme de matière fraîche) dans la partie foliaire chez les plantes mutantes *atclcg* par rapport au sauvage Col-0 ($100,58 \pm 6,4$ μmol par gramme de matière fraîche). En revanche, dans la partie racinaire, le contenu en chlorure de ces trois génotypes est identique. Le contenu en chlorure est de $64,66 \pm 3,2$ μmol par gramme de matière fraîche pour le sauvage Col-0, de $63,02 \pm 2,3$ μmol par gramme de matière fraîche pour le mutant *atclcg-1* et $57,94 \pm 10,2$ μmol par gramme de matière fraîche pour le mutant *atclcg-2* (Figure R-12A). Ces valeurs ne sont pas statistiquement différentes.

b) Contenu en nitrate

En ce qui concerne le contenu en nitrate dans la partie foliaire, ce dernier est diminué de l'ordre de 60% au cours de la croissance des plantes sur milieu de stress NaCl mais aucune différence significative n'est observée entre le sauvage et les mutants. Quant à la partie racinaire, également aucun changement significatif de contenu en nitrate n'a été observé entre les génotypes, que ce soit sur milieu $\frac{1}{2}$ MS avec 75 mM de NaCl ou sur milieu de contrôle $\frac{1}{2}$ MS (Figure R-12B). Combinant ce résultat avec ceux du §IV.1, nous pourrions sûrement conclure qu'AtCLCG ne joue aucun rôle dans l'homéostasie du nitrate de la plante dans les conditions testées.

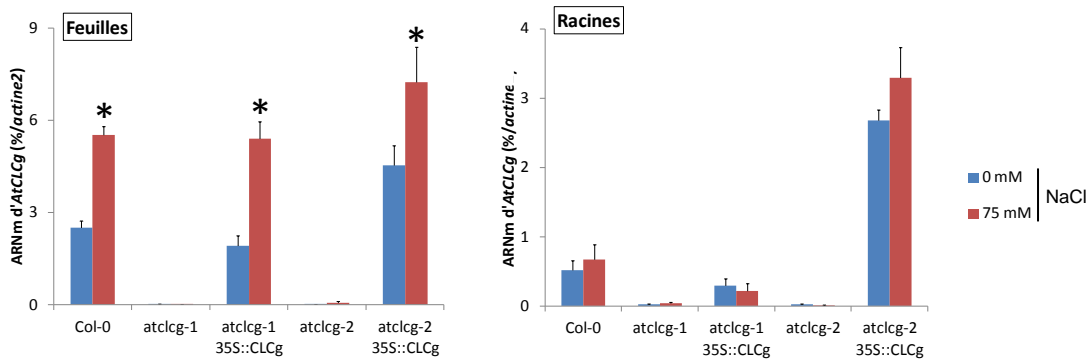


Figure R-13: Expression d'*AtCLCg* en réponse au stress salin

Les plantes sauvages d'accession Col-0 âgées de trois semaines ont été cultivées *in vitro* sur milieu $\frac{1}{2}$ MS et sur milieu $\frac{1}{2}$ MS additionné de 75 mM NaCl. Les feuilles et les racines ont été récupérées séparément. La quantification d'ARNm d'*AtCLCg* a été réalisée par qRT-PCR avec les amorces qgS et qgAS. Les valeurs sont les moyennes de 3 expériences indépendantes. L'astérisque indique la différence statistiquement significative entre la condition de stress NaCl et la condition de contrôle ($P < 0,05$, test de « student »).

c) Contenu en sulfate

Lorsque les plantes se développent sur milieu $\frac{1}{2}$ MS, les contenus en sulfate chez tous les génotypes sont identiques, que ce soit dans les parties foliaire ou racinaire. Quand les plantes poussent sur milieu $\frac{1}{2}$ MS avec 75 mM NaCl, nous pouvons observer qu'il y a une sur-accumulation de sulfate dans la partie racinaire de 70% et 40% respectivement chez les mutants *atclcg-1* et *atclcg-2*, par rapport au sauvage Col-0. Aucune différence significative de contenu en sulfate entre ces génotypes n'a été observée dans la partie foliaire (Figure R-12C).

IV.3. Analyse de l'expression de certains gènes en condition de stress NaCl

Sous la condition de stress NaCl, une approche transcriptomique a révélé que les expressions de 16697 et 15920 gènes sont modulées chez Arabidopsis après 2 et 10 heures sur sel respectivement (Matsui *et al.*, 2008). Cela veut dire que, dans cette condition de stress, la plante mobilise fortement sa machinerie génétique pour s'adapter et/ou tolérer cette contrainte abiotique. Afin de mieux comprendre le phénotype des mutants *atclcg*, l'expression de certains gènes a été analysée en réponse au stress NaCl chez les différents génotypes.

IV.3.1. *AtCLCg* est induit par le stress salin

Au cours de son étude sur le rôle d'*AtCLCc* dans le mouvement du stomate et dans le stress salin, Mathieu Jossier a montré que, non seulement l'expression d'*AtCLCc* est induite en réponse au stress NaCl, mais également celles d'*AtCLCg* et *AtCLCd*, et dans la partie foliaire uniquement (Jossier *et al.*, 2010). Dans son expérience, il a utilisé des plantes sauvages d'accession WS et testé le stress NaCl à 25 et 50 mM NaCl. Pour notre expérience, nous voudrions savoir dans notre condition de stress salin *in vitro* à 75 mM NaCl et avec l'accession Col-0, si ces résultats se confirment. Grâce à la technique de qRT-PCR, nous avons quantifié l'expression d'*AtCLCg* dans les feuilles et les racines. Comme le montre le résultat dans la figure R-13, sur milieu $\frac{1}{2}$ MS, le niveau d'expression d'*AtCLCg* est beaucoup plus fort dans la feuille que dans la racine. Sur milieu NaCl, l'expression d'*AtCLCg* dans la racine reste identique au contrôle. Le niveau d'ARNm d'*AtCLCg* augmente de 200% en réponse au NaCl dans les feuilles. Ceci confirme le résultat de Mathieu Jossier et permet en outre d'élargir la conclusion que, non seulement

dans l'accession WS sur des concentrations du NaCl de 25 et 50 mM, mais aussi dans l'accession Col-0 à la concentration du NaCl de 75 mM, l'expression d'*AtCLCg* est induite fortement dans la partie foliaire et non dans la partie racinaire.

IV.3.2. Régulation post-transcriptionnelle d'*AtCLCg* en réponse au NaCl

Au cours du test de stress NaCl comme décrit ci-dessus, nous avons pu observer que les plantes complémentées *atclcg 35S::AtCLCg* restaurent le phénotype du sauvage. Nous avons vérifié la présence des transcrits d'*AtCLCg* dans ces plantes et obtenu des résultats inattendus montrés dans la figure R-13. D'abord dans la partie racinaire, nous pouvons toujours constater la présence des transcrits d'*AtCLCg* dans les plantes complémentées et bien évidemment dans les plantes sauvages où l'expression d'*AtCLCg* n'est pas induite par NaCl. Chez les mutants *atclcg-1* et *atclcg-2*, aucun transcrit d'*AtCLCg* n'a été détecté, ceci prouve que nous obtenons des mutants corrects. Les niveaux d'ARNm d'*AtCLCg* racinaire chez les plantes complémentées *atclcg-1 35S::AtCLCg* et *atclcg-2 35S::AtCLCg* restent les mêmes que ce soit en présence ou non de NaCl. Alors que dans la partie foliaire, nous pouvons observer que, chez le sauvage Col-0, *AtCLCg* est surexprimé chez les plantes qui poussent sur NaCl. Mais lorsqu'on regarde les plantes complémentées *atclcg-1 35S::AtCLCg* et *atclcg-2 35S::AtCLCg*, le niveau d'ARNm d'*AtCLCg* est significativement supérieur chez celles qui se développent sur milieu NaCl comparées à celles qui poussent sur $\frac{1}{2}$ MS seul. Lorsque les plantes poussent sur milieu NaCl, les niveaux d'ARNm sont respectivement d'environ 100% et 50% de plus chez *atclcg-1 35S::CLCg* et *atclcg-2 35S::CLCg* que chez les plantes complémentées qui se développent sur milieu $\frac{1}{2}$ MS sans NaCl.

Chez les eucaryotes en général, un ARN messager n'ayant pas subi de modification post transcriptionnelle aura une durée de vie relativement courte du fait de la présence des RNAses, protéines de dégradation des ARNs. Les ARNs transcrits ne sont que rarement fonctionnels ou prêts à être traduits, un certain nombre de modifications de la stabilité des ARNm doivent être effectuées, ou bien les ARNm sont dégradés spécifiquement par différents mécanismes (Ambrosone *et al.*, 2012 ; Sunkar *et al.*, 2012). Dans ce contexte, nous pouvons établir une hypothèse : quand les plantes complémentées se développent sur milieu stress NaCl, elles doivent subir certaines contraintes abiotiques. Pour des raisons inconnues la protéine *AtCLCg* devient importante et/ou utile pour la réponse de la plante

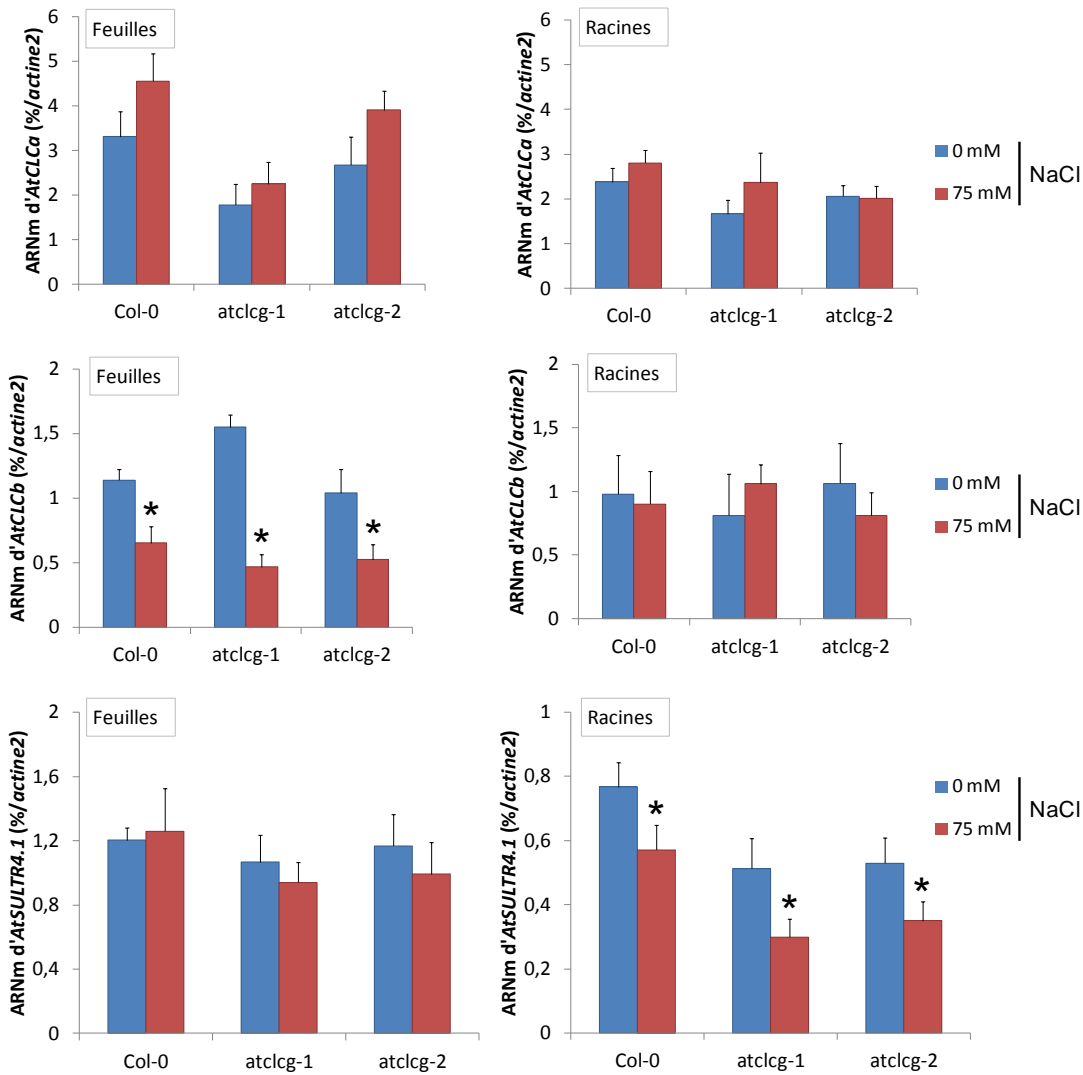


Figure R-14: La réponse d'*AtCLCa*, d'*AtCLCb* et d'*AtSULTR4.1* au stress NaCl en absence d'*AtCLCg*

Les plantes sauvages d'accèsion Col-0, mutantes *atclcg-1* et *atclcg-2* âgées de trois semaines sont cultivées *in vitro* sur milieu ½MS et sur milieu ½MS additionné de 75 mM NaCl. La matière végétale est récupérée en séparant les feuilles des racines. Les ARNm sont extraits des feuilles ou des racines. La quantité d'ARNm est détectée par qRT-PCR. Les valeurs sont les moyennes de 3 expériences indépendantes. Les astérisques indiquent la différence statistiquement significative entre la condition de stress NaCl et la condition de contrôle ($P < 0,05$, test de « student »).

vis-à-vis à ces contraintes, en conséquence la stabilité des ARNm d'*AtCLCg* est renforcée et finalement les transcrits d'*AtCLCg* deviennent abondants.

IV.3.3. Expression des autres *AtCLCs*

Etant un échangeur de proton / nitrate à travers le tonoplaste, l'expression d'*AtCLCa* est induite par l'augmentation de nitrate dans le milieu de croissance (Geelen *et al.*, 2000) mais reste stable en réponse au stress NaCl chez l'accession WS (Jossier *et al.*, 2010). Nous avons confirmé dans un premier temps que les mêmes résultats étaient observés dans nos conditions, au niveau des parties foliaires et racinaires. À 75 mM NaCl, *AtCLCa* de l'accession Col-0 répond de la même manière que dans l'accession WS par des concentrations de NaCl inférieures à la nôtre (25 et 50 mM NaCl) et, surtout, il n'y a pas de différence significative entre le sauvage et les mutants (Figure R-14).

Pour *AtCLCb*, dans son étude sur l'accession WS, Mathieu Jossier a montré que ce gène est surexprimé dans la partie racinaire 2 à 3 fois de plus lorsque les plantes poussent sur milieu de stress NaCl, mais son expression semble être réprimée dans la partie foliaire en réponse au NaCl (Jossier *et al.*, 2010). Quant à notre résultat, nous n'avons pu voir l'induction de ce gène en réponse au stress salin à 75 mM NaCl ni dans les racines chez le sauvage Col-0 ni chez les mutants *atclcg*. Par contre, dans la partie foliaire, nous avons observé une répression d'expression significative de 40% chez Col-0. Cette diminution chez les mutants est encore accentuée, jusqu'à 50% dans le mutant *atclcg-2* et 60% dans le mutant *atclcg-1* (Figure R-14) mais l'expression d'*AtCLCb* reste indifférente entre le sauvage et les mutants. Cette différence de résultat entre le nôtre et celui de Mathieu Jossier pourrait être expliquée par la différence d'accessions d'*Arabidopsis*. Dans son travail de thèse, Tangirala (2011) a montré que Ler-0 est l'accession la plus sensible à un stress salin suivie par WS et Col-0.

Nous avons particulièrement étudié la réponse d'*AtCLCc* au stress NaCl dans notre condition de culture, ce résultat sera présenté et discuté plus amplement dans le chapitre II.

IV.3.4. *AtSULTR4.1* et *4.2*

Lors de l'analyse des contenus en anions inorganiques, nous avons observé une sur-accumulation de sulfate dans les racines chez les plantes mutantes *atclcg* par rapport au sauvage Col-0 au cours du stress NaCl. Nous avons voulu regarder si cette différence pourrait s'expliquer par une différence d'expression de la famille d'*AtSULTR* (pour Sulfate

Transporters) codant des transporteurs à l'origine de la sortie du SO_4^- de la vacuole (Kataoka *et al.*, 2004). Nous avons décidé de suivre l'expression de deux membres de cette famille, *AtSULTR4.1* et *AtSULTR4.2*, et avons obtenu le même profil d'expression pour ces deux gènes. Nous présentons ici seulement le résultat concernant l'expression d'*AtSULTR4.1* (Figure R-14). Dans la partie foliaire, les expressions d'*AtSULTR4.1* et *4.2* restent stables entre la plante sauvage et les mutantes, quelque soit le milieu de culture. Dans les racines, quand les plantes sauvages poussent sur milieu NaCl, nous observons une répression significative de 20% d'expression d'*AtSULTR4.1*, cette répression est de 30% chez les mutants. Généralement, les niveaux d'expression d'*AtSULTR4.1* et *4.2* chez les plantes mutantes sont inférieurs de 30% par rapport à ceux chez le sauvage. Lorsque les plantes poussent sur milieu de stress NaCl, cet écart monte à 50% chez le mutant *atclcg-1* et à 40% chez le mutant *atclcg-2* (Figure R-14). Nous pouvons constater que cette répression d'expression d'*AtSULTR4.1* et *4.2* pourrait être en partie responsable de l'accumulation de sulfate racinaire chez les mutants, comme montré dans §IV.2.4.c.

Conclusion du chapitre I

Au début de ce travail, nous avons du mal à comprendre pour quelle raison il nous a été impossible de cloner l'ADNc d'*AtCLCg* complet comme prédit par TAIR. Au cours de trois clonages indépendants et dans toutes les colonies testées positives, nous n'avons trouvé que des ADNc différents par rapport à l'ADNc prédit. Cependant, nous avons cloné 4 formes différentes d'ADNc et nous ne pouvons pas dire exactement quelle forme est responsable du phénotype de la plante.

D'autres cas similaires au nôtre ont été rapportés dans la littérature. Par exemple, Davenport (2002) a rencontré des difficultés dans ses travaux pour caractériser les récepteurs de glutamate AtGLR (pour GLutamate Receptor) chez *Arabidopsis* à cause de la toxicité de ces protéines dans *Escherichia coli* et dans les cellules d'hôtes eucaryotes. Ils ont montré que les ADNc des *AtGLR* peuvent être transcrits et traduits dans *E. coli*. Les protéines formées sont toxiques pour la bactérie car elles déséquilibrent la balance ionique cellulaire d'où l'impossibilité de la bactérie à se multiplier. Ce problème de toxicité peut être contourné par l'utilisation d'ADN génomique qui contient des introns et produit des protéines tronquées ou non fonctionnelles chez *E. coli*. Dans notre cadre de travail, nous avons choisi cette stratégie pour pouvoir étudier *AtCLCg*.

En ce qui concerne les formes d'ADNc (-5) et ADNc (+1), les protéines fusions GFP::*AtCLCg* ne donnent pas de signal de fluorescence lorsqu'elles sont exprimées en protoplastes (Figure R-3E et F). Nous pouvons établir l'hypothèse suivante: soit la protéine fusion GFP::*AtCLCg* a été dégradée, soit la protéine GFP a été traduite mais est non fluorescente à cause de la perturbation majeure de la protéine tronquée *AtCLCg*. Dans tous les cas, pour mieux comprendre le rôle de ces deux formes d'ADNc, il nous faudrait réaliser un test par « Western blot » en utilisant l'anticorps anti-GFP. Si nous ne pouvons pas détecter la protéine, cela signifie que ces deux formes d'ADNc ne sont pas fonctionnelles et elles n'ont pas d'effet au niveau cellulaire. Au contraire, si nous détectons la protéine, il serait intéressant d'introduire ces deux formes d'ADNc dans les plantes mutantes *atclcg* pour pouvoir analyser leur fonction.

La présence des deux formes d'ADNc (+72) et (+14) est liée à un problème d'épissage de l'intron 6. Dans la littérature, il existe des observations similaires à notre cas. Cailliatte et collaborateurs (2009), par exemple, ont montré la présence de 2 ADNc d'*AtNRAMP6* chez *Arabidopsis*, l'un correspondant à l'ADNc prédit, l'autre dans lequel le sixième intron (I6) a été retenu. Dans cette dernière forme prédominante, le maintien de l'intron 6 introduit un codon stop à la position de 36 nucléotides en aval de la jonction entre le sixième exon et le sixième intron. Dans notre clonage, pour les formes d'ADNc (+72) et (+14), il apparaît que nous avons rencontré le même phénomène (Figure R-2E). Malgré leur faible proportion dans la population d'ADNc total, la détection de ces 2 formes ne semble pas être due à des artefacts de clonage car elles correspondent au maintien partiel ou total de l'intron 6 (Figure R-2B et C). De plus, l'analyse des résultats sur les protéines fusions GFP::*AtCLCg* dans les protoplastes a montré que les protéines issues de ces deux formes d'ADNc sont bien présentes : seule la protéine fusion résultant du vecteur pMDC43::GFP-ADNc(+72) a conservé la capacité de s'adresser au tonoplaste (Figure R-3C). Donc, pour pouvoir vraiment juger du rôle de ces formes d'ADNc dans la population d'ADNc, les vecteurs d'expression pAlligator2 contenant ces deux formes d'ADNc, sous le contrôle du double promoteur 35S, ont été introduits chez les plantes mutantes *atclcg* via *Agrobacterium tumefaciens*. Nous avons obtenu les plantes T1 mais l'investigation n'a pas été suivie plus loin pour l'instant par manque de temps.

La caractérisation d'*AtCLCg* montre l'importance de cette protéine en réponse au stress NaCl. En effet, par la caractérisation phénotypique des mutants *atclcg*, nous avons trouvé que ces plantes présentent un phénotype d'hypersensibilité au NaCl comparé au sauvage (Figures R-8 et R-9). L'analyse plus approfondie de ces mutants a montré que l'hypersensibilité au NaCl était corrélée à une sur-accumulation de chlorure dans les feuilles où *AtCLCg* est plus exprimé et où son expression est induite en réponse au NaCl. Cette augmentation du contenu en chlorure est probablement toxique pour la plante et peut expliquer le phénotype des plantes mutantes sur milieu de stress NaCl. Cette protéine joue un rôle essentiel dans la plante en réponse au stress NaCl, surtout au niveau des feuilles où nous avons une sur-accumulation de Na⁺ et Cl⁻ au cours du stress.

Enfin, nos résultats préliminaires montrent également que l'ARNm d'*AtCLCg* serait régulé post-transcriptionnellement en réponse au NaCl. Pour confirmer ces résultats, il nous faudrait d'abord réaliser le même type d'analyse sur toutes les lignées complémentées

atclcg 35S::CLCg obtenues. Ensuite, il serait nécessaire de remplacer le promoteur 35S par un promoteur moins fort tel que celui de l'*Ubiquitine (Ubi)*, pour voir si l'on obtient toujours le même phénomène chez les plantes complémentées *atclcg Ubi::AtCLCg*. Ce type de régulation avec lequel notre résultat est très similaire existe dans la littérature. En effet, Shi et collaborateurs ont montré que chez *Arabidopsis*, l'ARNm d'*AtSOS1* (pour Salt Overly Sensitive 1) pourrait être intrinsèquement instable mais que sa stabilité est augmentée en réponse au stress salin (Shi *et al.*, 2003). Plus tard, Chung *et al.* (2008) ont également montré que l'augmentation des transcrits d'*AtSOS1* dans les plantes complémentées *atsos1 35S::AtSOS1* en réponse au traitement de 100mM de NaCl est due à une stabilité de l'ARNm. Toutes ces données nous font envisager des études plus approfondies pour mieux comprendre ce mécanisme de régulation post-transcriptionnelle d'*AtCLCg* par des expériences telles que : l'étude du niveau de transcrits d'ARNm d'*AtCLCg* chez les plantes complémentées en réponse aux autres sortes de stress comme H₂O₂, mannitol ou KCl etc. ; l'étude du niveau de transcrits d'ARNm d'*AtCLCg* chez les plantes complémentées en réponse au NaCl à des temps différents car notre résultat préliminaire a été obtenu après une durée de 3 semaines de stress ; la recherche de la région responsable de la stabilité de l'ARNm. Il a été montré que soit les parties UTR, soit l'interaction avec les microARNs interviendraient dans ces processus (Shi *et al.*, 2000). Il serait intéressant de mettre sous contrôle du promoteur 35S le gène *AtCLCg* contenant la partie 3'UTR ou 5'UTR pour déterminer le taux de décroissance des quantités d'ARNm d'*AtCLCg*.

Chapitre II - Relation fonctionnelle entre AtCLCg et AtCLCc

I. Problématique de l'étude de la redondance entre AtCLCg et AtCLCc

Avant mon arrivée au laboratoire, Mathieu Jossier a montré qu'AtCLCc est un transporteur tonoplastique impliqué dans la tolérance au stress NaCl (Jossier *et al.*, 2010). Au cours de notre projet de recherche, nous avons également montré qu'AtCLCg était localisé au tonoplaste et répondait au stress NaCl. Alors qu'AtCLCc et AtCLCg sont impliqués dans la réponse au même stress, les deux protéines sont présentes dans des tissus différents dans les feuilles. *AtCLCc* s'exprime très fortement dans les cellules de garde du stomate et dans le pollen, tandis que l'expression d'*AtCLCg* est très forte dans les cellules du mésophylle (voir chapitre précédent; Jossier *et al.*, 2010). Dans ce contexte, nous nous sommes posés des questions : existe-il une relation entre AtCLCc et AtCLCg ? Est-ce AtCLCc et AtCLCg ont des redondances de fonction ?

Pour ce faire, nous avons étudié *in silico* ces deux protéines pour montrer leurs points communs et leurs différences. Ensuite, nous avons généré le double mutant *atclcc/atclcg* pour analyser la redondance fonctionnelle.

II. Comparaison *in silico* des séquences d'acides aminés d'AtCLCg et AtCLCc

Comme nous l'avons présenté dans l'introduction, chaque pore de la protéine CLC est formé par une sous-unité séparée, construisant une protéine membranaire homodimère. Chaque sous-unité est composée de deux moitiés de séquences d'acides aminés qui s'ancrent dans la membrane avec des orientations opposées (Dutzler *et al.*, 2002). Il existe dans chaque pore trois sites de liaison avec les anions S_{ext} , S_{cen} et S_{int} , comme décrit dans l'introduction. Nous avons analysé les résidus conservés de ces deux protéines en suivant ces trois sites. Ainsi, les séquences d'acides aminés du canal chlorure CLC-0, des transporteurs Cl^- / H^+ de *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* StCLC (Dutzler *et al.*, 2002) et d'*Escherichia coli* EcCLC ou CLC-ec1 (Dutzler *et al.*, 2002) ont été prises comme modèles. La séquence d'échangeur Cl^- / H^+ de *Cyanidioschyzon merolae* CmCLC (Feng *et al.*, 2010), la seule protéine CLC eucaryote cristallisée, a été incluse pour l'analyse.

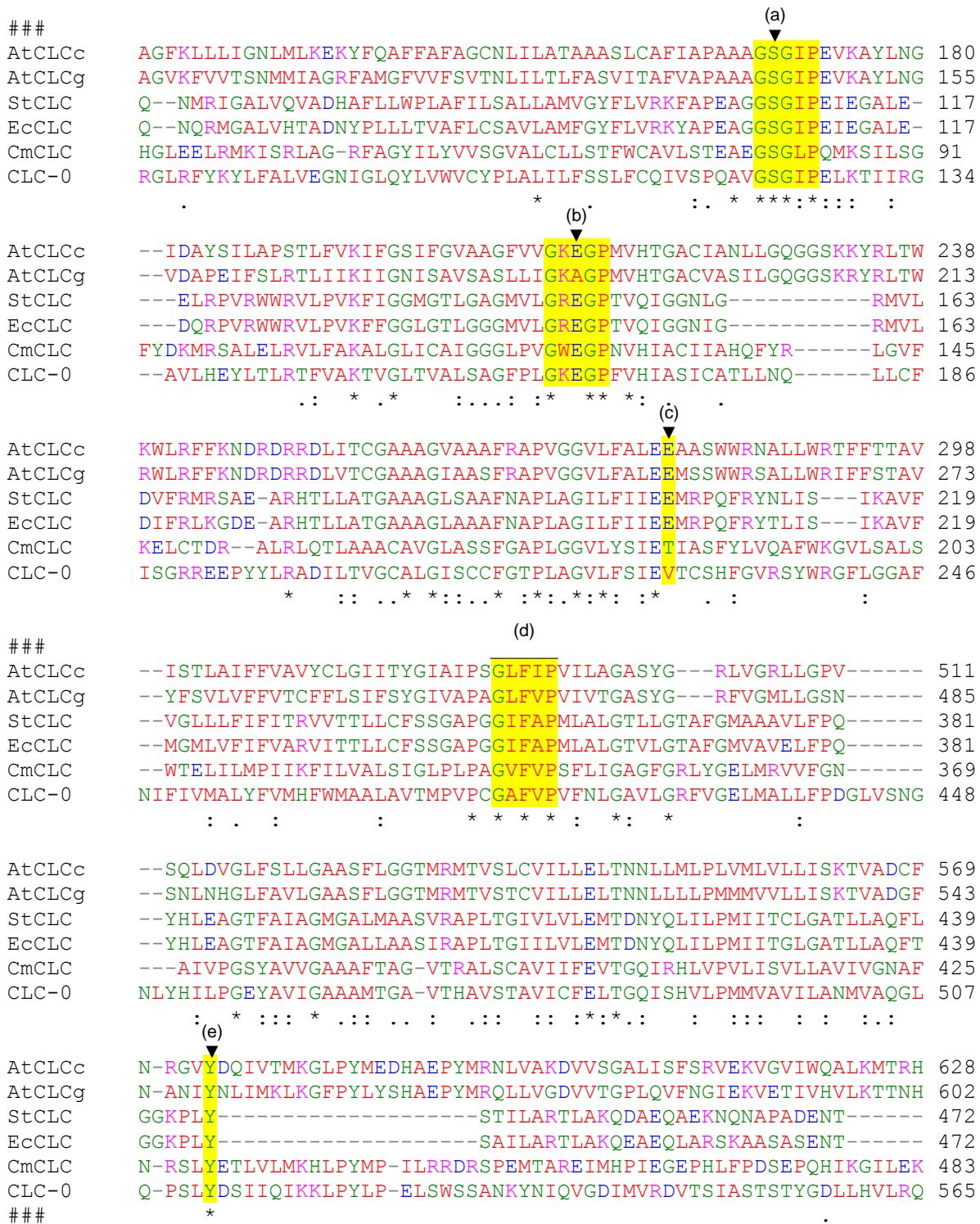


Figure R-15: Comparaison des séquences d'acides aminés d'AtCLCg et d'AtCLCc

Les séquences d'acides aminés viennent de TAIR. L'alignement a été réalisé avec ClustalW2. Les soulignés jaunes indiquent les séquences d'acides aminés conservées: (a) séquence d'acides aminés GSGIP du motif de sélectivité où la présence d'une sérine confère une sélectivité en faveur du chlorure tandis que la présence d'un proline confère une sélectivité en faveur du nitrate, (b) acide aminé glutamate « gating » ou glutamate externe (Glu_{ext}), (c) acide aminé glutamate « proton » ou glutamate interne (Glu_{in}), (d) séquence d'acides aminés GXFXP et (e) acide aminé tyrosine centrale « Tyr_{cen} ». Le signe (###) correspond aux acides aminés qui ont été coupés de la séquence d'acide aminé étudiée.

Les séquences d'acides aminés ou les résidus conservés qui jouent des rôles cruciaux dans la formation du pore ainsi que la sélectivité de la protéine ont été soulignées dans la figure R-15.

II.1. Le site de liaison avec les anions S_{ext}

Le site de liaison externe avec les anions comprend le Glu_{ext} . Nous avons analysé la présence ou l'absence de ce « glutamate gating » ou « glutamate externe - Glu_{ext} », sachant qu'il joue un rôle très important dans l'ouverture et la fermeture du pore. Dans la plupart des protéines CLCs, telles que chez CLC-0, chez les CLCs humains (de hCLC1 à hCLC5), chez les CLCs bactériens (EcCLC = CLC-ec1, StCLC) ou chez les CLCs végétaux, cette position présente un glutamate. Chez CLC-0, ce glutamate est à la position 166 (E166 = Glu_{ext}). Chez EcCLC et StCLC, cet acide aminé glutamate est à la position 148 (E148 = Glu_{ext}), chez CmCLC ce glutamate est à la position 124 (E124 = Glu_{ext}). Chez AtCLCc, nous pouvons trouver que c'est un glutamate, E212 = Glu_{ext} , à cette position. Mais lorsqu'on analyse la séquence d'AtCLCg, nous pouvons constater qu'à cette position est présente une alanine (A187). Autrement dit, cet acide aminé important est absent chez AtCLCg.

II.2. Le site de liaison avec les anions S_{cen}

Comme décrit dans l'introduction, le site S_{cen} comprend le motif de sélectivité « GP/SGIP », acide aminé Tyr_{cen} et le motif conservé « GXFXP » dont le rôle exact reste inconnu.

D'abord, la séquence du motif de sélectivité « GP/SGIP » a été analysée sachant que la présence d'une proline (P) à cette position confère plutôt une sélectivité pour le nitrate tandis qu'une sérine (S) augmente la sélectivité pour le chlorure (Bergsdorf *et al.*, 2009 ; Zifarelli et Pusch, 2009 ; Wege *et al.*, 2010). Nous trouvons dans ce motif de sélectivité la présence d'une sérine chez CLC-0 (S123), EcCLC (S107), StCLC (S107) et CmCLC (S80). De même pour AtCLCg et AtCLCc, une sérine est présente à cette position (S144 pour AtCLCg et S169 pour AtCLCc). Cela nous suggère que la sélectivité d'AtCLCg s'effectuerait en faveur des anions chlorures.

Ensuite, nous avons analysé le résidu conservé « GXFXP ». Il est très conservé chez les CLCs analysés. Dans la protéine CLC-0, cette séquence est « GAFVP », dans EcCLC et StCLC cette séquence est « GIFAP » et dans CmCLC cette séquence est

« GVFVP ». Dans la protéine AtCLCg, la séquence « GXFXP » est bien présente, ce sont 5 acides aminés « GLFVP » de la position 462 à 466. Dans la protéine AtCLCc, nous trouvons également des acides aminés « GLFIP », de la position 488 à 492.

Enfin, il a été suggéré que la tyrosine centrale (Tyr_{cen}) non seulement interviendrait dans la stabilisation de la liaison entre Glu_{ex} non protoné avec le site S_{cen}, ce qui permettrait le transfert du proton de Glu_{in} à Glu_{ex} (Accardi *et al.*, 2006 ; Walden *et al.*, 2007), mais également contribuerait à la formation du rétrécissement brusque et important du pore avec un site de liaison très fort pour les anions (Cohen et Schulten, 2004). Cet acide aminé important a été trouvé chez tous les CLCs analysé (Figure R-15). Chez AtCLCg c'est la tyrosine Y548 et chez AtCLCc c'est Y574.

Il est intéressant de remarquer que les résidus Glu_{ext} et Tyr_{cen} sont conservés aussi bien pour les canaux que pour les transporteurs. Ceci suggère l'importance de ces résidus dans le transfert du proton à l'intérieur du pore. Cependant, nous pouvons nous interroger sur le rôle de cette tyrosine chez AtCLCg sachant que cette protéine n'a pas de Glu_{ext}.

II.3. Le site de liaison avec les anions S_{int}

Le site S_{int} comprend le glutamate interne. Ce « glutamate proton » ou « glutamate interne - Glu_{in} » permet de marquer la différence entre canal et transporteur. En général, ce glutamate interne n'est présent que chez les CLCs transporteurs et non chez les CLCs canaux (Dutzler *et al.*, 2002, Jentsch *et al.*, 2002, Miller *et al.*, 2006). En effet, Miller, en 2006, a montré que la présence de ces deux glutamates Glu_{ext} et Glu_{in} dans la protéine pouvait définir un échangeur. Chez les transporteurs EcCLC et StCLC, le Glu_{in} correspond au glutamate à la position 203 (E203 = Glu_{in}). Par contre, chez les canaux, une valine (V) est présente à la place de ce Glu_{in}, comme chez CLC-0 où on trouve une valine à la position 227 (V227). Chez AtCLCg, ce glutamate interne Glu_{in} est bien présent à la position 254 (E254). Chez AtCLCc ce glutamate est présent à la position 279 (E279).

Le transporteur CLC d'algue rouge CmCLC est un cas particulier chez les CLCs. En effet, une thréonine se trouve à la position Glu_{in} et pourtant une expérience de flux sur vésicules a montré que le gradient de Cl⁻ entraîne le transport de H⁺. L'activité anti-porteur Cl⁻ / H⁺ persiste même lorsque la thréonine est mutée en valine (Feng *et al.*, 2012). Il est intéressant de noter que la mutation de cette thréonine en glutamate chez CmCLC favorise le transport de H⁺ avec une vitesse encore plus rapide que celle de la protéine sauvage,

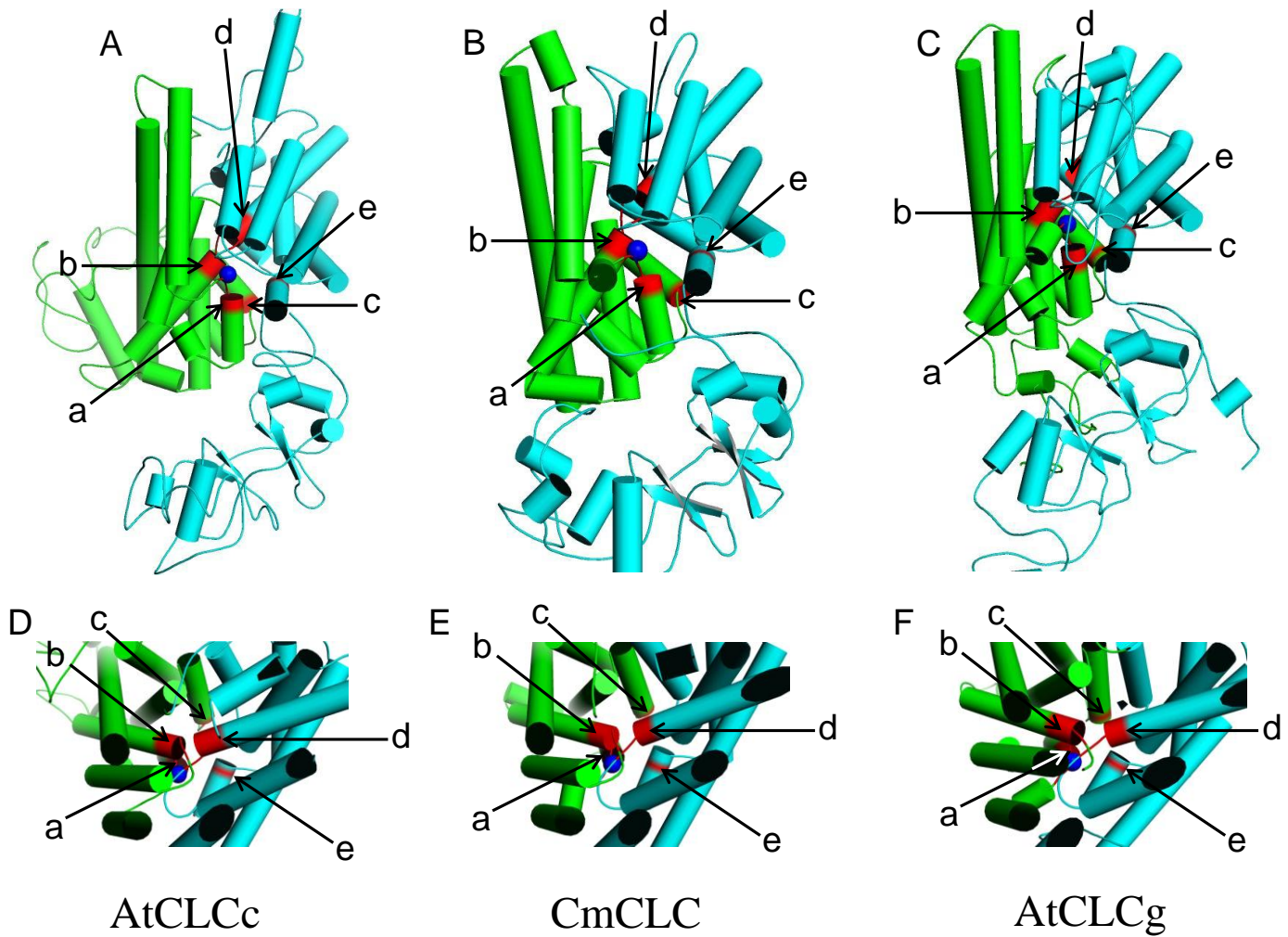


Figure R-16: Comparaison des structures 3D d'AtCLCg et d'AtCLCc

Les séquences d'acides aminés viennent de TAIR. PHYRE2 aligne la séquence d'acides aminés de chaque protéine et propose une liste de protéines homologues. La structure 3D prédite est fondée sur les résultats de cristallographie des protéines étudiées et publiées dans la banque des données protéomiques.

Les structures 3D d'AtCLCc (A) et d'AtCLCg (C) ont été construites à partir des données de cristaux obtenues sur CmCLC (B). L'image détaillée relève des résidus importants du pore de protéine AtCLCc (D), CmCLC (E) et AtCLCg (F), vu du côté vacuolaire. Le vert (N-terminale) et le cyan (C-terminale) montrent les deux moitiés des séquences d'acides aminés d'orientations opposées qui s'ancrent dans la membrane. Dans la protéine CmCLC, le rouge montre la position des résidus conservés (a) GSGIP, (b) GKEGP, (c) Glu_{in}, (d) GXFXP et (e) Tyr_{cen}. Ces légendes sont les mêmes dans les protéines AtCLCc et AtCLCg grâce aux similitudes de structures 3D prédites entre ces protéines. Le point bleu indique la position de l'anion chlorure dans le pore. La partie C-terminale contenant les domaines CBS colorés en cyan est dans le cytosol.

similaire à celle observée avec EcCLC (Lim et Miller, 2009). Ces expériences nous amènent à conclure que le Glu_{in} dans CmCLC affecte le transport de H^+ , mais il ne joue pas un rôle aussi important que le Glu_{ex} nécessaire au fonctionnement des transporteurs CLCs (Feng *et al.*, 2012).

III. Structure 3D - la ressemblance entre AtCLCc et AtCLCg

Construire la structure 3 dimensions (3D) d'une protéine est toujours nécessaire car cela peut nous aider à la compréhension du mode de fonctionnement de la protéine étudiée. Les structures 3D des protéines AtCLCg et AtCLCc sont construites grâce aux études de cristallographiques menées au cours de cette dernière décennie sur les protéines EcCLC d'*Escherichia coli* (Dutzler *et al.*, 2002), StCLC de *Salmonella typhimurium* (Dutzler *et al.*, 2002), CLC-0 du poisson torpédo (Meyer *et al.*, 2006) ou de CmCLC (Feng *et al.*, 2010). Dans le but de mieux comparer la similitude et la différence entre AtCLCc et AtCLCg, nous avons réalisé des images stéréo de ces deux protéines en utilisant le logiciel PHYRE2 (Kelley et Sternberg, 2009) pour obtenir l'image de structure 3D prédit à partir de la séquence d'acides aminés. La visualisation de l'image stéréo de ces deux protéines est facilitée par le logiciel PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.1 Schrödinger, LLC.). Nous présentons la structure 3D de CmCLC comme modèle pour comparer les structures d'AtCLCc et AtCLCg car c'est la seule protéine de la famille CLC chez les eucaryotes qui a été cristallisée entièrement (Feng *et al.*, 2010) et qui est la plus proche de la famille CLC végétale évolutivement.

Le résultat d'analyse de la structure 3D présenté (Figure R-16) montre qu'il y a une très forte ressemblance entre les structures 3D d'AtCLCc, AtCLCg et CmCLC, surtout au niveau du pore et des orientations des résidus qui sont impliqués dans le passage des anions au travers du pore, ce qui suggère une conservation des mécanismes chez AtCLCg et les autres CLCs.

IV. À la recherche du phénotype du double mutant *atclcc/atclcg*

Pour comprendre plus amplement la relation entre AtCLCc et AtCLCg, nous avons généré le double mutant *atclcc-1/atclcg-2* et cherché son phénotype lorsque la plante se développe sur milieu NaCl. Le double mutant *atclcc/atclcg* a été généré à partir de deux simples mutants *atclcc-1* et *atclcg-2*. Parmi les deux mutants *atclcg* disponibles au laboratoire, nous avons choisi *atclcg-2* car ce mutant présente le phénotype le plus fort sur

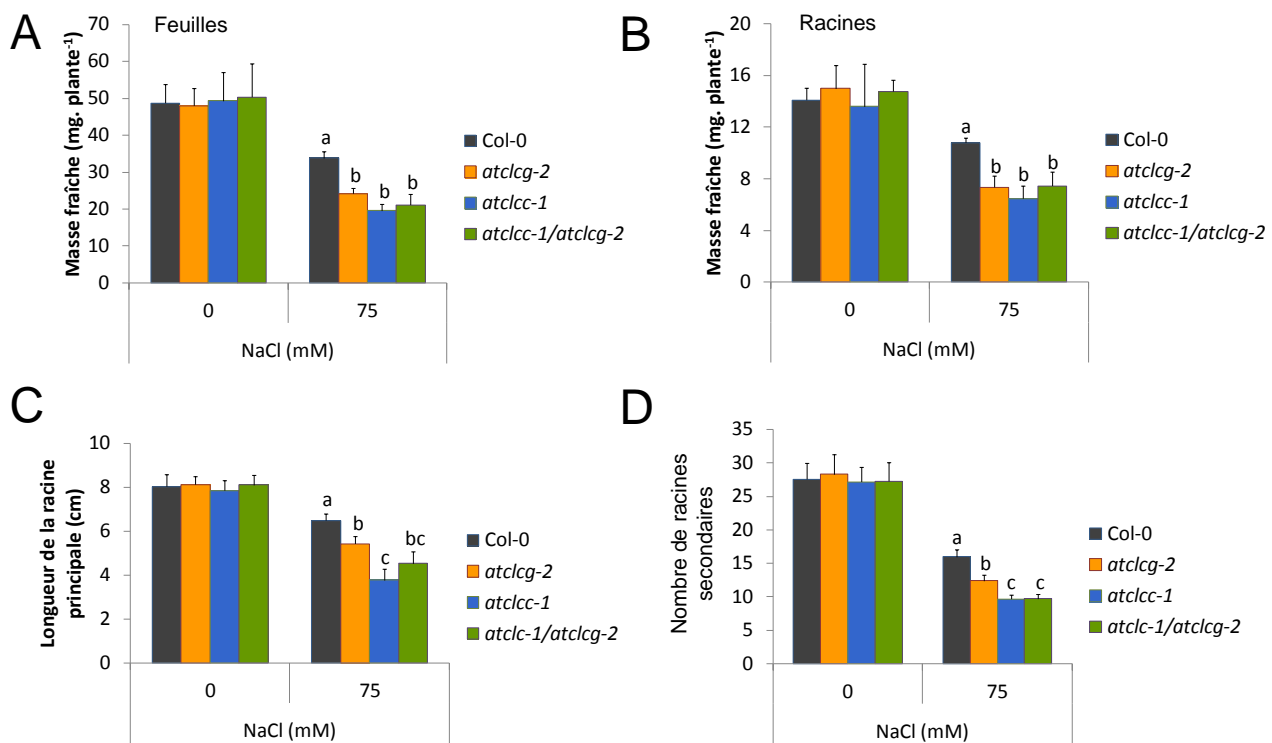


Figure R-17: Le double mutant *atclcc-1/atclcg-2* a un phénotype similaire à chacun des 2 simples mutants

Les plantes sauvages Col-0, simples mutants *atclcg-2*, *atclcc-1* et double mutant *atclcc-1/atclcg-2* sont cultivées *in vitro* pendant 3 semaines sur milieu ½MS seul ou avec 75mM NaCl. La masse fraîche des rosettes et des racines a été pesée. La longueur de la racine principale a été mesurée grâce au logiciel EZ-Rhizo et le nombre de racines secondaires a été compté manuellement. Les valeurs sont des valeurs moyennes de trois expériences indépendantes (n = 12). Les lettres montrent les différences statistiquement significatives ou non entre les génotypes. Analyse de la variance ANOVA, seuil de signification $\alpha = 0,05$.

NaCl. Pour le mutant *atclcc*, nous en avons 4 et, seul *atclcc-1* présente le plus fort phénotype et est le mutant sur le même fond d'accession Col-0 qu'*atclcg-2* (Jossier *et al.*, 2010).

IV.1. Le double mutant présente un phénotype identique à celui des simples mutants

IV.1.1. Phénotype du double mutant sur milieu de stress NaCl

Les plantes sauvages d'accession Col-0, les mutants *atclcg-2*, *atclcc-1* et le double mutant *atclcc-1/atclcg-2* ont été cultivés *in vitro* sur milieu ½MS seul ou avec 75 mM NaCl. Après trois semaines de développement, les masses fraîches des plantes ont été mesurées et la structure racinaire des plantes a été analysée. Sur milieu ½MS, les plantes de ces quatre géotypes présentent une croissance identique, quelque soit la masse fraîche foliaire ou racinaire, la longueur de la racine principale ou le nombre de racines secondaires (Figure R-17). Une diminution de masse fraîche foliaire de 27%, 42% et 36% a été observée sur milieu NaCl chez le mutant *atclcg-2*, *atclcc-1* et chez le double mutant *atclcc-1/atclcg-2* comparés à la plante sauvage respectivement (Figure R-17A). Pour la masse fraîche de la partie racinaire, nous obtenons le même profil de diminution chez les simples mutants et le double mutant par rapport au sauvage, ces valeurs sont de 27%, 36% et 26% respectivement (Figure R-17B). Aucune différence significative de masse fraîche foliaire et racinaire n'a été observée entre le double mutant et les simples mutants.

Nous avons également analysé la structure racinaire des plantes dans cette expérience et trouvé que, sur milieu NaCl, le système racinaire des simples mutants et du double mutant a diminué aussi bien pour la longueur de la racine principale que pour le nombre de racines secondaires comparé au sauvage (Figure R-17C et D). Mais lorsqu'on compare les données du double mutant avec celles des deux simples mutants, le profil du double mutant reste toujours identique à ceux des simples mutants pour la longueur de la racine principale, et au mutant *atclcc-1* pour le nombre de racines secondaires.

IV.1.2. Phénotype du double mutant sur milieu de stress KCl et de stress osmotique

Pour vérifier que le phénotype du double mutant est bien lié à l'effet du stress ionique et non osmotique, nous avons réalisé l'expérience de culture *in vitro* pour faire pousser les plantes sauvage Col-0, le mutant *atclcg-2*, *atclcc-1* et le simple mutant *atclcc-1/atclcg-2* sur milieu ½MS seul ou avec 75 mM de KCl, ou encore avec 140 mM de mannitol (cf. chapitre I). Après trois semaines de développement dans la chambre de

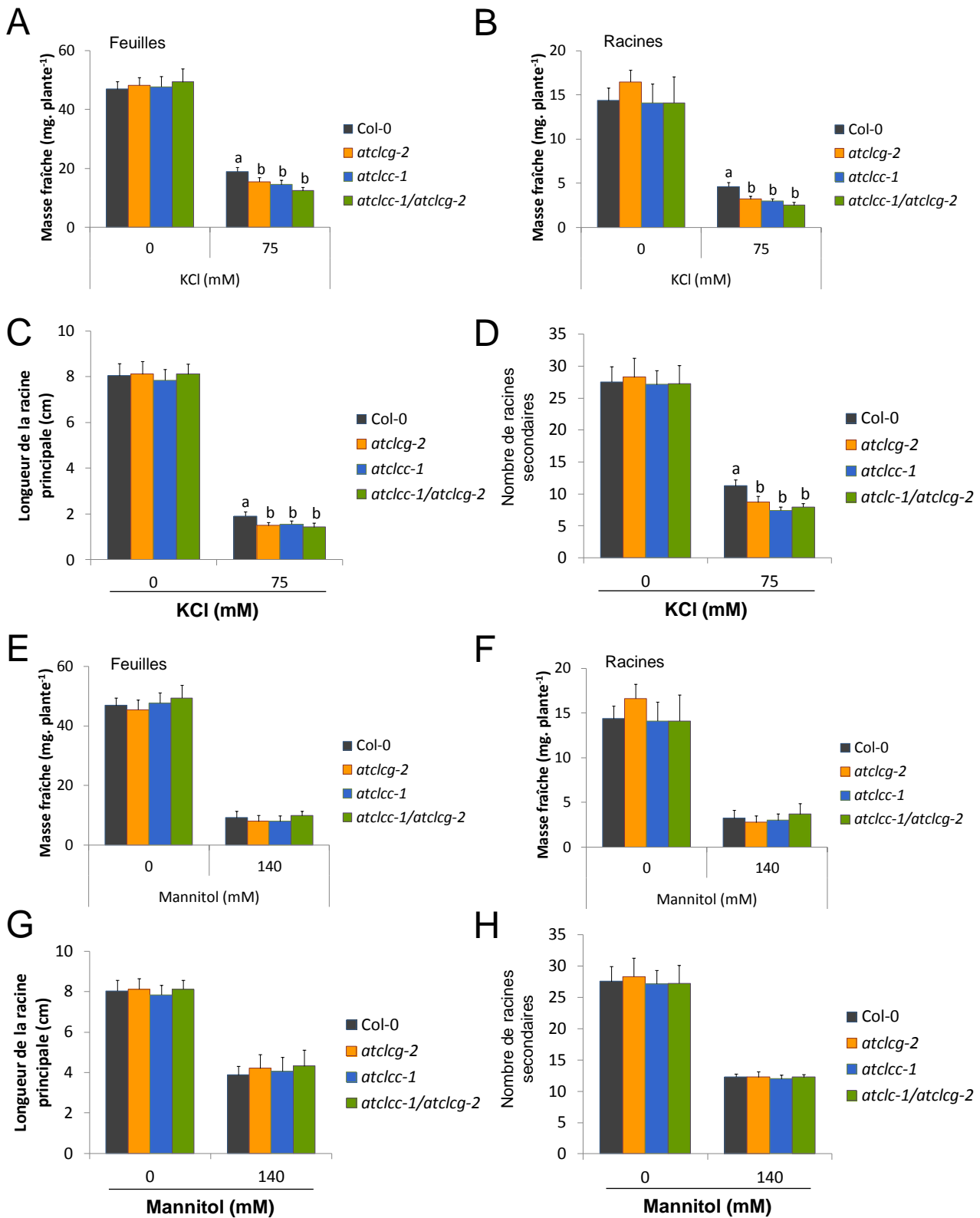


Figure R-18: Analyse du double mutant sur KCl et mannitol

Les plantes sauvages Col-0, simples mutants *atclcg-2*, *atclcc-1* et double mutant *atclcc-1/ atclcg-2* sont cultivées *in vitro* pendant 3 semaines sur milieu ½MS seul ou avec 75mM KCl ou 140 mM mannitol. La masse fraîche des rosettes et des racines a été pesée. La longueur de la racine principale a été mesurée grâce au logiciel EZ-Rhizo et le nombre de racines secondaires a été compté manuellement. Les valeurs sont des valeurs moyennes de trois expériences indépendantes (n = 12). Les lettres montrent les différences statistiquement significatives ou non entre les génotypes. Analyse de la variance ANOVA, seuil de signification $\alpha = 0,05$.

culture, les masses fraîches des parties foliaire et racinaire ont été mesurées, ainsi que la longueur de la racine principale et le nombre de racines secondaires. Lorsqu'on regarde sur milieu $\frac{1}{2}$ MS avec 75 mM KCl, les simples mutants *atclcg-2*, *atclcc-1* et le double *atclcc-1/atclcg-2* mutant présentent une réduction de la masse fraîche foliaire et racinaire, ainsi que de la taille du système racinaire par rapport au sauvage Col-0, mais la différence de masse fraîche et de taille du système racinaire entre ces trois génotypes reste non significative. Quant au milieu $\frac{1}{2}$ MS additionné de 140 mM de mannitol, nous pouvons observer qu'il n'y a aucune différence pour les masses fraîches foliaire et racinaire, de même pour la taille du système racinaire entre les plantes sauvages et les plantes simples mutants ou le double mutant (Figure R-18).

Nous pouvons donc conclure que le double mutant *atclcc-1/atclcg-2* présente un phénotype d'hypersensibilité au stress NaCl, mais son niveau de sensibilité est équivalent à celui des simples mutants *atclcc-1* et *atclcg-2*. Son phénotype est lié spécifiquement au stress ionique causé par les ions chlorures et non au stress osmotique.

IV.2. Contenus en anion du double mutant en condition de stress NaCl

Nous avons constaté que le phénotype d'hypersensibilité au NaCl chez le double mutant reste le même que celui des deux simples mutants, comme montré précédemment. Nous avons voulu voir le contenu en anions de ce double mutant comparé aux simples mutants et au sauvage dans cette condition de stress. Pour ce faire, les plantes sauvages d'accession Col-0, les simples mutants *atclcg-2* et *atclcc-1*, les plantes doubles mutantes *atclcc-1/atclcg-2* ont été cultivées *in vitro* sur milieu $\frac{1}{2}$ MS et sur milieu $\frac{1}{2}$ MS contenant 75 mM NaCl. Les dosages des anions ont été effectués sur les parties foliaire et racinaire de plantules âgées de 3 semaines. Le résultat est montré dans la figure R-19.

De manière générale, lorsque les plantes se développent sur milieu $\frac{1}{2}$ MS, les contenus en chlorure, en nitrate ou en sulfate sont tout à fait identiques entre les génotypes dans les parties foliaire ou racinaire. Mais sur milieu $\frac{1}{2}$ MS ajouté de 75 mM NaCl, il y a une très forte accumulation d'ion chlorure dans la partie foliaire (entre 100 et 120 μ mol par gramme masse fraîche). Nous pouvons également observer qu'il y a une sur-accumulation statistiquement significative de 20% de contenu en chlorure dans la partie foliaire chez les plantes simples mutantes *atclcg-2* et *atclcc-1*, mais aussi chez la plante double mutante par

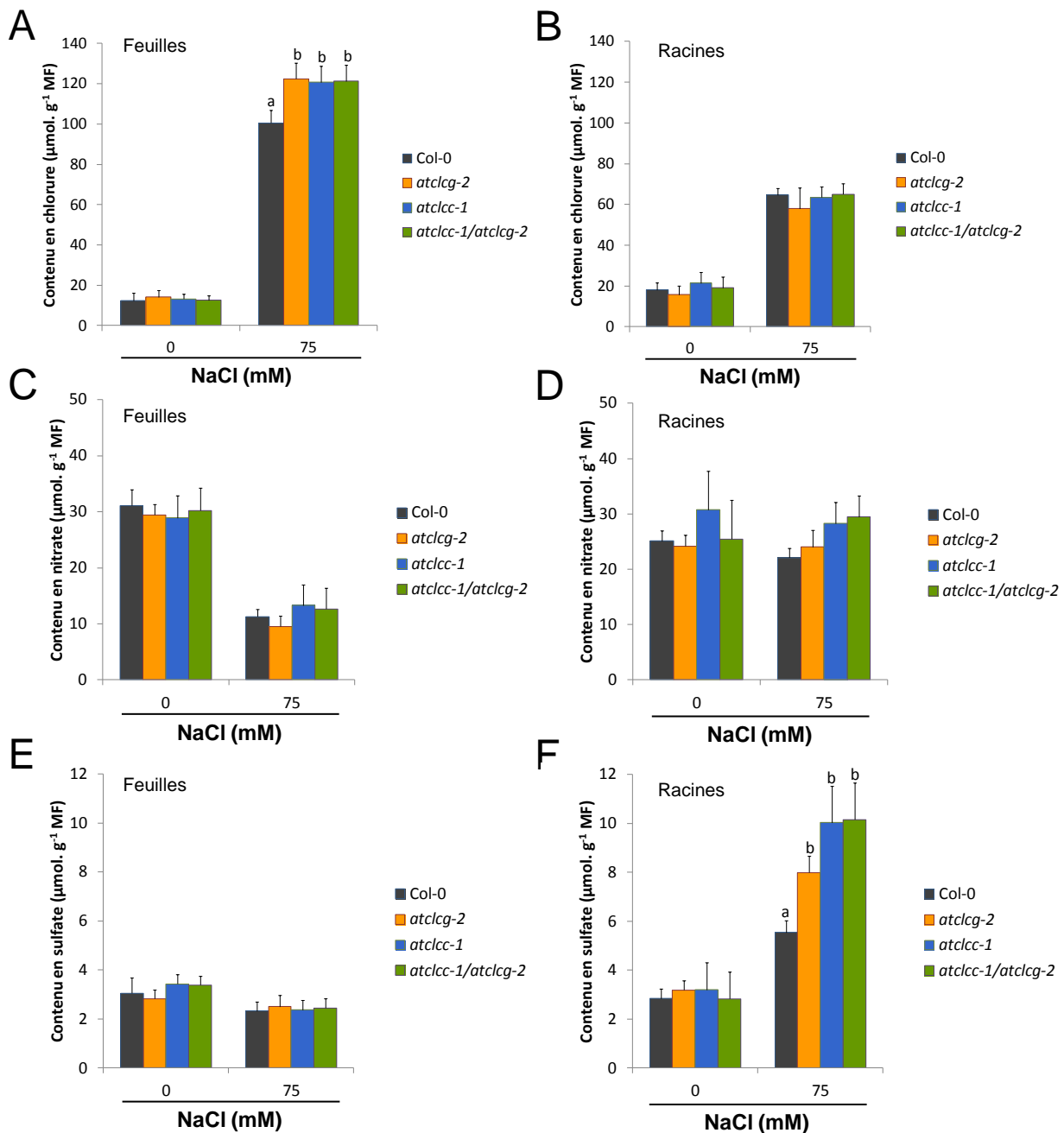


Figure R-19: Le contenu en anions est identique chez le double mutant *atclcc-1/atclcg-2* et chez les simples mutants, *atclcc-1* et *atclcg-2*

Les contenus en Cl^- , NO_3^- et SO_4^{2-} en μmol par gramme de masse fraîche (MF) dans la partie foliaire (A, C, E) et racinaire (B, D, F) ont été mesurés chez des plantes sauvages et mutantes cultivées pendant 3 semaines *in vitro* sur milieu $\frac{1}{2}\text{MS}$ seul ou additionné de 75 mM NaCl. Les valeurs sont des valeurs moyennes de trois expériences indépendantes ($n = 12$). Les lettres montrent les différences statistiquement significatives ou non entre les génotypes. Analyse de la variance ANOVA, seuil de signification $\alpha = 0,05$.

rapport à la plante sauvage. Dans la partie racinaire, aucune différence de contenu en chlorure n'a pu être détectée entre ces génotypes.

Pour le contenu en nitrate, nous pouvons constater qu'il n'y a aucune différence significative entre tous les génotypes quelque soit le milieu de croissance et de même pour les parties foliaire ou racinaire. Il est intéressant de noter qu'il y a une diminution d'environ 50% de contenu en nitrate dans la partie foliaire quand les plantes se développent sur milieu de stress NaCl (Figure R-19C). En effet, face à une sur-accumulation de chlorure vacuolaire, la cellule pourrait exercer une sous-accumulation de nitrate pour maintenir la balance de potentiel électrique membranaire au travers du tonoplaste.

Présent en faible quantité par rapport au chlorure et nitrate, le sulfate reste inchangé dans la partie foliaire entre toutes les plantes. Lorsqu'on regarde la partie racinaire, sur milieu ½MS, le contenu en sulfate de tous les génotypes est le même, par contre il y a une sur-accumulation du contenu en sulfate chez les simples mutants et chez le double mutant par rapport au sauvage quand les plantes poussent sur milieu ½MS avec 75 mM NaCl. Le mutant *atclcg-2* accumule 44% de plus de sulfate, tandis que le simple mutant *atclcc-1* et le double mutant *atclcc-1/atclcg-2* accumulent 80% de plus de sulfate par rapport au sauvage. Le contenu en sulfate chez les simples mutants et le double mutant n'est pas statistiquement différent (Figure R-19F).

IV.3. Analyse de l'expression d'*AtCLCa*, *b*, *c*, *g* et *AtSULTR4*

IV.3.1. Expression d'*AtCLCc* ou *AtCLCg* chez les plantes du simple mutant

Sachant que le phénotype du double mutant ne correspond pas à un phénotype additionné des deux simples, nous nous sommes demandés comment variait l'expression d'*AtCLCg* en absence d'*AtCLCc* et inversement. Pour cela, nous avons réalisé la quantification des ARNm par la technique de qRT-PCR chez les plantes sauvages Col-0, mutantes *atclcc-1*, *atclcg-2* cultivées *in vitro* 3 semaines sur milieu ½MS seul ou avec 75 mM NaCl. Le résultat obtenu est montré dans la figure R-20.

En analysant les résultats, il apparaît qu'*AtCLCc* est réprimé constitutivement en absence d'*AtCLCg* et qu'*AtCLCg* est réprimé lors du stress NaCl en absence d'*AtCLCc*. En effet, l'expression d'*AtCLCg* est identique chez le sauvage Col-0 et chez le mutant *atclcc-1*

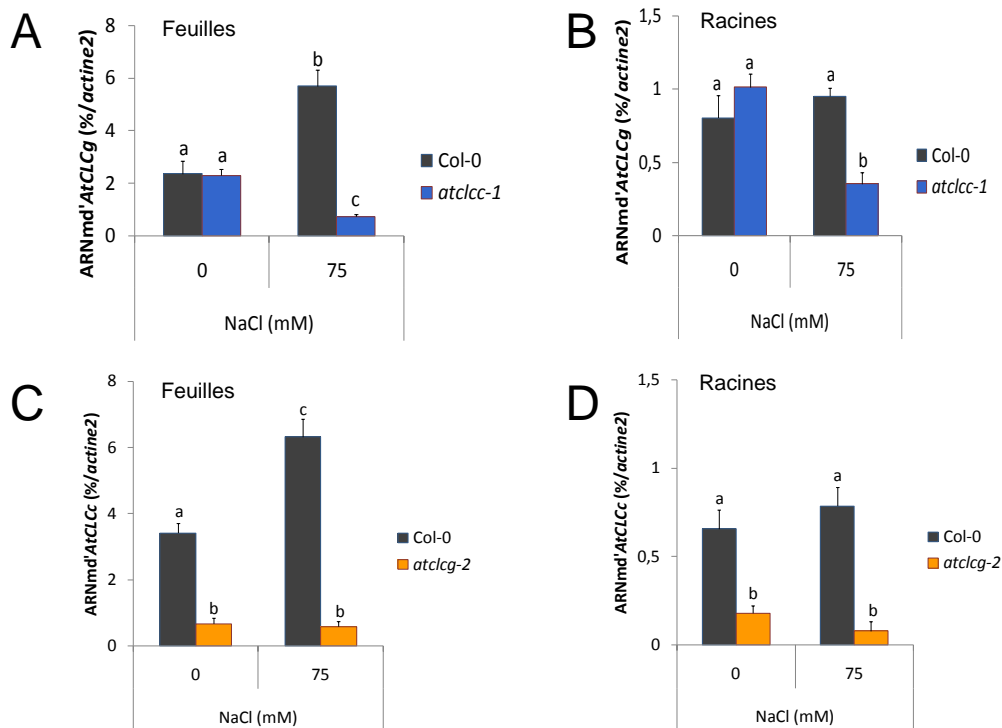


Figure R-20: Expression d'*AtCLCg* et d'*AtCLCc* en réponse au NaCl chez les simples mutants *atclcc-1* et *atclcg-2*

Les expressions d'*AtCLCg* (A et B) et d'*AtCLCc* (C et D) en réponse au NaCl ont été analysées chez la plante sauvage Col-0 et chez la plante mutante *atclcc-1* (A et B) ou chez la plante mutante *atclcg-2* (C et D). Les ARNm ont été extraits à partir de feuilles ou de racines des plantes cultivées *in vitro* pendant trois semaines. Les valeurs sont des valeurs moyennes de trois expériences indépendantes ($n = 3$). *L'actine* a été pris comme gène constitutif. Les lettres indiquent la différence statistiquement significative entre la plante sauvage Col-0 et les simples mutants. Analyse de la variance ANOVA, seuil de signification $\alpha = 0,05$.

dans les parties foliaire ou racinaire en absence de NaCl (Figure R-20A et B). En présence de NaCl, l'expression d'*AtCLCg* est induite dans la partie foliaire et non dans la partie racinaire chez le sauvage, comme montré précédemment dans §IV.3.1 du chapitre I. En ce qui concerne l'expression d'*AtCLCc* chez le sauvage Col-0, nous avons retrouvé l'induction de ce gène en réponse au NaCl dans la partie foliaire et non dans la partie racinaire (Figure R-20C et D). Ce résultat confirme encore une fois ceux de Jossier *et al.* (2010). En outre, nous avons constaté que, chez le simple mutant *atclcg-2*, *AtCLCc* est réprimé de manière constitutive dans les parties foliaires et racinaires quelque soit le milieu de croissance, probablement par un mécanisme de régulation encore inconnu. Chez le mutant *atclcc-1*, un résultat similaire a été observé pour l'expression d'*AtCLCg* mais seulement en présence du NaCl. Ceci nous suggère que : (i) l'expression d'*AtCLCc* ne se fait qu'en présence d'*AtCLCg* chez Col-0 ; (ii) la présence d'*AtCLCc* est nécessaire pour activer l'expression d'*AtCLCg* en réponse au NaCl.

IV.3.2. Expression d'*AtCLCa*, *AtCLCb* et *AtSULTR4.1* chez le double mutant *atclcc-1/atclcg-2*

Afin de continuer la caractérisation du double mutant, nous avons voulu voir l'expression de deux autres *AtCLCs* vacuolaires (*AtCLCa* et *AtCLCb*) et *AtSULTR4.1* dans la condition de stress NaCl chez la plante double mutante *atclcc-1/atclcg-2* comparée aux deux simples mutants. Les résultats dans la figure R-21A à D montrent qu'il n'y a pas de changement d'expression d'*AtCLCa* et *AtCLCb* dans la partie foliaire et racinaire chez la plante sauvage Col-0 quand les plantes se développent sur milieu ½MS ou sur milieu ½MS avec 75 mM NaCl. L'expression de ces gènes reste stable chez tous les autres simples mutants et le double mutant, quelque soit le milieu de croissance.

Pour l'expression d'*AtSULTR4.1*, il n'y a pas de différence chez la plante sauvage Col-0 sur milieu ½MS ou ½MS avec 75 mM NaCl, que ce soit dans la partie foliaire ou racinaire. Pour les trois autres génotypes, dans la partie foliaire, l'expression de ce gène reste similaire lors de la croissance des plantes sur milieu ½MS additionné de 75 mM NaCl comparé à celui des plantes ayant poussé sur milieu ½MS. Dans la partie racinaire des plantes simples mutantes et double mutante, nous avons pu observer pour ce gène une répression de l'expression significative par rapport au sauvage Col-0. Cette répression entraîne probablement une diminution de la quantité des protéines *AtSULTR4.1*, protéine exportatrice de sulfate vacuolaire vers le cytosol, ce qui aboutit à une augmentation de

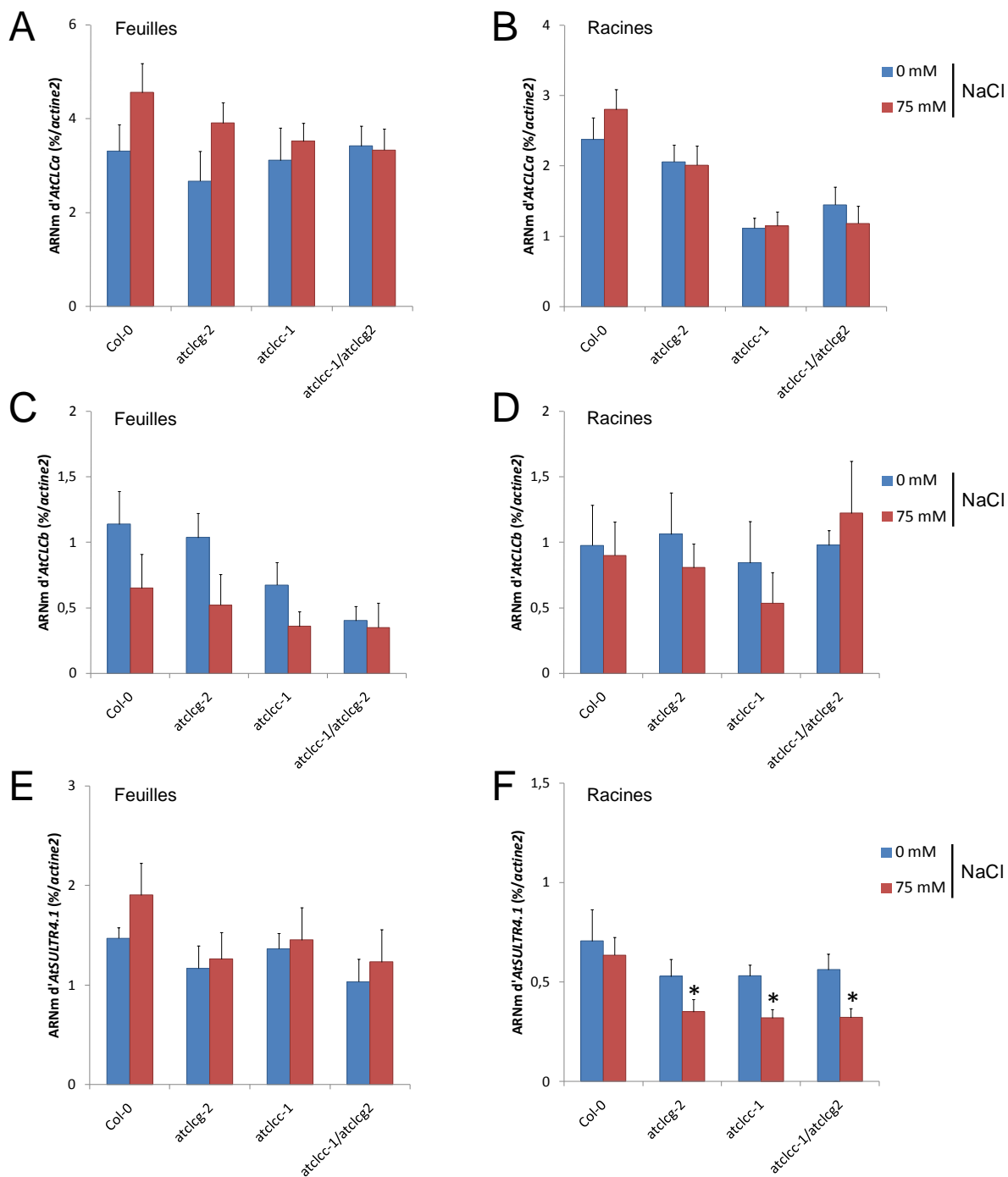


Figure R-21: Expression d'*AtCLCa*, d'*AtCLCb* et d'*AtSULTR4.1* en réponse au NaCl et à l'extinction d'*AtCLCc* et/ou d'*AtCLCg*

Les expressions d'*AtCLCa* (A et B), d'*AtCLCb* (C et D) et d'*AtSULTR4.1* (E et F) en réponse au NaCl ont été mesurées chez la plante sauvage, les plantes mutantes *atclcc-1*, *atclcg-2* et la plante double mutante *atclcc-1/atclcg-2*. Les ARNm ont été extraits à partir des feuilles ou des racines des plantes âgées de trois semaines cultivées *in vitro*. Les valeurs sont des valeurs moyennes de trois expériences indépendantes (n = 3). L'*actine* a été pris comme le gène constitutif. Les astérisques indiquent la différence statistiquement significative entre la plante sauvage Col-0 et les autres plantes ($P < 0,05$, test de « student »).

concentration en sulfate vacuolaire chez les simples mutants et chez le double mutant (Figure R-19F). Le même résultat a été trouvé pour AtSULTR4.2, une protéine également impliquée dans la sortie du SO_4^- de la vacuole (données non montrées).

Conclusion du chapitre II

Pour résumé, en ce qui concerne la séquence d'acides aminés déterminant la définition du pore d'AtCLC_c, la présence d'une sérine dans le motif de sélectivité et la présence des deux acides aminés Glu_{ext} et Glu_{in} suggèrent que cette protéine serait un transporteur de chlorure. Ceci est en accord avec les résultats de Jossier *et al.* (2010). L'analyse *in silico* de la structure stéréo d'AtCLC_c et AtCLC_g nous a montré une grande similarité entre ces deux protéines. Elles possèdent une structure 3D prédite similaire et *idem* à CmCLC, surtout au niveau de l'orientation des hélices alpha du pore. La différence entre ces deux protéines n'est qu'au niveau de la séquence d'acides aminés conservée Glu_{ex}. AtCLC_c possède les deux Glu_{ex} et Glu_{in}. Il est important de rappeler que, quand le Glu_{ex} est muté en une alanine chez EcCLC, hCLC-4 et hCLC-5, ces transporteurs deviennent des canaux (Dutzler *et al.*, 2003 ; Accardi et Miller, 2004 ; Picollo et Pusch, 2005 ; Scheel *et al.*, 2005). Les travaux de Bergsdorf *et al.* (2009) ont montré que lorsqu'AtCLC_a native s'exprime dans des ovocytes de *Xenopus*, elle favorise préférentiellement l'échange de NO₃⁻ / H⁺. La mutation du « glutamate gating » en alanine E203A conduit cette protéine à une conductance anion découplée qui est plus grande pour Cl⁻ que pour NO₃⁻. Le remplacement du « glutamate proton » par l'alanine E270A abolit le courant. Ce dernier pourrait être restauré par la mutation E203A découplée (Bergsdorf *et al.*, 2009). Ainsi, quand un CLC possède les deux Glu_{ex} et Glu_{in}, il est plutôt un transporteur (Miller, 2006). Ainsi, AtCLC_g pourrait être un canal et la structure du pore dans ce cas là serait uniquement en position ouverte (Miller, 2006 ; Dutzler *et al.*, 2003). Il serait intéressant d'analyser AtCLC_g par électrophysiologie pour confirmer cette hypothèse en comparant les courants sur des vacuoles extraites de cellules du mésophylle de plantes sauvages, mutantes et complémentées. De même, nous pouvons envisager d'équiper AtCLC_g par un deuxième Glu_{ex} par mutagenèse dirigée et ensuite analyser son effet sur le phénotype des plantes dans le contexte de stress NaCl. Pour ce qui concerne le motif de sélectivité d'AtCLC_g, nous trouvons également que son motif de sélectivité ionique est en faveur du passage des anions chlorure. Nos résultats d'expérience physiologiques confirment ainsi ce caractère prédit (voir chapitre I). Ayant l'acide aminé

sérine (Ser_{cen}) dans le motif de sélectivité (S_{cen}), comme AtCLC_c, AtCLC_g aurait une sélectivité anionique prédite en faveur du chlorure. Pour pouvoir vérifier cette hypothèse, il nous faudrait analyser la sélectivité d'AtCLC_g lors des mesures d'électrophysiologie envisagées au préalable (Dutzler *et al.*, 2003 ; Bergsdorf *et al.*, 2009). Cette protéine n'est pas impliquée dans le passage de nitrate dans nos conditions testées de limitation en azote ou de stress NaCl. Mais peut-être qu'en forçant, AtCLC_g pourrait aussi être impliquée dans le transport de nitrate.

Il a été suggéré qu'AtCLC_c est un transporteur de chlorure qui permet de détoxifier le cytoplasme aux forts niveaux en chlorure lors du stress NaCl. Jossier *et al.* (2010) ont montré que les mutants *atclcc* qui présentent un phénotype d'hypersensibilité au NaCl, sous-accumulent du chlorure par rapport au sauvage. Pour ce qui concerne les données d'expression tissulaire, *AtCLC_c* est fortement exprimé dans les cellules de gardes et dans le pollen mais pas dans les cellules du mésophylle. Par contre, *AtCLC_g* n'est exprimé qu'au niveau des cellules du mésophylle. En mutant ces deux protéines AtCLC_c et AtCLC_g, puis en analysant le phénotype de la plante double mutante *atclcc-1/atclcg-2*, nous avons montré que celle-ci ne possède pas un phénotype accentué par rapport aux simples mutants en réponse au stress NaCl. Autrement dit, AtCLC_c et AtCLC_g n'auraient pas de fonction redondante. En revanche, l'analyse des transcrits d'*AtCLC_g* et *AtCLC_c* chez les simples mutants a montré qu'il existe une relation forte entre ces deux protéines : *AtCLC_c* a besoin de la présence d'*AtCLC_g* pour être exprimé correctement quelque soit la condition de croissance de la plante et, inversement *AtCLC_g* ne s'exprime qu'en présence d'*AtCLC_c* en présence de NaCl dans le milieu de croissance. Ainsi, l'absence des deux protéines AtCLC_c et AtCLC_g dans le double mutant *atclcc-1/atclcg-2* est équivalente à ce qui se passe chez les simples mutants.

Ainsi, le phénotype non-accentué du double mutant *atclcc-1/atclcg-2* peut s'expliquer par le fait que :

- i) Ces deux protéines AtCLC_c et AtCLC_g ne sont pas exprimées dans les mêmes tissus.
- ii) Dans chacun des simples mutants, l'autre *CLC* est sous-exprimé. Il est envisagé de penser qu'il existe un mécanisme de régulation d'expression entre *AtCLC_c* et *AtCLC_g*. En effet, lorsqu'on regarde l'expression d'*AtCLC_g* chez la plante sauvage

en réponse au stress NaCl, il y a une induction de ce gène seulement dans la partie aérienne chez Col-0 (ce travail) ou chez WS (Jossier *et al.*, 2010). Quand on analyse l'expression d'*AtCLCg* chez la plante mutante *atclcc-1* dans le fond Col-0 lorsqu'elle se développe sur NaCl, il n'y a pas d'induction d'*AtCLCg*. Par contre, l'expression d'*AtCLCg* est même réprimée, à la fois dans la partie aérienne et la partie racinaire (Figure R-20A et B). Cela nous suggère que peut-être le phénotype de la plante mutante *atclcc-1* dans le fond Col-0 est lié à une répression d'expression d'*AtCLCg*. Or, cette différence d'expression d'*AtCLCg* dans les mutants *atclcc* dans le fond WS n'a pas été trouvée par Jossier *et al.* (2010). Ces résultats suggèrent que le phénotype d'hypersensibilité au NaCl chez les mutants *atclcc* dans le fond WS n'est pas lié à *AtCLCg*.

Si on regarde l'expression d'*AtCLCc* chez la plante mutante *atclcg-2*, on peut observer qu'*AtCLCc* est toujours sous-exprimé, que ce soit lorsque la plante se développe sur milieu de contrôle ½MS ou sur milieu de stress NaCl (Figure R-20C et D). Mais de manière surprenante, le phénotype de la plante mutante *atclcg-2* n'est observé que quand les plantes se développent sur milieu de stress NaCl. La sous-expression d'*AtCLCc* chez la plante mutante *atclcg-2* ne peut pas expliquer son phénotype, autrement dit le phénotype sur NaCl de la plante mutante *atclcg-2* n'est pas lié à l'absence d'*AtCLCc*. Cependant, une perte d'induction de l'expression d'*AtCLCc* dans la partie foliaire en réponse au NaCl est également observée chez le mutant *atclcg-2* (Figure R-20C). Le phénotype du mutant *atclcg-2* pourrait être alors dû à un effet seuil de la quantité de protéine *AtCLCc*, c'est-à-dire que la plante mutante *atclcg-2* a besoin d'une quantité minimum de protéine *AtCLCc* pour être capable de répondre à l'effet du NaCl. Chez la plante sauvage Col-0, la protéine *AtCLCc* en quantité suffisante permet de répondre efficacement au stress NaCl. En revanche, chez la plante mutante *atclcg-2*, l'expression d'*AtCLCc* est réprimée par une raison encore inconnue, cela entraînant une perte de quantité de protéine *AtCLCc* sous le seuil nécessaire pour activer l'induction d'*AtCLCc* en réponse au stress NaCl (voir la partie Discussion et Perspectives, Figure R-23).

La perspective pour éclaircir ces hypothèses mentionnées ci-dessus est de générer les plantes transgéniques *atclcc-1* surexprimant *AtCLCg* et inversement, *atclcg-2*

surexprimant *AtCLCc*. Nous avons généré ces deux sortes de plantes transgéniques à la génération T2, les lignées homozygotes de la troisième génération sont en cours d'analyse pour le phénotype sur NaCl.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au début de ma thèse, nous avions très peu d'informations concernant AtCLCg. Au cours de mes travaux, l'analyse d'AtCLCg nous a emmené de surprise à surprise. D'abord, par le fait que nous ayons été dans l'impossibilité de cloner l'ADNc prédit d'AtCLCg pour des raisons inconnues comme déjà discuté dans le chapitre I. Ensuite, l'analyse de la séquence des acides aminés d'AtCLCg nous a montré que cette protéine possède des critères particuliers.

Jusqu'à présent, nous savons que parmi les sept membres de la famille AtCLCs chez *Arabidopsis*, quatre AtCLCs sont localisés sur le tonoplaste. Ceci démontre le rôle important de cette famille de protéines dans l'homéostasie des anions au travers du tonoplaste. Basé sur la sélectivité ionique de ces quatre protéines tonoplastiques, on peut les diviser en deux groupes. Un groupe contenant AtCLCa et AtCLCb qui possèdent la sélectivité pour les anions nitrate tandis que l'autre groupe AtCLCc et AtCLCg ont une sélectivité en faveur des anions chlorure. Prenant le critère « canaux / transporteurs », ils peuvent alors être divisés en deux groupes. Un groupe contient des CLCs, qui possèdent tous les deux glutamates : externe Glu_{ex} et interne Glu_{in} , dont AtCLCa, AtCLCb sont justifiées par l'expérience électrophysiologique et, AtCLCc est justifié expérimentalement par les études physiologiques. L'autre groupe contient seulement AtCLCg dont l'analyse *in silico* nous a montré que cette protéine ne contient qu'un seul glutamate interne Glu_{in} . Comme discuté dans le chapitre II, AtCLCg serait plutôt un canal sachant qu'il a été montré que dans la famille CLCs, la présence de Glu_{in} et Glu_{ex} est caractéristique des transporteurs (Miller, 2006), à l'exception de CmCLC chez l'algue rouge *Cyanidioschyzon merolae* qui est un transporteur de chlorure possédant une thréonine à la place du Glu_{in} (Feng *et al.*, 2010).

Bien sûr, la nature de canal d'AtCLCg doit être approuvée par les travaux d'électrophysiologie. Il a été démontré qu'AtCLCa et AtCLCb sont des anti-porteurs $\text{NO}_3^- / \text{H}^+$ (De Angeli *et al.*, 2006 ; von der Fecht-Bartenbach *et al.*, 2010). Il manque à ce jour des données publiées concernant des travaux d'électrophysiologie effectués sur AtCLCc

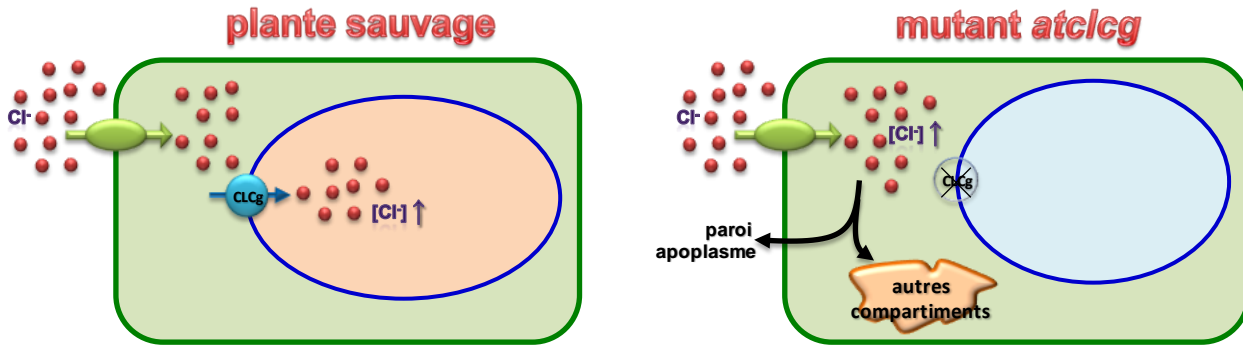


Figure R-22: Modèle d'explication de la sur-accumulation du chlorure chez la plante mutante *atclcg* vis-à-vis de la plante sauvage

Le modèle est désigné essentiellement pour les cellules de mésophylle. Lorsque la plante sauvage se développe sur milieu de stress NaCl, Cl^- entre dans le cytoplasme et est ensuite accumulé dans la vacuole *via* AtCLCg pour détoxifier le cytosol. Chez la plante mutante *atclcg*, quand la concentration de chlorure cytoplasmique est élevée, il n'y a plus AtCLCg pour détoxifier le cytosol, la cellule posséderait d'autres mécanismes pour stocker le chlorure dans des compartiments autres que la vacuole ou pour l'exclure dans le paroi / apoplasme.

pour confirmer sa nature de transporteur de chlorure. Ainsi, parmi les quatre AtCLCs vacuolaires dont trois sont des transporteurs, AtCLCg joue un rôle particulier, probablement celui d'un canal dans le passage de Cl⁻ au travers du tonoplaste.

Si notre hypothèse qu'AtCLCg de canal de chlorure est validée, comment peut-on expliquer le phénotype de sur-accumulation de chlorure des plantes mutantes *atclcg* sur NaCl par rapport au sauvage ?

i) Chez la plante sauvage, AtCLCg peut laisser passer librement les anions chlorures au travers du tonoplaste selon le gradient électrochimique. Lorsqu'elle se développe sur NaCl, l'accumulation de Cl⁻ cytosolique atteint un seuil toxique. AtCLCg peut jouer le rôle d'un canal de Cl⁻, laisse passer librement les anions Cl⁻ du cytoplasme au travers du tonoplaste dans la vacuole, afin de détoxifier le cytosol (Figure R-22).

ii) Chez la plante mutante *atclcg-2*, l'absence d'AtCLCg ne perturbe pas la croissance lorsque la plante se développe sur milieu ½MS normal. Par contre, quand elle se développe sur un milieu de stress NaCl, l'absence d'AtCLCg peut entraîner une sur-accumulation de Cl⁻ dans des compartiments autres que la vacuole, tels que dans les chloroplastes, dans la paroi cellulaire ou dans l'apoplaste éventuellement (Figure R-22). En effet, il a été montré que chez la plante traitée par le stress salin, la sur-accumulation de chlorure peut avoir lieu ailleurs que dans la vacuole. Dans une étude comparant deux cultivars d'orge qui tolèrent différemment le sel, la technique de microanalyse aux rayons X a révélé que la concentration de chlorure dans le cytoplasme et la vacuole étaient similaires entre les deux génotypes mais le cultivar tolérant accumulait environ moitié moins de chlorure dans la paroi cellulaire par comparaison avec le cultivar sensible (Flowers et Hajibagheri, 2001).

iii) Chez la plante mutante *atclcc-1*, nous avons observé également une sur-accumulation de Cl⁻ dans la feuille par rapport au celle du sauvage lorsqu'elle se développe sur 75 mM NaCl pendant trois semaines, mais aucune différence significative n'a été remarquée dans la racine. Par contre, Jossier *et al.*, (2010) ont reporté qu'aucune différence de contenu en Cl⁻ n'a

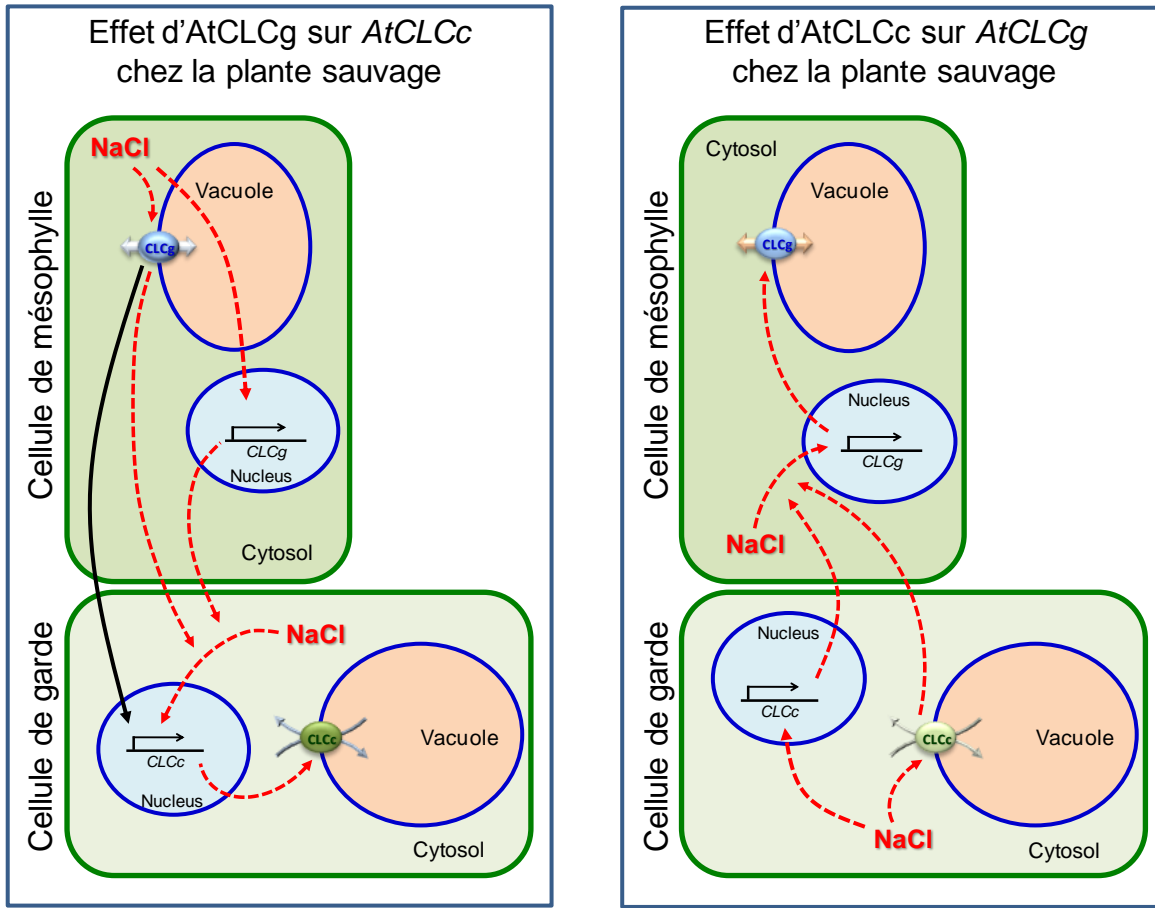


Figure R-23: Modèle d'explication de la relation entre *AtCLCg* et *AtCLCc*

Le trait noir continue indique qu'*AtCLCg* induit l'expression d'*AtCLCc*. Les traits rouges pointillés indiquent la relation entre *AtCLCg* et *AtCLCc* en réponse au stress NaCl.

été observée entre Col-0 et le mutant *atclcc-1* à 25 et 50 mM NaCl pendant deux semaines. Cette différence peut s'expliquer par le fait que les expériences sont réalisées avec des concentrations de NaCl et des temps de développement différents (milieu de stress salin causé par 25 et 50 mM NaCl pendant 2 semaines pour les travaux de Jossier *et al.*, (2010) contre 75 mM NaCl pendant 3 semaines pour ce travail). Peut-être la concentration plus élevée de NaCl dépassant un seuil critique et la durée du temps de traitement prolongée dans mes expériences font que la plante mutante *atclcc-1* a tendance à accumuler du Cl⁻ dans des compartiments autres que la vacuole.

iv) En résumant toutes les analyses transcriptionnelles et physiologiques chez la plante simple mutante *atclcg-2*, *atclcc-1* et la plante double mutante *atclcc-1/atclcg-2*, nous pouvons conclure que les plantes simple mutantes se comportent comme le double mutant, aussi bien au niveau de l'expression génique concernant *AtCLCc* et *AtCLCg* et, du phénotype de développement en réponse au stress NaCl (Figure R-23).

Il serait intéressant alors de mesurer le Cl⁻ dans l'apoplasme et les différents compartiments chez les mutants *atclcg* pour clarifier le rôle exact d'*AtCLCg* lors du stress NaCl. Malheureusement, il est techniquement difficile d'obtenir des mesures directes expérimentales de flux de Cl⁻ et ses concentrations dans le système de plante intacte, bien que certaines estimations aient été faites en utilisant des différents techniques telles que la micro-analyse aux rayons X (Hajibagheri et Flowers, 1989), les microélectrodes sensibles aux ions intracellulaires (Felle, 1994), l'analyse de traceurs (Britto *et al.*, 2004) ou de sondes fluorescentes sensibles au Cl⁻ (Lorenzen *et al.*, 2004).

En plus de l'analyse du contenu en chlorure, j'ai également mesuré les contenus en nitrate, en sulfate, en phosphate et en sodium des plantes en réponse au stress NaCl. Chez les mutants *atclcg*, nous avons observé qu'il y a non seulement une sur-accumulation de chlorure dans la partie aérienne (comme montré dans §IV.2.4) mais également une sur-accumulation de sulfate dans les racines. Ceci est en corrélation avec l'analyse de l'expression du gène *AtSULTR4.1* et *4.2*. Dans la littérature, il y a très peu de travaux concernant à la relation entre Cl⁻ et SO₄²⁻, surtout dans le système de la plante entière et en réponse au stress salin. Une des rares études physiologiques réalisées chez le soja a montré

ainsi qu'une augmentation de l'assimilation du SO_4^- lorsque les plantes sont traitées par NaCl (Nazar *et al.*, 2011). Pour le contenu en phosphate, par contre, il a été montré que NaCl peut être impliqué dans l'absorption et le transport de PO_4^{3-} (Termaat et Munns, 1986 ; Romero *et al.*, 1994). Mais, en raison des problèmes techniques, nous n'avons pas pu obtenir les valeurs de PO_4^{3-} lors de l'analyse des échantillons. Pour ce qui concerne de contenu en sodium, mes résultats préliminaires montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les mutants *atclcg* et le sauvage Col-0 lorsqu'elles se développent sur NaCl (données non montrées).

En conclusion, mon travail de thèse a conduit à la caractérisation d'AtCLCg, un des sept membres de la famille des CLCs chez *Arabidopsis thaliana*. J'ai pu montrer que cette protéine joue un rôle de canal chlorure putatif. Localisée sur le tonoplaste, exprimée principalement dans les cellules de mésophylle, cette protéine serait impliquée dans l'homéostasie du chlorure vacuolaire pour détoxifier le cytoplasme lorsque la plante se développe sur NaCl. J'ai également pu indiquer qu'il n'existe pas de redondance fonctionnelle entre AtCLCc et AtCLCg, mais les deux gènes codant ces deux protéines possèdent une forte relation transcriptionnelle entre eux. Ainsi, l'ensemble de mes travaux, combiné aux études précédentes, contribue à montrer l'importance des ions chlorures et la diversité fonctionnelle de la famille des CLCs dans l'homéostasie des anions dans la réponse au stress NaCl de la plante.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Matériel

I.1. Matériel végétal

Mes travaux de thèse ont été réalisés chez *Arabidopsis thaliana* dans l'accession Columbia-0 (Col-0) et dans l'accession Wassilewskija (WS). Les plantes mutantes invalidées pour le gène *AtCLCg* ont été étudiées pour déterminer le rôle de la protéine correspondante *in planta*. Ces plantes proviennent de la collection GABI-Kat (<http://www.mpiz-koeln.mpg.de/GABI-Kat/>) réalisée dans l'écotype Col-0; deux allèles nommées *atclcg-1* et *atclcg-2* correspondant aux lignées **GK-506B12-019732** et **GK-214E12-014139** respectivement. L'ADN-T inséré dans ces lignées comporte le gène de résistance à la sulfadiazine. La figure R-5A montre la position des insertions ADN-T dans le gène *AtCLCg*.

I.2. Souches bactériennes

I.2.1. *Escherichia coli*

DH5 α : La souche DH5 α (Hanahan, 1983) a été utilisée pour le clonage classique. Le génotype de cette souche est : F⁻ ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ* ⁻.

XL10-Gold® : La souche (fournie par Stratagene) a été rendue ultra compétente pour la transformation de grandes molécules d'ADN avec une grande efficacité. Son génotype est: Tet^r Δ (*mcrA*)183 Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F' *proAB lacI^qZ* Δ M15 Tn10(Tet^r) Amy Cam^r].

DB3.1 : La souche DB3.1 (fournie par Invitrogen) a été utilisée pour entretenir les vecteurs de type Gateway « vide » et vecteurs de destination. Ces vecteurs contiennent le gène suicide *ccdB* codant la protéine ccdB, un poison naturel qui agit sur l'ADN gyrase et qui bloque la croissance de la bactérie. Une mutation de la gyrase (*gyrA462*) rend les bactéries DB3.1 résistantes à l'action de ccdB. Le génotype de cette souche est : F⁻

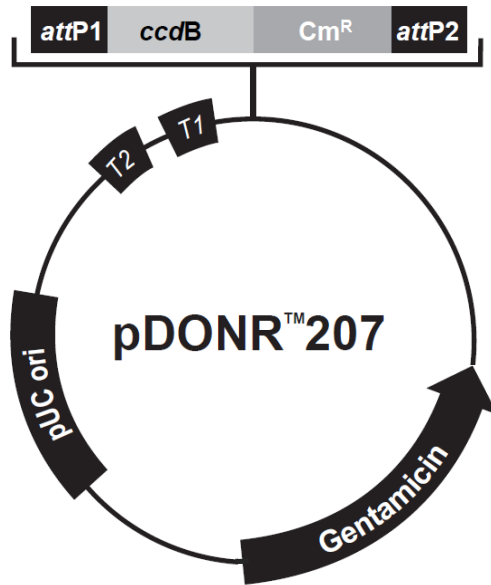


Figure M-1 : Plasmide d'entrée de clonage Gateway™ pDONR207

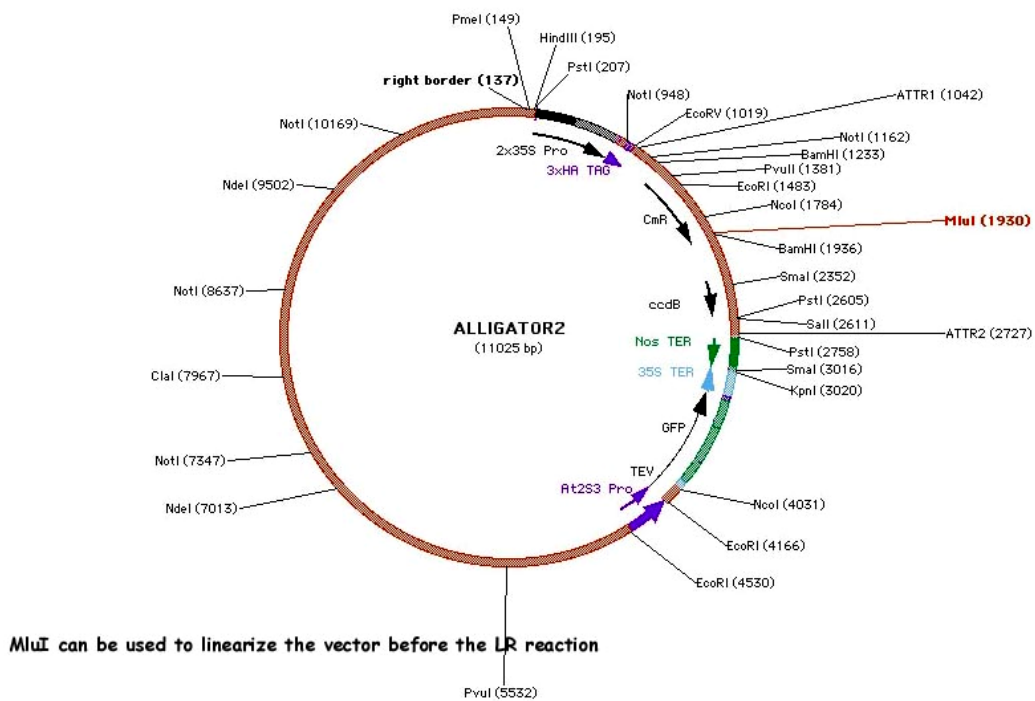


Figure M-2 : Plasmide pAlligator2 utilisé pour la surexpression d'ADNc chez *Arabidopsis thaliana*

gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r_B⁻, m_B⁻) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(SmR) xyl-5 λ-leu mtl-1.

I.2.2. *Agrobacterium tumefaciens*

LBA4404 : La souche *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 a été utilisée lors de nos expériences de transformation d'*Arabidopsis thaliana*. Cette souche est dérivée d'une souche sauvage à octopine (Ach5) porteuse du plasmide pAL4404 contenant la région Vir sans ADN-T (Komari *et al.*, 1996). Le marqueur de sélection de ce plasmide est le gène de résistance à la rifampicine.

I.3. Plasmides

I.3.1. Plasmide d'entrée de clonage Gateway (Invitrogen)

pDONR207 est un vecteur donneur permettant le clonage des ADNc d'intérêt dans le système Gateway (Figure M-1). Il confère la résistance au chloramphénicol et à la gentamicine avant et après la recombinaison respectivement (Invitrogen).

I.3.2. Plasmide utilisé pour la surexpression d'ADNc chez *Arabidopsis thaliana*

Le plasmide **pAlligator2** est utilisé pour la transformation par *Agrobacterium tumefaciens* de façon stable des plantes d'*Arabidopsis thaliana* (Bensmihen *et al.*, 2004). Il s'agit d'un vecteur binaire conférant la résistance à la spectinomycine chez les bactéries. Il permet la synthèse de la protéine GFP sous le contrôle du promoteur *At2S3* et, ainsi d'observer une fluorescence exclusivement dans les graines facilitant la sélection des transformants en T1. Il permet également de former une protéine fusion contenant un tag HA en position N-terminale (Figure M-2).

pMDC43, un vecteur destinataire pour l'analyse de la localisation subcellulaire des protéines, est utilisé pour la transformation transitoire de protoplastes de mésophylle d'*A. thaliana* (Curtis et Grossniklaus, 2003). Il s'agit d'un vecteur binaire conférant la résistance à la kanamycine et à l'hygromycine chez les bactéries et la plante respectivement (Figure M-3). Il permet la fusion de la protéine GFP à la protéine d'intérêt en position N-terminale sous le contrôle du double promoteur 35S (2x35S promoteur).

pKGWFS7 est un vecteur binaire utilisé pour l'analyse du promoteur d'un gène d'intérêt *via* l'expression de la protéine fusion GFP-GUS sous le contrôle du promoteur du

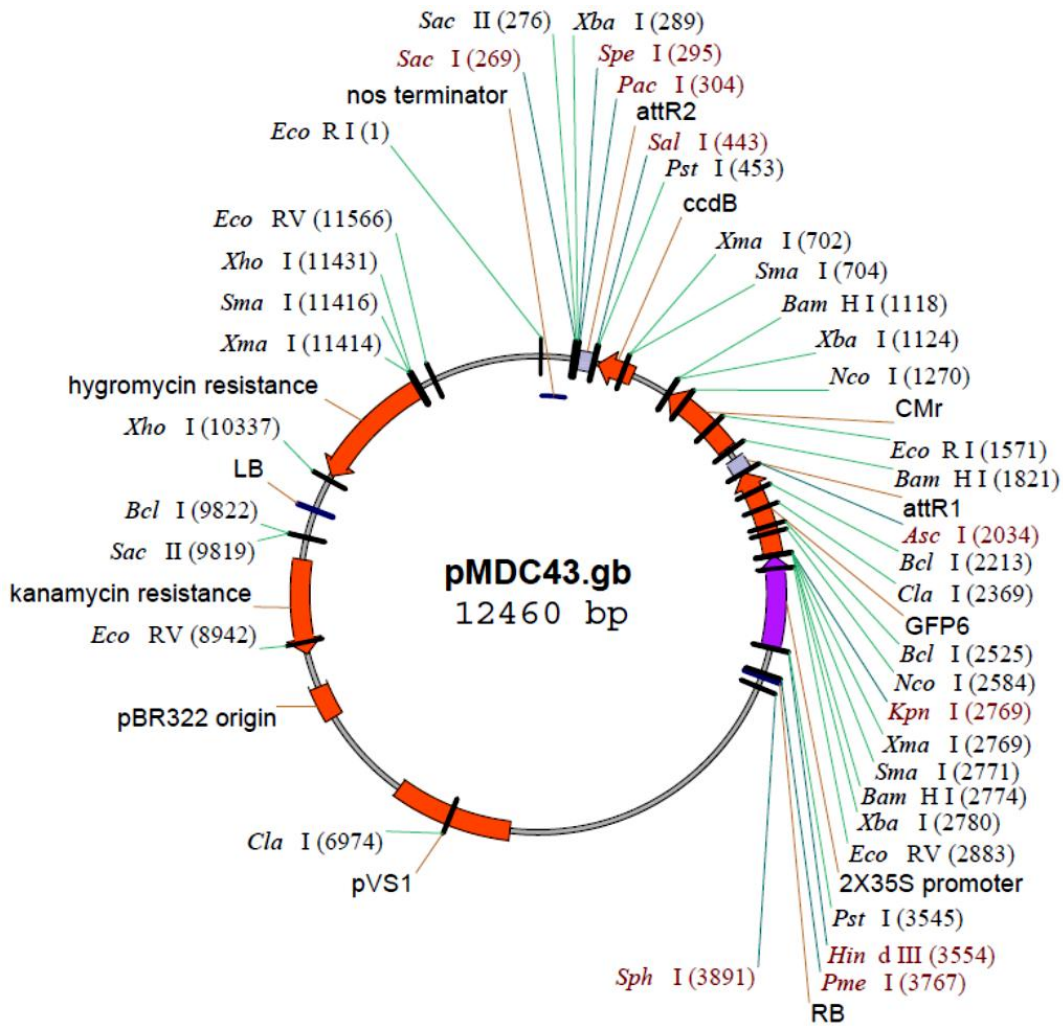


Figure M-3 : Vecteur destinataire pMDC43 pour l'analyse de la localisation subcellulaire des protéines

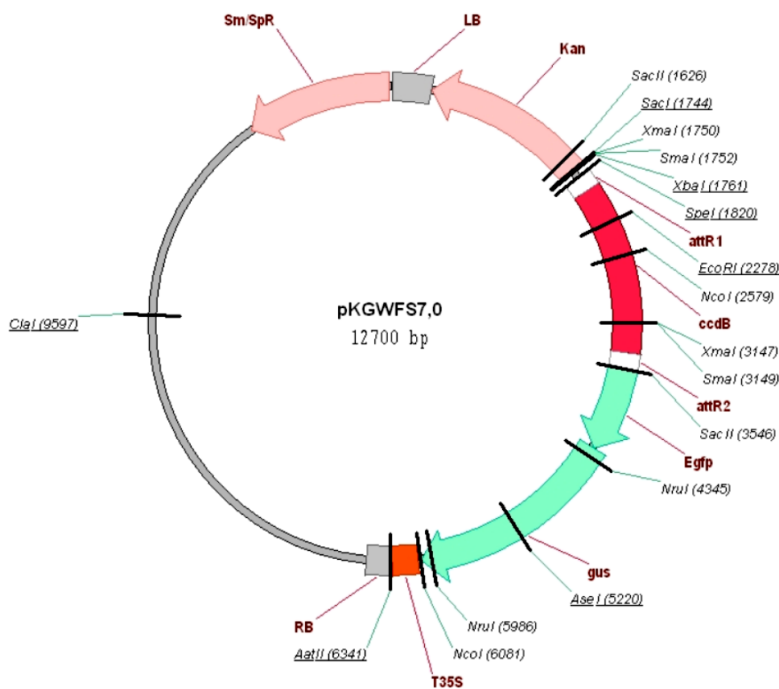


Figure M-4 : Vecteur binaire pKGWFS7 utilisé pour l'analyse du promoteur

gène d'intérêt (Karimi *et al.*, 2002). Ce vecteur confère la résistance à la spectinomycine chez la bactérie et à la kanamycine chez la plante (Figure M-4).

I.4. Amorces nucléotidiques

Pour réaliser les manipulations de biologie moléculaire, les amorces spécifiques sont utilisées. Leurs noms, séquences et les températures d'hybridation pour chaque couple d'amorces sont indiqués dans le tableau M-1.

II. Méthodes

II.1. Méthodes relatives aux plantes

II.1.1. Stérilisation des graines

La solution de stérilisation (1 mL) est ajoutée à 20 mg de graines pendant 5 min avec agitation dans le tube Eppendorf® 1,5 mL. Les graines sont ensuite rincées par quatre bains de 1 minute à l'éthanol 95% puis séchées sous hotte à flux laminaire pendant 5 heures. Une fois les graines sèches, les tubes sont fermés et gardés ainsi stériles. La composition de la solution de stérilisation est: solution de javel (NaOCl 800mM) 10% (v/v) et éthanol 90% (v/v).

II.1.2. Culture *in vitro* de plantules d'*Arabidopsis thaliana*

Les graines stériles sont semées sur milieu ½MS, puis vernalisées pendant 48h à 4°C à l'obscurité afin de lever la dormance et d'homogénéiser la germination. Les graines sont ensuite placées dans un caisson de culture (cf. tableau M-2).

Les plantules se sont développées dans des boîtes carrées 12x12 cm contenant 60 mL de milieu ½MS autoclavé, solidifié par l'ajout de phytigel 5% (Sigma®). Les boîtes sont fermées à l'aide d'un scotch perméable à l'air (Sparadrap URGOPORE en bobine). Ces dernières sont placées à la verticale sur des racks dans la chambre de culture Sanyo® ayant des conditions de lumière, température et humidité contrôlées (Tableau M-2). Après trois semaines de croissance, les parties foliaires et racinaires ont été récupérées séparément, pesées et stockées dans des tubes Eppendorf®. Les tubes sont placés immédiatement dans l'azote liquide et ensuite stockés à -80°C avant de poursuivre la procédure de traitement des échantillons.

Tableau M-1 : Noms, séquences et températures d'hybridation des amorces utilisées dans ce travail

Nom	Amorce sens (5' → 3')	Amorce anti sens (5' → 3')	T°C hybridation
Pour introduire les inserts dans le vecteur donneur pDONR207 (amorces avec cassette Gateway®)			
attBCLCg	TACAAAAAAGCAGGCTTCATGCCAA ACTCAACGACGGA	CAAGAAAGCTGGGTCTGAGAAGAA AGGCAGCCGAA (avec codon stop)	56
		CAAGAAAGCTGGGTCTCATGAGAAG AAAGGCAGCC (sans codon stop)	56
attBPro	TACAAAAAAGCAGGCTTCAAAGAG CTTCTTCATCATCA	CAAGAAAGCTGGGTCTTGGAACTT TGACGAAGTAG	56
Pour qRT-PCR			
qAtCLCg	TGCCAACGTCTGTCCAAT	ACTTAACACCGGCGAGATTC	55
qAtCLCc	GACGATGGATCTGTCCGATT	AAGCGCCCATTTGAGAAAC	55
qActine2	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC	55
qNHX2	AAAGCGACCACCAGTACCAC	CAAACACAGGACGCATGAAG	55
Pour séquencer			
Amorces universels	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGC AGGCTTC (U3)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCT GGGTC (U5)	56
Pour sélectionner les mutants <i>atclcg</i> homozygotes			
AtCLCg entier	ATGCCAAACTCAACGACGGAGGAC (CLCgF)	TCATGAGAAGAAAGGCAGCCGAAT CC (CLCgR)	56
AtCLCg partiel	AGGGCCTATGGTGCATACTG (CLCgLP)	AAACCGTCCATACGATGCTC (CLCgRP)	57
GABI	TATTGACCATCATACTCATTGC (GABI-LB)	GTGGATTGATGTGATATCTCC (GABI-RB)	56
Pour quantifier les différentes formes d'ADNc (qRT-PCR)			
ADNc total	CCATCAAAAACCTTTTCAGCA	TGAGTTTGAACCAAGCAGCA	56
ADNc (+72)	AGACACATACACACAAGTAAATGT	AAGGCTAGCTAGATCATTGTAGTGA	56
ADNc (+14)	CATATATGAGAGTTTTTCTGTCCA G	AAGGCTAGCTAGATCATTGTAGTGA	56
Pour la détection des transcrits partiels chez les mutants			
1 - 2	TGCCAACGTCTGTCC AAT	ACTTAACACCGGCGAGATTC	57
3 - 4	CCATCAAAAACCTTTTCAGCA	TGAGTTTGAACCAAGCAGCA	57
5 - 6	TGCCTCTCCGTACACTGTTG	ATCCGAAGCCTTTTCCACTT	57

- **Le milieu ½MS** : pour 1 L de ½MS : poudre MS (Sigma réf. M5524) 2,15 g ; phytigel 5 g. L⁻¹ ; pH 5,8

II.1.3. Culture de plante d'*Arabidopsis thaliana* en système hydroponie (Orsel *et al.*, 2004)

Les graines d'*Arabidopsis* stérilisées sont semées sur les porte-graines contenant la solution demi-nutritive solidifiée avec 0,8% phyto-agar stérilisée (trois graines par porte-graines). Les portes-graines ont été placées dans des boîtes plastiques transparentes, pour permettre le passage de la lumière, garder l'humidité et éviter la contamination par les moisissures. Les boîtes sont renfermées par du papier d'aluminium et placées à 4°C pendant 48h. Ensuite, les boîtes sont placées dans la chambre de culture pendant 10 jours (Tableau M-2). Les portes-graines contenant les plantules sont transférées dans les bacs contenant la solution nutritive standard. La solution nutritive dans les bacs est renouvelée grâce à un système de tuyaux liés avec un bidon contenant la solution stock qui est changée tous les deux jours, *via* une pompe (Ismatec® Peristaltic pump MV-CA). Une autre pompe à air assure la présence d'air dans la solution nutritive. Le tout est placé dans un caisson de culture sous les conditions intensité de lumière à 150 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$, température à 21°C le jour et 19°C la nuit, humidité relative à 75%, photopériode de 16 h lumière. L'humidité des plantules est assurée par pulvérisation d'eau ultra pure une fois par jour pendant la première semaine. Les plantules sont ensuite triées pour retenir celles qui sont homogènes de la taille de la rosette de 2 - 4 feuilles. Après 2 semaines de croissance dans le milieu nutritif standard qui contenait 6 mM NO₃⁻, les plantes subissent le traitement limitant en NO₃⁻ en les plaçant sur 0,2 mM NO₃⁻ pendant 2 jours. Ensuite, elles sont transférées à nouveau sur milieu standard 6 mM NO₃⁻ pendant 1h. Le prélèvement de matériel biologique est effectué après le temps désigné pour l'expérience (1, 48, et 120h en condition limitante et 1h après réinduction) et stocké à -80°C.

- **Le milieu nutritif standard 6 mM NO₃⁻** : 3 mM KNO₃, 1,5 mM Ca(NO₃)₂, 2 mM MgSO₄, 2 mM KH₂PO₄, 1 mM K₂SO₄, 0,7 mM CaCl₂, 10 μM MnSO₄, 24 μM H₃BO₃, 3 μM ZnSO₄, 0,9 μM CuSO₄, 0,04 μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄, iron-EDTA 10 mg l⁻¹ (Sequestrene, Ciba-Geigy).

Tableau M-2: Conditions de cultures des plantes

	Lumière	Température	Nuit	Température	Hygrométrie
Chambre de culture	16h	21°C	8h	21°C	70%
Enceinte S3	16h	21°C	8h	19°C	80%
Serre	16h	23°C	8h	23°C	70%

Tableau M-3: Marqueurs de sélection pour les vecteurs utilisés

Vecteur	Marqueur de sélection chez la plante		Marqueur de sélection chez la bactérie		Note
	Antibiotique	Concentration	Antibiotique	Concentration	
pAlligator2			Spectinomycine	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Génération les plantes complémentées Observation de GFP dans la graine
pMDC43	Hygromycine	20 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Kanamycine	50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Etude la localisation subcellulaire de la protéine
pKGWFS7	Kanamycine	50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Spectinomycine	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Etude l'expression tissulaire de la protéine

– **Le milieu limitant en N 0,2 mM NO₃⁻** : la même composition que le milieu 6 mM NO₃⁻ sauf : 0.1 mM KNO₃, 0,05 mM Ca(NO₃)₂ et 2,45 mM K₂SO₄, 2,15 mM CaCl₂ au lieu de 1 mM K₂SO₄, 0,7 mM CaCl₂.

II.1.4. Production des plantes transgéniques par la transformation avec *Agrobacterium tumefaciens* par la technique « Floral Dip »

II.1.4.1. Transformation

La technique « Floral Dip » (Clough et Bent, 1998) a été utilisée pour obtenir les plantes transgéniques. Les plantes sont cultivées en caisson en jour long (cf. tableau M-2) jusqu'au début du stade de floraison. En même temps, la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 contenant la construction d'intérêt a été cultivée en pré culture dans 5 mL de milieu 2YT liquide en présence des antibiotiques adéquats (rifampicine 200 mg/L final pour le vecteur avec le gène Vir ; spectinomycine 100 mg/L pour le vecteur binaire pAlligator2) pendant 24 h à 30°C sous agitation (150 rpm). Ensuite, un erlen de 300 mL de 2YT a étéensemencé avec 1 mL de pré culture pendant 24 h à 30°C toujours sous agitation. La culture bactérienne est ensuite centrifugée à 5000 g pendant 20 minutes à 15°C dans les tubes Falcon de 50 mL. Le culot bactérien a été resuspendu dans une solution contenant du sucre 5% à une densité optique à 600 nm (DO₆₀₀) de 1,0. L'agent mouillant Silwet L-77 (Lehle Seeds) a été ajouté à la concentration finale de 0,05% dans le but de faciliter la pénétration des agrobactéries dans les interstices cellulaires. Les siliques présentes sur les hampes florales sont éliminées grâce à des ciseaux, puis les hampes florales sont plongées dans la suspension d'*Agrobacterium* pendant 5 minutes (méthode de « Floral Dip »). Les plantes ont ensuite été placées sous cloche pendant 2 jours afin de créer une atmosphère saturée en humidité.

La culture des plantes s'est déroulée dans l'enceinte en jour long (cf. tableau M-2) jusqu'à la fin du stade reproductif. Les graines séchées sont récoltées puis sélectionnées *in vitro* en présence de l'agent de sélection adéquat (antibiotique) afin d'identifier celles ayant intégré la construction d'intérêt.

- **La composition du milieu 2YT** : Pour 1 L de 2YT : bactotryptone 16 g ; extrait levure 10 g ; NaCl 5 g ; pH 7.

II.1.4.2. Sélection

Les lignées T0 résistantes, résultant des graines transformées, sont sélectionnées soit par l'antibiotique adéquat soit par le signal de fluorescence GFP.

Dans le cas de sélection par antibiotique, les graines ont été semées sur la boîte ½MS avec l'antibiotique de sélection convenable pour chaque vecteur, la concentration d'antibiotique utilisé est indiquée dans le tableau M-3. Après la vernalisation à 4°C pendant 2 jours, les boîtes sont ensuite placées dans la chambre de culture Sanyo®. Seules les graines transformées sont capables de se développer et de former les plantes T0. Les graines non transformées quant à elles dépérissent après avoir atteint le stade deux cotylédons à cause de l'absence du gène de résistance à l'agent de sélection intégré dans le vecteur destinataire.

Dans le cas de la sélection sous microscope, les graines transformées qui émettent les signaux de GFP sont sélectionnées, ensuite transférées sur milieu ½MS additionnée de 1% saccharose pendant 1 semaine avant d'être placées sur terreau en serre pour la production des graines par autofécondation. Les graines des lignées de plantes T1 sont récoltées. La ségrégation est analysée afin de sélectionner celles qui donnent ¾ graines résistantes à l'antibiotique (ou fluorescentes) : ¼ graines non résistantes (ou non fluorescentes) afin de sélectionner les plantes avec 1 insertion.

Les graines des lignées T1 sélectionnées sont cultivées *in vitro* et transférées ultérieurement en terre pour la production des graines. A la génération suivante T2, sont sélectionnées les lignées homozygotes qui donnent 100% de graines résistantes à l'antibiotique de sélection ou 100% de graines fluorescentes. C'est sur ces lignées homozygotes que l'ensemble de nos expériences a été réalisé.

II.1.5. Transformation transitoire de protoplastes d'*Arabidopsis thaliana*

La suspension cellulaire a été préparée à partir de cellules du mésophylle en culture d'*Arabidopsis* sauvage. Les cellules sont repiquées régulièrement sur milieu JPL et maintenir sur la plate-forme de culture en lumière continue à 21°C et à 3 g agitation.

- **Le milieu JPL 1X** : le milieu Jouanneau et Peaud-Lenoel (1967) est un milieu complet et synthétique utilisé pour la culture de protoplaste en suspension.

- **La composition** : KNO₃ 19,43 mM, CaCl₂ 0,9 mM, MgSO₄ 0,45 mM, KH₂PO₄ 0,375 mM, Fe-EDTA 5 µM, hydrolysate caséine 0,1 g/L, myo-inositol 550 µM, glycine 26,6 µM, hormone ANA (acide naphthalène acétique) 1,07 µM, NaH₂PO₄ 0,03 mM, Na₂HPO₄ 0,06 mM, les micro-éléments 1X, la solution vitamine 1X, saccharose 43,8 mM

- **Les micro-éléments 3333X** : H₃BO₃ 100 mM, KI 5 mM, MnSO₄ 100 mM, ZnSO₄ 30 mM, Na₂MoO₄ 1 mM, CuSO₄ 0,1 mM, CoCl₂ 0,1 mM

- **La solution vitamines 1000X** : thiamine HCl 1,18 mM, acide nicotinique 4,08 mM, pyridoxine HCl 2,43 mM

II.1.5.1. Préparation des protoplastes

40 mL d'une culture cellulaire d'*A. thaliana* à 30% sont placés dans un tube Flacon de 50 mL puis centrifugés à 200 g sans frein pendant 5 min et à 20°C. Le culot est remis en suspension dans 25 mL de solution enzymatique puis complété jusqu'à 75 mL par du JPL 0,34 M, le tout est placé dans un erlen de 250 mL stérile. Il est ensuite incubé pendant 3 h à 3 g agitation à 21°C. Après ce temps d'incubation, la culture cellulaire est centrifugée à 200 g sans frein pendant 5 min et à 20°C. Le culot est ensuite homogénéisé avec 25 mL de JPL 0,34 M et à nouveau centrifugé à 200 g sans frein pendant 5 min et à 20°C. Le culot est alors délicatement homogénéisé dans 1 mL de JPL 0,28 M puis complété jusqu'à 5 mL avec du JPL 0,28 M et enfin centrifugé à 200 g sans frein pendant 5 min et à 20°C. Trois phases se distinguent, la première phase contient les protoplastes, la seconde phase contient le JPL 0,28 M et la dernière phase contient les débris cellulaires. La phase contenant les protoplastes est récupérée à l'aide d'une pipette stérile puis placée dans le tube de culture de 13 mL à 4°C. Les protoplastes sont dilués au 1/20 dans du JPL 0,34 M puis comptés grâce à une cellule de Malassez afin de connaître leurs concentrations.

- **La solution JPL 0,34 M** : JPL 1X, glucose 167,4 mM, mannitol 169,2 mM et pH 5,5 avec KOH 1 M

- **La solution JPL 0,28 M** : JPL 1X, saccharose 280 mM et pH 5,5 avec KOH 1M

- **La solution enzymatique** : JPL 0,34 M, cellulase RS 1% (p/v) et macerozyme R10 0,2% (p/v)

II.1.5.2. Transformation des protoplastes

Dans un tube de culture de 13 mL, 10 μ g d'ADN plasmidique dilués dans 15 μ L d'eau ultra pure sont ajoutés à 2.10⁵ protoplastes dans 50 μ L de JPL 0,34 M. Le tout est mélangé puis 150 μ L de solution de PEG en état de décongélation sont ajoutés et le tube est placé 15 min à l'obscurité sous agitation. 500 μ L de Ca(NO₃)₂ 275 mM sont ajoutés et le tout est mélangé doucement, 500 μ L de Ca(NO₃)₂ 275 mM sont à nouveau additionnés et le tube est homogénéisé en tournant. Le mélange est ensuite centrifugé 5 min à 200 g sans frein, 75% du surnageant est enlevé et le culot est remis en suspension. Les protoplastes sont ensuite recentrifugés 5 min à 200 g sans frein puis le culot est repris dans 500 μ L de JPL 0,34 M et le mélange est homogénéisé. Les protoplastes sont ensuite placés à l'obscurité à 21°C pendant 24 à 72 h.

- **PEG** : PEG 6000 25% (p/v), Mannitol 450 mM, Ca(NO₃)₂ 100 mM et pH ajusté à 9 avec KOH 2 M

II.2. Méthodes relatives aux bactéries

II.2.1. Transformation des bactéries *E. coli* par choc thermique

100 μ L de bactéries thermo compétentes sont prélevés du stock conservé à -80°C, mis dans un tube Falcon® et plongé dans la glace puis 4 μ L de β -mercaptoéthanol ont été ajoutés afin de faciliter l'entrée du vecteur. Une quantité de 50 ng d'ADN est ajoutée dans l'aliquote cellulaire et l'échantillon est incubé dans la glace pendant 30 minutes. Ensuite, le tube Falcon® est plongé dans le bain-marie à 42°C pendant 30 secondes, puis dans la glace pendant 2 minutes. 900 μ L de la solution S.O.C. préchauffée à 42°C sont ajoutés dans le tube et il est alors incubé à 37°C pendant 1 h sous agitation à 250 rpm. Le mélange de transformation est étalé sur la boîte LB agar contenant l'antibiotique adéquat. La boîte de Pétri est mise à 37°C pendant la nuit pour faciliter la croissance des colonies.

- **S.O.C.** (pour Super Optimal broth with Catabolite repression): bacto-tryptone 20g/L, bacto-yeast Extract 5g/L, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10mM et glucose 3,6g/L

II.2.2. Transformation d'*A. tumefaciens* par choc électrique

Pour réaliser la transformation des plantes avec *A. tumefaciens*, les vecteurs d'expression sont introduits dans la bactérie par choc électrique. 50 μ L de bactérie *A.*

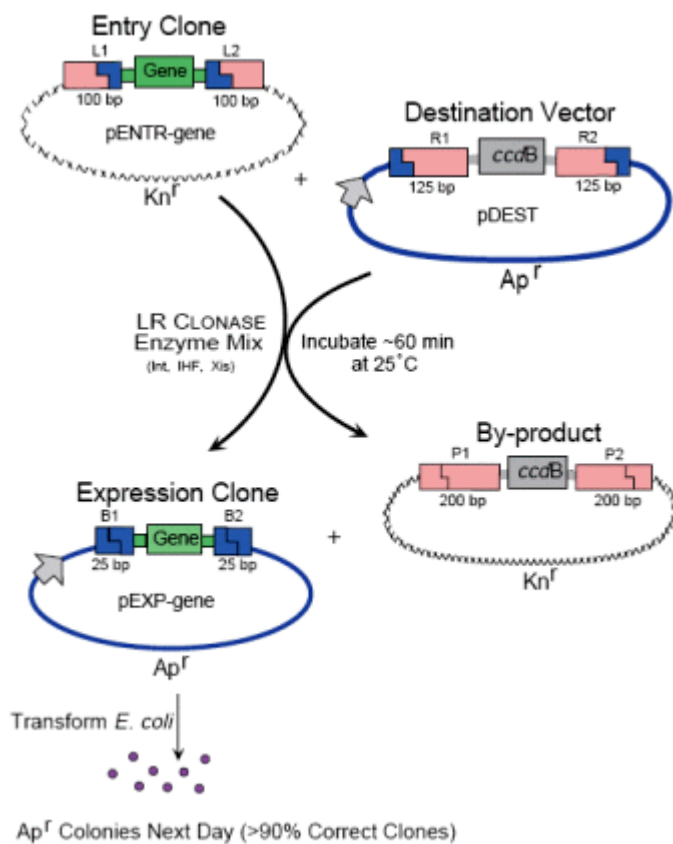
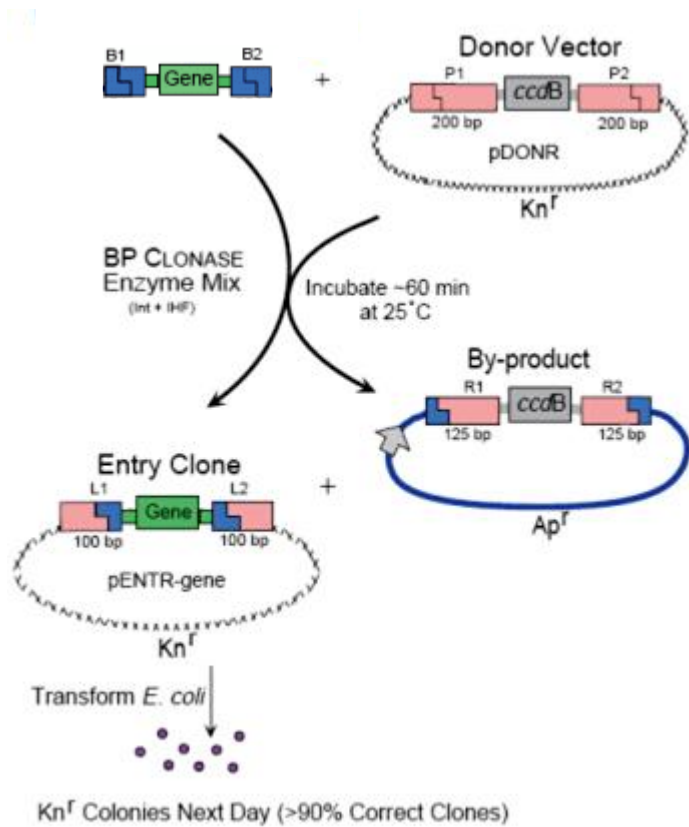


Figure M-5 : Système de clonage Gateway®
 (<http://bioinformx.com/lims/bxseqtools/ultimate-molecular-cloning-guides/Gateway-Cloning>)

tumefaciens sont mélangés à 15 ng d'ADN plasmidique dans une cuve à électroporation. Cette dernière est placée dans un électroporateur (BIORAD® Gene Pulser Mxcell Electroporation system) réglé sur 2500 V, 120 mΩ et 40 μA, le choc électrique est réalisé pendant 0,4 ms. 1 mL de milieu SOC est ajouté puis les bactéries sont mises à incuber 3 h à 30°C à 250 rpm. Le mélange de transformation est étalé sur milieu Y2T solide additionné d'antibiotique convenable et placé une nuit à 30°C pour sélectionner les colonies le lendemain.

II.3. Méthodes de biologie moléculaire

II.3.1. Extraction rapide d'ADN génomique végétal

Ce protocole est basé sur la méthode décrite par Edwards *et al.* (1991). Environ 50 - 100 mg de matériel végétal est prélevé puis congelé dans de l'azote liquide dans un tube de 1,5 mL contenant trois billes de fer. L'échantillon est broyé mécaniquement par un broyeur (Qiagen Tissue Lyser Retsch MM301 Mixer), puis sont ajoutés 400 μL de tampon d'extraction (200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, et 0.5% SDS). L'ensemble est vortexé quelques secondes, les débris sont ensuite culotés par une centrifugation de 10 minutes à 13 000 g au froid (4°C). Une partie du surnageant (300 μL) est transféré dans un nouveau tube de 1,5 mL et 300 μL d'isopropanol sont ajoutés afin de précipiter les acides nucléiques. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, l'ADN génomique est culoté par centrifugation (15 min, 13 000 g). Le culot est lavé à l'éthanol 70% glacial puis est laissé sécher 2 minutes sous vide au Speed-Vac®. L'ADN génomique est finalement dissout dans 30 μL d'eau déionisée, sa concentration est mesurée au nano drop (Thermo Fisher Scientific Inc. - NanoDrop 1000) et il est stocké à -20°C.

II.3.2. Construction de plasmides par la technique Gateway®

Le système Gateway® est basé sur les réactions de recombinaison permettant l'intégration directionnelle d'un produit PCR (portant le gène d'intérêt et deux sites de recombinaison *attB* ajoutés grâce aux amorces de PCR) dans un vecteur donneur (portant deux sites *attP*) grâce à une réaction de recombinaison dite « BP ». Le produit de cette première recombinaison, contenant deux nouveaux sites de recombinaison *attL*, appelé vecteur d'entrée, sert de matrice à une seconde recombinaison, dite « LR » avec un vecteur de destination (portant deux sites de recombinaison *attR*) pour obtenir un vecteur d'expression (Figure M-5).

Le gène *AtCLCg* est amplifié par 35 cycles de PCR avec l'enzyme haute fidélité Phusion® (ADN polymérase Phusion® a été développée par Finnzymes, Thermo Fisher Scientific New England Biolabs) avec les amorces indiquées dans le tableau M-1 à partir de la population d'ADN génomique. Ces amorces permettent d'obtenir le gène *AtCLCg* génomique avec les deux extrémités 5' et 3' contenant la séquence *attB* nécessaire à la recombinaison avec les fragments *attP* sur le vecteur pDONR207. Deux constructions sont réalisées afin d'avoir soit un ADN génomique entier pour permettre la réalisation de fusion en N-terminale de la protéine, soit un ADN génomique dépourvu du codon STOP pour réaliser la fusion en C-terminale de la protéine. Ces constructions permettent d'obtenir ultérieurement la protéine fusion dans les deux sens, en amont et en aval, de la protéine intérêt.

L'amplicon a été purifié par le kit « illustra GFX® 96 PCR Purification Kit » (GE Healthcare®). 100 ng du produit PCR sont additionnés à la même quantité de vecteur pDONR207 pour permettre une réaction BP grâce à l'enzyme BP clonage II (Invitrogen®) qui a lieu à 25°C pendant la nuit selon les recommandations du fabricant. L'activité de l'enzyme est désactivée par ajout 1 µL de protéinase K pendant 10 min à 37°C.

Les bactéries *Escherichia coli* de souche XL 10-Gold (Stratagene®) sont transformées avec 1 µL de produit BP. Les colonies sont sélectionnées sur LB agar additionné de gentamycine à la concentration de 80 µg. mL⁻¹. La présence du gène *AtCLCg* a été vérifiée par PCR sur colonies avec les amorces spécifiques (cf. tableau M-1). Ensuite, une extraction plasmide « miniprep » (QuickLyse Miniprep Kit - Qiagen®) a été effectuée. Les plasmides extraits ont été envoyés à séquencer chez la compagnie GATC biotech (www.gatc-biotech.com).

Une fois que nous avons obtenu le vecteur d'entrée (pDONR207::*AtCLCg*), ce dernier est utilisé pour effectuer la réaction LR avec les différents vecteurs destinataires en fonction de l'objectif recherché.

II.3.3. Extraction d'ARN total au Trizol / Chloroforme

Environ 50 - 100 mg de tissu végétal, broyé dans un tube de 2 mL en présence de l'azote liquide, sont homogénéisés dans 1 mL de Trizol. Le tube est incubé 5 minutes à 30°C. Ensuite, 0,2 mL de chloroforme sont ajoutés. Le tube est agité au vortex 15 secondes et incubé 2 à 3 minutes à 30°C. Le tube ensuite est centrifugé à 12 000 g pendant 15

minutes à 4°C. Le mélange est séparé en une phase inférieure rouge, la phase de phénol-chloroforme, une interphase, et une phase aqueuse supérieure sans couleur. L'ARN reste exclusivement dans la phase aqueuse. Cette dernière est transférée dans un nouveau tube contenant 0,5 mL d'isopropanol. Le tube est inversé et laissé 10 minutes à 30°C. Après une centrifugation à 12 000 g pendant 15 minutes à 4°C, le précipité d'ARN, souvent invisible avant centrifugation, forme un culot colloïdal (texture proche de la gélatine) au fond du tube. Le tube ensuite est laissé sécher sur le papier absorbant pendant 20 minutes afin d'enlever complètement l'isopropanol. Le culot d'ARN est lavé avec 1 mL d'éthanol à 70% au froid, après une centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes à 4°C. L'éthanol est enlevé complètement du tube en le laissant 2 minutes sous vide. Le culot est resuspendu dans 500 µL d'eau ultra pure. La solubilisation d'ARN est facilitée par une incubation de 10 minutes à 60°C. Les concentrations des ARNs sont mesurées par spectrométrie à 260 nm (NanoDrop). Les ARNs sont migrés ensuite sur gel d'agarose 2% pour vérifier le profil.

II.3.4. Transcription inverse (RT) pour synthèse d'ADNc

Avant de réaliser la réaction de transcription inverse à partir des ARNs extraits, tout l'ADN contaminant est éliminé par un traitement à la DNase avec le kit « DNase-free » (Fermentas®). Une quantité de 1 µg ARN est préparé, ensuite 1 µL de tampon 10X (avec MgCl₂) et d'enzyme DNase (1 unité) sont ajoutés. Le tout est incubé à 37°C pendant 30 minutes. L'activité de l'enzyme est arrêtée après ajout de 1 µL EDTA et incubation à 65°C pendant 10 minutes.

L'ADNc est synthétisé avec le kit « SuperScript III First-Strand Synthesis » (Invitrogen®) selon le protocole fourni par Invitrogen. Un mélange de 1 µL oligonucléotide d(T)₂₀ et 1 µL dNTP 10 mM est préparé, ensuite sont ajoutés 3 µg d'ARN ajusté au volume final de 10 µL par l'eau traitée au diéthyl pyrocarbonate (DEPC). Après une incubation à 65°C pendant 5 minutes, la réaction est plongée dans la glace pendant au moins 1 minute. 2 µL de tampon 10X RT; 4 µL MgCl₂ 25 mM; 2 µL DTT 0,1 M; 1 µL RNaseOUT et 1 µL d'enzyme SuperScript III RT sont ajoutés, le tout est incubé à 50°C pendant 50 minutes. La réaction est ensuite incubée à 85°C pendant 5 minutes et plongée dans la glace. Un volume de 1 µL de RNase H est ajouté et la réaction est incubée à 37°C pendant 20 minutes. L'ADNc est conservé à -20°C et prêt pour l'utilisation lors d'expérience de PCR simple ou PCR quantitative en temps réel.

II.3.5. PCR quantitative en temps réel - qRT PCR

La quantification des ADN s'est faite de façon relative par rapport à un gène de référence. L'analyse de l'expression de l'ensemble des gènes dans ce travail a été réalisée avec le kit LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science). Les réactions PCR quantitative sont réalisées sur des plaques de 96 puits, chaque puits contenant 5 µL mélange SYBR Green I ; 1 µL amorce sens et anti-sens à la concentration de 10 µM; 0,5 µL d'eau DEPC et 2,5 µL d'ADNc. L'expression des gènes d'intérêt a été normalisée avec les expressions des gènes de référence *actine2*, *UBQ10* ou *TUB4*. Il est nécessaire de noter que dans ce manuscrit ne sont présentés que les résultats d'expression des gènes normalisés avec l'*actine2*. Mais pour chaque réaction de qRT PCR, la normalisation a été vérifiée également avec *UBQ10* et *TUB4*. Le même profil d'expression des gènes d'intérêt par rapport à l'*actine2* a été obtenu avec ces deux gènes de référence. Le profil thermique utilisé était de 2 minutes à 50°C et 10 minutes à 95°C, suivi par 45 cycles de 30 secondes à 95°C, 30 secondes à 60°C et 30 secondes à 72°C.

La présence d'un amplicon unique dans chaque réaction PCR a été confirmée par référence aux courbes de fusion. La courbe standard a été obtenue à partir des réactions par les amorces spécifiques de l'*actine2* et une série de cinq dilutions de la matrice d'ADNc. La quantité relative pour chaque échantillon d'ADNc a été déterminée en normalisant avec la courbe standard, et a été calculé comme la moyenne arithmétique des trois réactions indépendantes. Les données sont représentatives de trois expériences biologiques indépendantes.

Pour chaque couple d'amorces, l'efficacité d'amplification a été vérifiée avant d'utilisation pour mesurer l'expression du gène correspondant. Ces valeurs doivent être supérieures à 1,9 et inférieures à 2,0.

II.3.6. Dosage des anions par analyseur DX-120 DIONEX®

50mg de matériel végétal sont récupérés et ensuite broyés en poudre dans un tube Eppendorf de 2 mL. 1mL d'eau ultra pure est ajouté dans les tubes. Ces derniers sont congelés - décongelés 3 fois de suite (-20°C / 20°C). Après une centrifugation à 21°C à 10 000 g pendant 10 minutes, 200 µL de surnageant sont récupérés dans un tube Eppendorf de 1,5 mL contenant 500 µL d'eau ultra pure. Les tubes sont stockés à -20°C pour être analysés à l'aide d'analyseur DX-120 Dionex®. Les dosages sont assurés par la plateforme

de Chimie du Végétale (PFCV) de Versailles. Les échantillons ont nécessité des dilutions afin de rentrer dans la gamme d'étalonnage. Les valeurs de contenus en anions sont normalisées avec la gamme d'étalonnage tenant compte des dilutions et des masses fraîches prélevées.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K** (1997) Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* **9**: 1859-1868
- Accardi A, Kolmakova-Partensky L, Williams C, Miller C** (2004) Ionic currents mediated by a prokaryotic homologue of CLC Cl⁻ channels. *J Gen Physiol* **123**: 109-119
- Accardi A, Lobet S, Williams C, Miller C, Dutzler R** (2006) Synergism between halide binding and proton transport in a CLC-type exchanger. *J Mol Biol* **362**: 691-699
- Accardi A, Miller C** (2004) Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of ClC Cl⁻ channels. *Nature* **427**: 803-807
- Accardi A, Walden M, Nguitrageol W, Jayaram H, Williams C, Miller C** (2005) Separate ion pathways in a Cl⁻ / H⁺ exchanger. *J Gen Physiol* **126**: 563-570
- Agarwal S, Sairam RK, Srivastava GC, Meena RC** (2005) Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes. *Biologia Plantarum* **49**: 541-550
- Albacete A, Ghanem ME, Martinez-Andujar C, Acosta M, Sanchez-Bravo J, Martinez V, Lutts S, Dodd IC, Perez-Alfocea F** (2008) Hormonal changes in relation to biomass partitioning and shoot growth impairment in salinized tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *J Exp Bot* **59**: 4119-4131
- Alexandersson E, Fraysse L, Sjoval-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, Johanson U, Kjellbom P** (2005) Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Mol Biol* **59**: 469-484
- Ambrosone A, Costa A, Leone A, Grillo S** (2012) Beyond transcription: RNA-binding proteins as emerging regulators of plant response to environmental constraints. *Plant Sci* **182**: 12-18
- Amtmann A, Fischer M, Marsh EL, Stefanovic A, Sanders D, Schachtman DP** (2001) The wheat cDNA LCT1 generates hypersensitivity to sodium in a salt-sensitive yeast strain. *Plant Physiol* **126**: 1061-1071
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373-399
- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E** (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺ / H⁺ antiport in Arabidopsis. *Science* **285**: 1256-1258
- Apse MP, Blumwald E** (2007) Na⁺ transport in plants. *FEBS Letters* **581**: 2247-2254.
- Arenas-Huertero F, Arroyo A, Zhou L, Sheen J, Leon P** (2000) Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes Dev* **14**: 2085-2096
- Argyros RD, Mathews DE, Chiang YH, Palmer CM, Thibault DM, Etheridge N, Argyros DA, Mason MG, Kieber JJ, Schaller GE** (2008) Type B response regulators of Arabidopsis play key roles in cytokinin signaling and plant development. *Plant Cell* **20**: 2102-2116

- Armengaud P, Zambaux K, Hills A, Sulpice R, Pattison RJ, Blatt MR, Amtmann A** (2009) EZ-Rhizo: integrated software for the fast and accurate measurement of root system architecture. *Plant J* **57**: 945-956
- Barbier-Brygoo H, De Angeli A, Filleur S, Frachisse JM, Gambale F, Thomine S, Wege S** (2011) Anion channels/transporters in plants : from molecular bases to regulatory networks. *Annu Rev Plant Biol* **62**: 25-51
- Barhoumi Z, Djebali W, Smaoui A, Chaibi W, Abdely C** (2007) Contribution of NaCl excretion to salt resistance of *Aeluropus litoralis* (Willd) Parl. *J Plant Physiol* **164**: 842-850
- Bauer CK, Steinmeyer K, Schwarz JR, Jentsch TJ** (1991) Completely functional double-barreled chloride channel expressed from a single Torpedo cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 11052-11056
- Beffagna N, Buffoli B, Busi C** (2005) Modulation of reactive oxygen species production during osmotic stress in *Arabidopsis thaliana* cultured cells : involvement of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase and H⁺-ATPase. *Plant Cell Physiol* **46**: 1326-1339
- Bensmihen S, To A, Lambert G, Kroj T, Giraudat J, Parcy F** (2004) Analysis of an activated ABI5 allele using a new selection method for transgenic Arabidopsis seeds. *FEBS Lett* **561**: 127-131
- Bergsdorf EY, Zdebik AA, Jentsch TJ** (2009) Residues important for nitrate/proton coupling in plant and mammalian CLC transporters. *J Biol Chem* **284**: 11184-11193
- Berthomieu P, Conejero G, Nublat A, Brackenbury WJ, Lambert C, Savio C, Uozumi N, Oiki S, Yamada K, Cellier F, Gosti F, Simonneau T, Essah PA, Tester M, Very AA, Sentenac H, Casse F** (2003) Functional analysis of AtHKT1 in Arabidopsis shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBO J* **22**: 2004-2014
- Bohnert HJ, Jensen RG** (1996) Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends in Biotechnology* **14**: 89-97
- Braun NA, Morgan B, Dick TP, Schwappach B** (2010) The yeast CLC protein counteracts vesicular acidification during iron starvation. *J Cell Sci* **123**: 2342-2350
- Britto DT, Ruth TJ, Lapi S, Kronzucker HJ** (2004) Cellular and whole-plant chloride dynamics in barley : insights into chloride-nitrogen interactions and salinity responses. *Planta* **218**: 615-622
- Buchanan B, Gruissem B, Jones RL** (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Am. Soc. Plant Physiol., Rockville, Maryland
- Byrt CS, Platten JD, Spielmeyer W, James RA, Lagudah ES, Dennis ES, Tester M, Munns R** (2007) HKT1;5-like cation transporters linked to Na⁺ exclusion loci in wheat, Nax2 and Kna1. *Plant Physiol* **143**: 1918-1928
- Cailliatte R, Lapeyre B, Briat JF, Mari S, Curie C** (2009) The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity. *Biochem J* **422**: 217-228
- Chang IF, Curran A, Woolsey R, Quilici D, Cushman JC, Mittler R, Harmon A, Harper JF** (2009) Proteomic profiling of tandem affinity purified 14-3-3 protein complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics* **9**: 2967-2985
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C** (2009) Photosynthesis under drought and salt stress : regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann Bot* **103**: 551-560

- Chen S, Yin C, Strasser RJ, Govindjee, Yang C, Qiang S** (2012) Reactive oxygen species from chloroplasts contribute to 3-acetyl-5-isopropyltetramic acid-induced leaf necrosis of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem* **52**: 38-51
- Chen TH, Murata N** (2008) Glycinebetaine : an effective protectant against abiotic stress in plants. *Trends Plant Sci* **13**: 499-505
- Chen TY, Hwang TC** (2008) CLC-0 and CFTR: chloride channels evolved from transporters. *Physiol Rev* **88**: 351-387
- Chen Y, Brandizzi F** (2011) AtIRE1A/AtIRE1B and AGB1 independently control two essential unfolded protein response pathways in *Arabidopsis*. *Plant J* **69**: 266-277
- Chen Z, Pottosin, II, Cuin TA, Fuglsang AT, Tester M, Jha D, Zepeda-Jazo I, Zhou M, Palmgren MG, Newman IA, Shabala S** (2007) Root plasma membrane transporters controlling K^+ / Na^+ homeostasis in salt-stressed barley. *Plant Physiol* **145**: 1714-1725
- Chung JS, Zhu JK, Bressan RA, Hasegawa PM, Shi H** (2008) Reactive oxygen species mediate Na^+ -induced SOS1 mRNA stability in *Arabidopsis*. *Plant J* **53**: 554-565
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip : a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735-743
- Cochard H, Venisse JS, Barigah TS, Brunel N, Herbette S, Guillot A, Tyree MT, Sakr S** (2007) Putative role of aquaporins in variable hydraulic conductance of leaves in response to light. *Plant Physiol* **143**: 122-133
- Cohen J, Schulten K** (2004) Mechanism of anionic conduction across CLC. *Biophys J* **86**: 836-845
- Colmenero-Flores JM, Martinez G, Gamba G, Vazquez N, Iglesias DJ, Brumos J, Talon M** (2007) Identification and functional characterization of cation-chloride cotransporters in plants. *Plant J* **50**: 278-292
- Corratge-Faillie C, Jabnourne M, Zimmermann S, Very AA, Fizames C, Sentenac H** (2010) Potassium and sodium transport in non-animal cells : the Trk/Ktr/HKT transporter family. *Cell Mol Life Sci* **67**: 2511-2532
- Cotsaftis O, Plett D, Shirley N, Tester M, Hrmova M** (2012) A two-staged model of Na^+ exclusion in rice explained by 3D modeling of HKT transporters and alternative splicing. *PLoS ONE* **7**: e39865.
- Cramer GR** (2002) Sodium-calcium interaction under salinity stress. Chapter **10**: 205-228.
- Curtis MD, Grossniklaus U** (2003) A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes *in planta*. *Plant Physiol* **133**: 462-469
- Daniels MJ, Mirkov TE, Chrispeels MJ** (1994) The plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* contains a mercury-insensitive aquaporin that is a homolog of the tonoplast water channel protein TIP. *Plant Physiol* **106**: 1325-1333
- Davenport R** (2002) Glutamate receptors in plants. *Ann Bot* **90**: 549-557
- Davenport RJ, Munoz-Mayor A, Jha D, Essah PA, Rus A, Tester M** (2007) The Na^+ transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na^+ from the xylem in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* **30**: 497-507
- Davenport RJ, Tester M** (2000) A weakly voltage-dependent, nonselective cation channel mediates toxic sodium influx in wheat. *Plant Physiol* **122**: 823-834

- De Angeli A, Monachello D, Ephritikhine G, Frachisse JM, Thomine S, Gambale F, Barbier-Brygoo H** (2006) The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* **442**: 939-942
- De Angeli A** (2008) Thesis : Functional characterization of the vacuolar transporter CLCa from *Arabidopsis thaliana* : NO₃⁻ / H⁺ exchange activity and regulation by nucleotides
- De Angeli A, Monachello D, Ephritikhine G, Frachisse JM, Thomine S, Gambale F, Barbier-Brygoo H** (2009) Review. CLC-mediated anion transport in plant cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**: 195-201
- Demidchik V, Maathuis FJ** (2007) Physiological roles of nonselective cation channels in plants : from salt stress to signalling and development. *New Phytol* **175**: 387-404
- Dettmer J, Hong-Hermesdorf A, Stierhof YD, Schumacher K** (2006) Vacuolar H⁺-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**: 715-730
- Devuyst O, Guggino WB** (2002) Chloride channels in the kidney: lessons learned from knockout animals. *Am J Physiol Renal Physiol* **283**: F1176-1191
- Diatloff E, Peyronnet R, Colcombet J, Thomine S, Barbier-Brygoo H, Frachisse JM** (2010) R type anion channel : a multifunctional channel seeking its molecular identity. *Plant Signal Behav* **5**: 1347-1352
- Diatloff E, Roberts M, Sanders D, Roberts SK** (2004) Characterization of anion channels in the plasma membrane of Arabidopsis epidermal root cells and the identification of a citrate-permeable channel induced by phosphate starvation. *Plant Physiol* **136**: 4136-4149
- Diedhiou C, Gollmack D** (2006) Salt-dependent regulation of chloride channel transcripts in rice. *Plant Science* **170**: 793-800
- Diedhiou CJ, Popova OV, Dietz KJ, Gollmack D** (2008) The SNF1-type serine-threonine protein kinase SAPK4 regulates stress-responsive gene expression in rice. *BMC Plant Biol* **8**: 49
- Dutka TL, Murphy RM, Stephenson DG, Lamb GD** (2008) Chloride conductance in the transverse tubular system of rat skeletal muscle fibres : importance in excitation-contraction coupling and fatigue. *J Physiol* **586**: 875-887
- Dutzler R** (2007) A structural perspective on CLC channel and transporter function. *FEBS Lett* **581**: 2839-2844
- Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R** (2002) X-ray structure of a CLC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* **415**: 287-294
- Dutzler R, Campbell EB, MacKinnon R** (2003) Gating the selectivity filter in CLC chloride channels. *Science* **300**: 108-112
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C** (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* **19**: 1349
- Eide DJ, Bridgham JT, Zhao Z, Mattoon JR** (1993) The vacuolar H⁺-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for efficient copper detoxification, mitochondrial function, and iron metabolism. *Mol Gen Genet* **241**: 447-456
- FAO** (2008) FAO Land and Plant Nutrition Management Service (<http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>)
- Felle HH** (1994) The H⁺ / Cl⁻ symporter in root-hair cells of *Sinapis alba* (An electrophysiological study using ion-selective microelectrodes). *Plant Physiol* **106**: 1131-1136

- Feng L, Campbell EB, Hsiung Y, MacKinnon R** (2010) Structure of a eukaryotic CLC transporter defines an intermediate state in the transport cycle. *Science* **330**: 635-641
- Feng L, Campbell EB, Mackinnon R** (2012) Molecular mechanism of proton transport in CLC Cl^- / H^+ exchange transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 11699-11704
- Fink GR** (1998) Anatomy of a revolution. *Genetics* **149**: 473-477
- Flowers TJ, Hajibagheri MA** (2001) Salinity tolerance in *Hordeum vulgare* : ion concentrations in root cells of cultivars differing in salt tolerance. *Plant and Soil* **231**: 1-9
- Flowers TJ, Yeo AR** (1986) Ion relations of plants under drought and salinity. *Australian Journal of Plant Physiology* **13**: 75-91
- Forde BG** (2000) Nitrate transporters in plants : structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta* **1465**: 219-235
- Frachisse JM, Thomine S, Colcombet J, Guern J, Barbier-Brygoo H** (1999) Sulfate is both a substrate and an activator of the voltage-dependent anion channel of Arabidopsis hypocotyl cells. *Plant Physiol* **121**: 253-262
- Fricke W, Akhilarova G, Veselov D, Kudoyarova G** (2004) Rapid and tissue-specific changes in ABA and in growth rate in response to salinity in barley leaves. *J Exp Bot* **55**: 1115-1123
- Gaxiola RA, Yuan DS, Klausner RD, Fink GR** (1998) The yeast CLC chloride channel functions in cation homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 4046-4050
- Geelen D, Lurin C, Bouchez D, Frachisse JM, Lelievre F, Courtial B, Barbier-Brygoo H, Maurel C** (2000) Disruption of putative anion channel gene *AtCLC-a* in Arabidopsis suggests a role in the regulation of nitrate content. *Plant J* **21**: 259-267
- George E, and Brown Jr** (2008) Research Databases. Bibliography on Salt Tolerance. USDA-ARS. US Dep. Agric. Res. Serv. Riverside, CA. <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8908>
- Ghars MA, Parre E, Debez A, Bordenave M, Richard L, Leport L, Bouchereau A, Savoure A, Abdelly C** (2008) Comparative salt tolerance analysis between *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*, with special emphasis on K^+ / Na^+ selectivity and proline accumulation. *J Plant Physiol* **165**: 588-599
- Golldack D, Luking I, Yang O** (2011) Plant tolerance to drought and salinity : stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. *Plant Cell Rep* **30**: 1383-1391
- Gong JM, Waner DA, Horie T, Li SL, Horie R, Abid KB, Schroeder JI** (2004) Microarray-based rapid cloning of an ion accumulation deletion mutant in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 15404-15409
- Graves AR, Curran PK, Smith CL, Mindell JA** (2008) The Cl^- / H^+ antiporter CLC-7 is the primary chloride permeation pathway in lysosomes. *Nature* **453**: 788-792
- Greene JR, Brown NH, DiDomenico BJ, Kaplan J, Eide DJ** (1993) The *GEF1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an integral membrane protein ; mutations in which have effects on respiration and iron-limited growth. *Mol Gen Genet* **241**: 542-553
- Greenway H, Munns R** (1980) Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Ann Rev Plant Physiol* **31**: 149-190.
- Hajibagheri MA, Flowers TJ** (1989) X-ray microanalysis of ion distribution within root cortical cells of the halophyte *Suaeda maritima* (L.) Dum. *Planta* **177**: 131-134

- Halfter U, Ishitani M, Zhu JK** (2000) The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3735-3740
- Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580
- Harada H, Kuromori T, Hirayama T, Shinozaki K, Leigh RA** (2004) Quantitative trait loci analysis of nitrate storage in Arabidopsis leading to an investigation of the contribution of the anion channel gene, *AtCLC-c*, to variation in nitrate levels. *J Exp Bot* **55**: 2005-2014
- Hechenberger M, Schwappach B, Fischer WN, Frommer WB, Jentsch TJ, Steinmeyer K** (1996) A family of putative chloride channels from Arabidopsis and functional complementation of a yeast strain with a CLC gene disruption. *J Biol Chem* **271**: 33632-33638
- Ho CH, Tsay YF** (2010) Nitrate, ammonium, and potassium sensing and signaling. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 604-610
- Horie T, Brodsky DE, Costa A, Kaneko T, Lo Schiavo F, Katsuhara M, Schroeder JI** (2011) K⁺ transport by the OsHKT2;4 transporter from rice with atypical Na⁺ transport properties and competition in permeation of K⁺ over Mg²⁺ and Ca²⁺ ions. *Plant Physiol* **156**: 1493-1507
- Huang ME, Chuat JC, Galibert F** (1994) A voltage-gated chloride channel in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* **242**: 595-598
- Huang S, Spielmeier W, Lagudah ES, James RA, Platten JD, Dennis ES, Munns R** (2006) A sodium transporter (HKT7) is a candidate for *Nax1*, a gene for salt tolerance in durum wheat. *Plant Physiol* **142**: 1718-1727
- Huang GT, Ma SL, Bai LP, Zhang L, Ma H, Jia P, Liu J, Zhong M, Guo ZF** (2012) Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Mol. Biol. Rep.* **39**: 969-987.
- Ishitani M, Liu J, Halfter U, Kim CS, Shi W, Zhu JK** (2000) SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell* **12**: 1667-1678
- Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M, Kato T, Tabata S, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant J* **27**: 325-333
- Iyer R, Iverson TM, Accardi A, Miller C** (2002) A biological role for prokaryotic CLC chloride channels. *Nature* **419**: 715-718
- Jabnoun M, Espeout S, Mieulet D, Fizames C, Verdeil JL, Conejero G, Rodriguez-Navarro A, Sentenac H, Guiderdoni E, Abdely C, Very AA** (2009) Diversity in expression patterns and functional properties in the rice HKT transporter family. *Plant Physiol* **150**: 1955-1971
- Jakoby M, Weisshaar B, Droge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F** (2002) bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci* **7**: 106-111
- James RA, Davenport RJ, Munns R** (2006) Physiological characterization of two genes for Na⁺ exclusion in durum wheat, *Nax1* and *Nax2*. *Plant Physiol* **142**: 1537-1547
- Javot H, Maurel C** (2002) The role of aquaporins in root water uptake. *Ann Bot* **90**: 301-313
- Jentsch TJ** (2008) CLC chloride channels and transporters : from genes to protein structure, pathology and physiology. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **43**: 3-36

- Jentsch TJ, Maritzen T, Zdebik AA** (2005) Chloride channel diseases resulting from impaired transepithelial transport or vesicular function. *J Clin Invest* **115**: 2039-2046
- Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA** (2002) Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* **82**: 503-568
- Jentsch TJ, Steinmeyer K, Schwarz G** (1990) Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature* **348**: 510-514
- Jeschke WD, Klagges S, Hilpert A, Bhatti AS, Sarwar G** (1995) Partitioning and flows of ions and nutrients in salt-treated plants of *Leptochloa fusca* L. Kunth. I. Cations and Chloride. *New Phytologist* **130**: 23-35
- Jiang X, EO Leidi, Pardo JM** (2010) How do vacuolar NHX exchangers function in plant salt tolerance? *Plant Signal Behav* **5**: 792-795
- Jossier M, Kroniewicz L, Dalmas F, Le Thiec D, Ephritikhine G, Thomine S, Barbier-Brygoo H, Vavasseur A, Filleur S, Leonhardt N** (2010) The Arabidopsis vacuolar anion transporter, AtCLCc, is involved in the regulation of stomatal movements and contributes to salt tolerance. *Plant J* **64**: 563-576
- Jouanneau J, Peaud-Lenoel C** (1967) Croissance et synthèse des protéines de suspensions cellulaires de tabac sensible à la kinétine. *Physiologia Plantarum* **20**: 834-850.
- Kader MA, Lindberg S** (2010) Cytosolic calcium and pH signaling in plants under salinity stress. *Plant Signal Behav* **5**: 233-238
- Kaplan B, Sherman T, Fromm H** (2007) Cyclic nucleotide-gated channels in plants. *FEBS Lett* **581**: 2237-2246
- Karimi M, Inze D, Depicker A** (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* **7**: 193-195
- Kataoka T, Watanabe-Takahashi A, Hayashi N, Ohnishi M, Mimura T, Buchner P, Hawkesford MJ, Yamaya T, Takahashi H** (2004) Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 2693-2704
- Katsuhara M, Koshio K, Shibasaka M, Hayashi Y, Hayakawa T, Kasamo K** (2003) Over-expression of a barley aquaporin increased the shoot/root ratio and raised salt sensitivity in transgenic rice plants. *Plant Cell Physiol* **44**: 1378-1383
- Kawakami K, Umena Y, Kamiya N, Shen JR** (2009) Location of chloride and its possible functions in oxygen-evolving photosystem II revealed by X-ray crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 8567-8572
- Kelley LA, Sternberg MJ** (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* **4**: 363-371
- Kirch HH, Schlingensiepen S, Kotchoni S, Sunkar R, Bartels D** (2005) Detailed expression analysis of selected genes of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **57**: 315-332
- Kohler B, Raschke K** (2000) The delivery of salts to the xylem. Three types of anion conductance in the plasmalemma of the xylem parenchyma of roots of barley. *Plant Physiol* **122**: 243-254
- Kohler B, Wegner LH, Osipov V, Raschke K** (2002) Loading of nitrate into the xylem: apoplastic nitrate controls the voltage dependence of X-QUAC, the main anion conductance in xylem-parenchyma cells of barley roots. *Plant J* **30**: 133-142

- Komari T, Hiei Y, Saito Y, Murai N, Kumashiro T** (1996) Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J* **10**: 165-174
- Kotchoni SO, Gachomo EW** (2006) The reactive oxygen species network pathways : an essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants. *J Biosci* **31**: 389-404
- Kreps JA, Wu Y, Chang HS, Zhu T, Wang X, Harper JF** (2002) Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol* **130**: 2129-2141
- Kronzucker HJ, Britto DT** (2011) Sodium transport in plants: a critical review. *New Phytol* **189**: 54-81
- Lauchli A, James RA, Huang CX, McCully M, Munns R** (2008) Cell-specific localization of Na⁺ in roots of durum wheat and possible control points for salt exclusion. *Plant Cell Environ* **31**: 1565-1574
- Le Martret B, Poage M, Shiel K, Nugent GD, Dix PJ** (2011) Tobacco chloroplast transformants expressing genes encoding dehydroascorbate reductase, glutathione reductase, and glutathione-S-transferase, exhibit altered anti-oxidant metabolism and improved abiotic stress tolerance. *Plant Biotechnol J* **9**: 661-673
- Leisle L, Ludwig CF, Wagner FA, Jentsch TJ, Stauber T** (2011) CLC-7 is a slowly voltage-gated 2 Cl⁻ / 1 H⁺-exchanger and requires Ostm1 for transport activity. *EMBO J* **30**: 2140-2152
- Leonhardt N, Kwak JM, Robert N, Waner D, Leonhardt G, Schroeder JI** (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 WY, Wong FL, Tsai SN, Phang TH, Shao G, Lam HM** (2006) Tonoplast-located GmCLC1 and GmNHX1 from soybean enhance NaCl tolerance in transgenic bright yellow (BY)-2 cells. *Plant Cell Environ* **29**: 1122-1137
- Lian HL, Yu X, Ye Q, Ding X, Kitagawa Y, Kwak SS, Su WA, Tang ZC** (2004) The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice. *Plant Cell Physiol* **45**: 481-489
- Lim HH, Miller C** (2009) Intracellular proton-transfer mutants in a CLC Cl⁻ / H⁺ exchanger. *J Gen Physiol* **133**: 131-138
- Lisal J, Maduke M** (2008) Review. Proton-coupled gating in chloride channels. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**: 181-187
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**: 1391-1406
- Lopez-Rodriguez A, Trejo AC, Coyne L, Halliwell RF, Miledi R, Martinez-Torres A** (2007) The product of the gene *GEF1* of *Saccharomyces cerevisiae* transports Cl⁻ across the plasma membrane. *FEMS Yeast Res* **7**: 1218-1229
- Lorenzen I, Aberle T, Plieth C** (2004) Salt stress-induced chloride flux : a study using transgenic Arabidopsis expressing a fluorescent anion probe. *Plant J* **38**: 539-544
- Lovelli S, Scopa A, Perniola M, Di Tommaso T, Sofo A** (2011) Abscisic acid root and leaf concentration in relation to biomass partitioning in salinized tomato plants. *J Plant Physiol* **169**: 226-233

- Ludewig U, Pusch M, Jentsch TJ** (1996) Two physically distinct pores in the dimeric CLC-0 chloride channel. *Nature* **383**: 340-343
- Lurin C, Guclu J, Cheniclet C, Carde JP, Barbier-Brygoo H, Maurel C** (2000) CLC-Nt1, a putative chloride channel protein of tobacco, co-localizes with mitochondrial membrane markers. *Biochem J* **348 Pt 2**: 291-295
- Lv QD, Tang RJ, Liu H, Gao XS, Li YZ, Zheng HQ, Zhang HX** (2009) Cloning and molecular analyses of the *Arabidopsis thaliana* chloride channel gene family. *Plant Science* **176**: 650-661
- Maggio A, Raimondi G, Martino A, De Pascale S** (2007) Salt stress response in tomato beyond the salinity tolerance threshold. *Environmental and Experimental Botany* **59**: 276-282
- Markovic S, Dutzler R** (2007) The structure of the cytoplasmic domain of the chloride channel CLC-Ka reveals a conserved interaction interface. *Structure* **15**: 715-725
- Marmagne A, Vinauger-Douard M, Monachello D, de Longevialle AF, Charon C, Allot M, Rappaport F, Wollman FA, Barbier-Brygoo H, Ephritikhine G** (2007) Two members of the Arabidopsis CLC (chloride channel) family, AtCLCe and AtCLCf, are associated with thylakoid and Golgi membranes, respectively. *J Exp Bot* **58**: 3385-3393
- Marschner H** (1995) Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London, 889 pp.
- Martre P, Morillon R, Barrieu F, North GB, Nobel PS, Chrispeels MJ** (2002) Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiol* **130**: 2101-2110
- Maser P, Eckelman B, Vaidyanathan R, Horie T, Fairbairn DJ, Kubo M, Yamagami M, Yamaguchi K, Nishimura M, Uozumi N, Robertson W, Sussman MR, Schroeder JI** (2002) Altered shoot/root Na⁺ distribution and bifurcating salt sensitivity in Arabidopsis by genetic disruption of the Na⁺ transporter AtHKT1. *FEBS Lett* **531**: 157-161
- Matsui A, Ishida J, Morosawa T, Mochizuki Y, Kaminuma E, Endo TA, Okamoto M, Nambara E, Nakajima M, Kawashima M, Satou M, Kim JM, Kobayashi N, Toyoda T, Shinozaki K, Seki M** (2008) Arabidopsis transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array. *Plant Cell Physiol* **49**: 1135-1149
- Meyer S, Dutzler R** (2006) Crystal structure of the cytoplasmic domain of the chloride channel CLC-0. *Structure* **14**: 299-307
- Meyer S, Savaresi S, Forster IC, Dutzler R** (2007) Nucleotide recognition by the cytoplasmic domain of the human chloride transporter CLC-5. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 60-67
- Mian A, Oomen RJ, Isayenkov S, Sentenac H, Maathuis FJ, Very AA** (2011) Over-expression of an Na⁺-and K⁺-permeable HKT transporter in barley improves salt tolerance. *Plant J* **68**: 468-479
- Middleton RE, Pheasant DJ, Miller C** (1994) Purification, reconstitution, and subunit composition of a voltage-gated chloride channel from *Torpedo electroplax*. *Biochemistry* **33**: 13189-13198
- Miller C** (1982) Open-state substructure of single chloride channels from *Torpedo electroplax*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **299**: 401-411
- Miller C** (2006) CLC chloride channels viewed through a transporter lens. *Nature* **440**: 484-489
- Miller C, White MM** (1984) Dimeric structure of single chloride channels from *Torpedo electroplax*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 2772-2775
- Mindell JA** (2012) Lysosomal acidification mechanisms. *Annu Rev Physiol* **74**: 69-86

- Mindell JA, Maduke M, Miller C, Grigorieff N** (2001) Projection structure of a CLC-type chloride channel at 6.5 Å resolution. *Nature* **409**: 219-223
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* **9**: 490-498
- Moller IS, Gilliham M, Jha D, Mayo GM, Roy SJ, Coates JC, Haseloff J, Tester M** (2009) Shoot Na⁺ exclusion and increased salinity tolerance engineered by cell type-specific alteration of Na⁺ transport in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**: 2163-2178
- Monachello D, Allot M, Oliva S, Krapp A, Daniel-Vedele F, Barbier-Brygoo H, Ephritikhine G** (2009) Two anion transporters AtClCa and AtClCe fulfil interconnecting but not redundant roles in nitrate assimilation pathways. *New Phytol* **183**: 88-94
- Montero E, Cabot C, Poschenrieder C, Barcelo J** (1998) Relative importance of osmotic-stress and ion-specific effects on ABA-mediated inhibition of leaf expansion growth in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Cell and Environment* **21**: 54-62
- Munns R** (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ* **25**: 239-250
- Munns R** (2005) Genes and salt tolerance : bringing them together. *New Phytol* **167**: 645-663
- Munns R, James RA, Lauchli A** (2006) Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J Exp Bot* **57**: 1025-1043
- Munns R, Tester M** (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 651-681
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, **15**: 473-497.
- Nakamura A, Fukuda A, Sakai S, Tanaka Y** (2006) Molecular cloning, functional expression and subcellular localization of two putative vacuolar voltage-gated chloride channels in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol* **47**: 32-42
- Nazar R, Iqbal N, Syeed S, Khan NA** (2011) Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mungbean cultivars. *J Plant Physiol* **168**: 807-815
- Neogoe I, Stauber T, Fidzinski P, Bergsdorf EY, Jentsch TJ** (2010) The late endosomal CLC-6 mediates proton/chloride countertransport in heterologous plasma membrane expression. *J Biol Chem* **285**: 21689-21697
- Negi J, Matsuda O, Nagasawa T, Oba Y, Takahashi H, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Hashimoto M, Iba K** (2008) CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* **452**: 483-486
- Noctor G, Foyer CH** (1998) Ascorbate and Glutathione : Keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 249-279
- Novarino G, Weinert S, Rickheit G, Jentsch TJ** (2010) Endosomal chloride-proton exchange rather than chloride conductance is crucial for renal endocytosis. *Science* **328**: 1398-1401
- Orsel M, Eulenburg K, Krapp A, Daniel-Vedele F** (2004) Disruption of the nitrate transporter genes *AtNRT2.1* and *AtNRT2.2* restricts growth at low external nitrate concentration. *Planta* **219**: 714-721
- Parida AK, Das AB** (2004) Effects of NaCl stress on nitrogen and phosphorous metabolism in a true mangrove *Bruguiera parviflora* grown under hydroponic culture. *J Plant Physiol* **161**: 921-928

- Parry G, Ward S, Cernac A, Dharmasiri S, Estelle M** (2006) The Arabidopsis Suppressor of Auxin Resistance proteins are nucleoporins with an important role in hormone signaling and development. *Plant Cell* **18**: 1590-1603
- Pedersen TH, Nielsen OB, Lamb GD, Stephenson DG** (2004) Intracellular acidosis enhances the excitability of working muscle. *Science* **305**: 1144-1147
- Pedranzani H, Racagni G, Alemano S, Miersch O, Ramirez I, Pena-Cortes H, Taleisnik E, Machado-Domenech E, Abdala G** (2003) Salt tolerant tomato plants show increased levels of jasmonic acid. *Plant Growth Regulation* **41**: 149-158
- Peng M, Bi YM, Zhu T, Rothstein SJ** (2007) Genome-wide analysis of Arabidopsis responsive transcriptome to nitrogen limitation and its regulation by the ubiquitin ligase gene NLA. *Plant Mol Biol* **65**: 775-797
- Perera IY, Hung CY, Moore CD, Stevenson-Paulik J, Boss WF** (2008) Transgenic Arabidopsis plants expressing the type 1 inositol 5-phosphatase exhibit increased drought tolerance and altered abscisic acid signaling. *Plant Cell* **20**: 2876-2893
- Perez-Alfocea F, Ghanem ME, Gomez-Cadenas A, Dodd IC** (2011) Omics of root-to-shoot signaling under salt stress and water deficit. *OMICS* **15**: 893-901
- Piccolo A, Malvezzi M, Accardi A** (2010) Proton block of the CLC-5 Cl⁻ / H⁺ exchanger. *J Gen Physiol* **135**: 653-659
- Piccolo A, Malvezzi M, Houtman JC, Accardi A** (2009) Basis of substrate binding and conservation of selectivity in the CLC family of channels and transporters. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 1294-1301
- Piccolo A, Pusch M** (2005) Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins CLC-4 and CLC-5. *Nature* **436**: 420-423
- Pineros MA, Cancado GM, Kochian LV** (2008) Novel properties of the wheat aluminum tolerance organic acid transporter (TaALMT1) revealed by electrophysiological characterization in *Xenopus* oocytes: functional and structural implications. *Plant Physiol* **147**: 2131-2146
- Platten JD, Cotsaftis O, Berthomieu P, Bohnert H, Davenport RJ, Fairbairn DJ, Horie T, Leigh RA, Lin HX, Luan S, Maser P, Pantoja O, Rodriguez-Navarro A, Schachtman DP, Schroeder JI, Sentenac H, Uozumi N, Very AA, Zhu JK, Dennis ES, Tester M** (2006) Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends Plant Sci* **11**: 372-374
- Plett D, Safwat G, Gilliham M, Skrumsager Moller I, Roy S, Shirley N, Jacobs A, Johnson A, Tester M** (2010) Improved salinity tolerance of rice through cell type-specific expression of AtHKT1;1. *PLoS One* **5**: e12571
- Poet M, Kornak U, Schweizer M, Zdebik AA, Scheel O, Hoelter S, Wurst W, Schmitt A, Fuhrmann JC, Planells-Cases R, Mole SE, Hubner CA, Jentsch TJ** (2006) Lysosomal storage disease upon disruption of the neuronal chloride transport protein CLC-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 13854-13859
- PyMOL** Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC.
- Qiu QS, Guo Y, Dietrich MA, Schumaker KS, Zhu JK** (2002) Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺ / H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 8436-8441
- Quintero FJ, Ohta M, Shi H, Zhu JK, Pardo JM** (2002) Reconstitution in yeast of the Arabidopsis SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 9061-9066

- Ravet K, Touraine B, Kim SA, Cellier F, Thomine S, Guerinot ML, Briat JF, Gaymard F** (2009) Post-translational regulation of AtFER2 ferritin in response to intracellular iron trafficking during fruit development in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **2**: 1095-1106
- Ren ZH, Gao JP, Li LG, Cai XL, Huang W, Chao DY, Zhu MZ, Wang ZY, Luan S, Lin HX** (2005) A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nat Genet* **37**: 1141-1146
- Rengasamy P** (2002) Transient salinity and subsoil constraints to dryland farming in Australian sodic soils : an overview. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **42**: 351-361
- Richard EA, Miller C** (1990) Steady-state coupling of ion-channel conformations to a transmembrane ion gradient. *Science* **247**: 1208-1210
- Rickheit G, Wartosch L, Schaffer S, Stobrawa SM, Novarino G, Weinert S, Jentsch TJ** (2010) Role of CLC-5 in renal endocytosis is unique among CLC exchangers and does not require PY-motif-dependent ubiquitylation. *J Biol Chem* **285**: 17595-17603
- Riechmann JL, Meyerowitz EM** (1998) The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biol Chem* **379**: 633-646
- Rodriguez MC, Petersen M, Mundy J** (2010) Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 621-649
- Romero JM, Maranon T, Murillo JM** (1994) Long-term responses of *Melilotus segetalis* to salinity. 2. Nutrient absorption and utilization. *Plant Cell and Environment* **17**: 1249-1255
- Roy SJ, Gilliham M, Berger B, Essah PA, Cheffings C, Miller AJ, Davenport RJ, Liu LH, Skynner MJ, Davies JM, Richardson P, Leigh RA, Tester M** (2008) Investigating glutamate receptor-like gene co-expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **31**: 861-871
- Rubio F, Gassmann W, Schroeder JI** (1995) Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science* **270**: 1660-1663
- Rus A, Lee BH, Munoz-Mayor A, Sharkhuu A, Miura K, Zhu JK, Bressan RA, Hasegawa PM** (2004) AtHKT1 facilitates Na⁺ homeostasis and K⁺ nutrition in *planta*. *Plant Physiol* **136**: 2500-2511
- Rychkov GY, Pusch M, Astill DS, Roberts ML, Jentsch TJ, Bretag AH** (1996) Concentration and pH dependence of skeletal muscle chloride channel CLC-1. *J Physiol* **497 (Pt 2)**: 423-435
- Rychkov GY, Pusch M, Roberts ML, Jentsch TJ, Bretag AH** (1998) Permeation and block of the skeletal muscle chloride channel, CLC-1, by foreign anions. *J Gen Physiol* **111**: 653-665
- Saab IN, Sharp RE, Pritchard J, Voetberg GS** (1990) Increased endogenous abscisic acid maintains primary root growth and inhibits shoot growth of maize seedlings at low water potentials. *Plant Physiol* **93**: 1329-1336
- Sabirzhanova IB, Sabirzhanov BE, Chemeris AV, Veselov DS, Kudoyarova GR** (2005) Fast changes in expression of expansin gene and leaf extensibility in osmotically stressed maize plants. *Plant Physiol Biochem* **43**: 419-422
- Sasaki T, Yamamoto Y, Ezaki B, Katsuhara M, Ahn SJ, Ryan PR, Delhaize E, Matsumoto H** (2004) A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *Plant J* **37**: 645-653

- Schachtman DP, Kumar R, Schroeder JI, Marsh EL** (1997) Molecular and functional characterization of a novel low-affinity cation transporter (LCT1) in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 11079-11084
- Schachtman DP, Schroeder JI** (1994) Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* **370**: 655-658
- Scheel O, Zdebik AA, Lourdel S, Jentsch TJ** (2005) Voltage-dependent electrogenic chloride/proton exchange by endosomal CLC proteins. *Nature* **436**: 424-427
- Schwappach B, Stobrawa S, Hechenberger M, Steinmeyer K, Jentsch TJ** (1998) Golgi localization and functionally important domains in the NH₂ and COOH terminus of the yeast CLC putative chloride channel Gef1p. *J Biol Chem* **273**: 15110-15118
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K** (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J* **31**: 279-292
- Senadheera P, Singh RK, Maathuis FJ** (2009) Differentially expressed membrane transporters in rice roots may contribute to cultivar dependent salt tolerance. *J Exp Bot* **60**: 2553-2563
- Sharp RE, LeNoble ME** (2002) ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *J Exp Bot* **53**: 33-37
- Sharp RE, Poroyko V, Hejlek LG, Spollen WG, Springer GK, Bohnert HJ, Nguyen HT** (2004) Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *J Exp Bot* **55**: 2343-2351
- Sheen J** (1996) Ca²⁺-dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science* **274**: 1900-1902
- Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu JK** (2000) The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺ / H⁺ antiporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6896-6901
- Shi H, Lee BH, Wu SJ, Zhu JK** (2003) Overexpression of a plasma membrane Na⁺ / H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in Arabidopsis thaliana. *Nat Biotechnol* **21**: 81-85
- Shi H, Quintero FJ, Pardo JM, Zhu JK** (2002) The putative plasma membrane Na⁺ / H⁺ antiporter SOS1 controls long-distance Na⁺ transport in plants. *Plant Cell* **14**: 465-477
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (1997) Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response. *Plant Physiol* **115**: 327-334
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot* **58**: 221-227
- Shiu SH, Bleeker AB** (2001) Plant receptor-like kinase gene family : diversity, function, and signaling. *Sci STKE* **2001**: re22
- Skirycz A, Claeys H, De Bodt S, Oikawa A, Shinoda S, Andriankaja M, Maleux K, Eloy NB, Coppens F, Yoo SD, Saito K, Inze D** (2011) Pause-and-stop : the effects of osmotic stress on cell proliferation during early leaf development in Arabidopsis and a role for ethylene signaling in cell cycle arrest. *Plant Cell* **23**: 1876-1888
- Spollen WG, LeNoble ME, Samuels TD, Bernstein N, Sharp RE** (2000) Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. *Plant Physiol* **122**: 967-976
- Storey R, Schachtman DP, Thomas MR** (2003) Root structure and cellular chloride, sodium and potassium distribution in salinized grapevines. *Plant Cell Environ* **26**: 789-800

- Sunarpi, Horie T, Motoda J, Kubo M, Yang H, Yoda K, Horie R, Chan WY, Leung HY, Hattori K, Konomi M, Osumi M, Yamagami M, Schroeder JI, Uozumi N** (2005) Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Plant J* **44**: 928-938
- Sunkar R, Li YF, Jagadeeswaran G** (2012) Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends Plant Sci* **17**: 196-203
- Tampieri E, Baraldi E, Carnevali F, Frascaroli E, De Santis A** (2011) The activity of plant inner membrane anion channel (PIMAC) can be performed by a chloride channel (CLC) protein in mitochondria from seedlings of maize populations divergently selected for cold tolerance. *J Bioenerg Biomembr* **43**: 611-621
- Tang CY, Chen TY** (2011) Physiology and pathophysiology of CLC-1: mechanisms of a chloride channel disease, myotonia. *J Biomed Biotechnol* **2011**: 685328
- Tangirala PK** (2011) http://www.ifm.liu.se/edu/biology/master_projects/2011-1/student-thesis-presentati/tangirala-pavan-kumar/
- Tapken D, Hollmann M** (2008) *Arabidopsis thaliana* glutamate receptor ion channel function demonstrated by ion pore transplantation. *J Mol Biol* **383**: 36-48
- Teakle N, Flowers T, Real D, Colmer T** (2007) *Lotus tenuis* tolerates the interactive effects of salinity and waterlogging by 'excluding' Na⁺ and Cl⁻ from the xylem. *J Exp Bot* **58**: 2169-2180
- Teakle NL, Tyerman SD** (2010) Mechanisms of Cl⁻ transport contributing to salt tolerance. *Plant Cell Environ* **33**: 566-589
- Termaat A, Munns R** (1986) Use of concentrated macronutrient solutions to separate osmotic from NaCl-specific effects on plant-growth. *Australian Journal of Plant Physiology* **13**: 509-522
- Tester M, Davenport R** (2003) Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann Bot* **91**: 503-527
- Thiemann A, Grunder S, Pusch M, Jentsch TJ** (1992) A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature* **356**: 57-60
- Thomine S, Lelievre F, Debarbieux E, Schroeder JI, Barbier-Brygoo H** (2003) AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant J* **34**: 685-695
- Thomine S, Wang R, Ward JM, Crawford NM, Schroeder JI** (2000) Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4991-4996
- Townley R, Shapiro L** (2007) Crystal structures of the adenylate sensor from fission yeast AMP-activated protein kinase. *Science* **315**: 1726-1729
- Tuteja N** (2009) Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signal Behav* **4**: 942-947
- Uozumi N, Kim EJ, Rubio F, Yamaguchi T, Muto S, Tsuboi A, Bakker EP, Nakamura T, Schroeder JI** (2000) The *Arabidopsis HKT1* gene homolog mediates inward Na⁺ currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol* **122**: 1249-1259
- Urao T, Yakubov B, Satoh R, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M, Hirayama T, Shinozaki K** (1999) A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell* **11**: 1743-1754

- Vahisalu T, Kollist H, Wang YF, Nishimura N, Chan WY, Valerio G, Lamminmaki A, Brosche M, Moldau H, Desikan R, Schroeder JI, Kangasjarvi J** (2008) SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* **452**: 487-491
- Vandoorne B, Mathieu AS, Van den Ende W, Vergauwen R, Perilleux C, Javaux M, Lutts S** (2012) Water stress drastically reduces root growth and inulin yield in *Cichorium intybus* (var. *sativum*) independently of photosynthesis. *J Exp Bot* **63**: 4359-4373
- Vinocur B, Altman A** (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress : achievements and limitations. *Curr Opin Biotechnol* **16**: 123-132
- von der Fecht-Bartenbach J, Bogner M, Dynowski M, Ludewig U** (2010) CLC-b-mediated $\text{NO}_3^- / \text{H}^+$ exchange across the tonoplast of Arabidopsis vacuoles. *Plant Cell Physiol* **51**: 960-968
- von der Fecht-Bartenbach J, Bogner M, Krebs M, Stierhof YD, Schumacher K, Ludewig U** (2007) Function of the anion transporter AtCLC-d in the trans-Golgi network. *Plant J* **50**: 466-474
- Walden M, Accardi A, Wu F, Xu C, Williams C, Miller C** (2007) Uncoupling and turnover in a Cl^- / H^+ exchange transporter. *J Gen Physiol* **129**: 317-329
- Wan XR, Li L** (2006) Regulation of ABA level and water-stress tolerance of Arabidopsis by ectopic expression of a peanut 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene. *Biochem Biophys Res Commun* **347**: 1030-1038
- Wege S, Jossier M, Filleur S, Thomine S, Barbier-Brygoo H, Gambale F, De Angeli A** (2010) The proline 160 in the selectivity filter of the Arabidopsis $\text{NO}_3^- / \text{H}^+$ exchanger AtCLCa is essential for nitrate accumulation *in planta*. *Plant J* **63**: 861-869
- Weinberger S, Wojciechowski D, Sternberg D, Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K, Becher T, Begemann B, Fahlke C, Fischer M** (2012) Disease-causing mutations C277R and C277Y modify gating of human CLC-1 chloride channels in myotonia congenita. *J Physiol* **590**: 3449-3464
- Weinert S, Jabs S, Supanchart C, Schweizer M, Gimber N, Richter M, Rademann J, Stauber T, Kornak U, Jentsch TJ** (2010) Lysosomal pathology and osteopetrosis upon loss of H^+ -driven lysosomal Cl^- accumulation. *Science* **328**: 1401-1403
- White MM, Miller C** (1979) A voltage-gated anion channel from the electric organ of *Torpedo californica*. *J Biol Chem* **254**: 10161-10166
- White PJ, Broadley MR** (2001) Chloride in soils and its uptake and movement within the plant : A review. *Annals of Botany* **88**: 967-988
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ** (2007) An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* **2**: e718
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK** (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* **14 Suppl**: S165-183
- Xu G, Magen H, Tarchitzky J, Kafkafi U** (2000) Advances in chloride nutrition of plants. *Advances in Agronomy* **68**: 97-150
- Yokoi S, Bressan RA, Hasegawa PM** (2002) Salt stress tolerance of plants. JIRCAS Working Report, vol. 2002, no. 23; PAGE.25-33

- Zdebik AA, Zifarelli G, Bergsdorf EY, Soliani P, Scheel O, Jentsch TJ, Pusch M** (2008) Determinants of anion-proton coupling in mammalian endosomal CLC proteins. *J Biol Chem* **283**: 4219-4227
- Zeller G, Henz SR, Widmer CK, Sachsenberg T, Ratsch G, Weigel D, Laubinger S** (2009) Stress-induced changes in the *Arabidopsis thaliana* transcriptome analyzed using whole-genome tiling arrays. *Plant J* **58**: 1068-1082
- Zhang H, Han B, Wang T, Chen S, Li H, Zhang Y, Dai S** (2011) Mechanisms of plant salt response : insights from proteomics. *J Proteome Res* **11**: 49-67
- Zhang HX, Blumwald E** (2001) Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat Biotechnol* **19**: 765-768
- Zhang HX, Hodson JN, Williams JP, Blumwald E** (2001) Engineering salt-tolerant Brassica plants : characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12832-12836
- Zhu JK** (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 247-273
- Zhu JK** (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 441-445
- Zhu JK** (2007) *Plant Salt Stress*. eLS.
- Zifarelli G, Pusch M** (2009) Conversion of the 2 Cl⁻ / 1 H⁺ antiporter CLC-5 in a NO₃⁻ / H⁺ antiporter by a single point mutation. *EMBO J* **28**: 175-182
- Zifarelli G, Pusch M** (2010) CLC transport proteins in plants. *FEBS Lett* **584**: 2122-2127

ANNEXE

REVIEW PAPER

From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants

Julie Dechorgnat¹, Chi Tam Nguyen², Patrick Armengaud¹, Mathieu Jossier², Eugene Diatloff¹, Sophie Filleur^{2,3} and Françoise Daniel-Vedele^{1,*}

¹ Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR 1318 INRA-AgroParisTech, Institut National de la Recherche Agronomique, Route de St. Cyr, F-78026 Versailles, France

² Institut des Sciences du Végétal, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS-UPR 2355), Bât 22, avenue de la Terrasse, F-91198 Gif-sur-Yvette cedex, France

³ Université Paris 7 Denis Diderot, UFR Sciences du Vivant, 35 rue Hélène Brion, F-75025 Paris cedex 13, France

* To whom correspondence should be addressed: E-mail: francoise.vedele@versailles.inra.fr

Received 1 September 2010; Revised 17 November 2010; Accepted 19 November 2010

Abstract

Under temperate climates and in cultivated soils, nitrate is the most important source of nitrogen (N) available for crops and, before its reduction and assimilation into amino acids, must enter the root cells and then move in the whole plant. The aim of this review is to provide an overall picture of the numerous membrane proteins that achieve these processes by being localized in different compartments and in different tissues. Nitrate transporters (NRT) from the NRT1 and NRT2 families ensure the capacity of root cells to take up nitrate, through high- and low-affinity systems (HATS and LATS) depending on nitrate concentrations in the soil solution. Other members of the NRT1 family are involved subsequently in loading and unloading of nitrate to and from the xylem vessels, allowing its distribution to aerial organs or its remobilization from old leaves. Once in the cell, nitrate can be stored in the vacuole by passing through the tonoplast, a step that involves chloride channels (CLC) or a NRT2 member. Finally, with the exception of one NRT1 member, the transport of nitrite towards the chloroplast is still largely unknown. All these fluxes are controlled by key factors, the 'major tour operators' like the internal nutritional status of the plant but also by external abiotic factors.

Key words: CLC family, NRT family, nitrate, transport.

Introduction

Nitrogen is one of the most essential nutrients for plants and is involved in the building of the fundamental bricks of life: nucleotides, amino acids, and proteins. Only some plant species are able to use atmospheric nitrogen due to their capacity of a symbiotic relationship with specific micro-organisms (Gordon *et al.*, 2001). The other species find their resources in the soil where nitrogen is present in different forms. For example, the soil solution may contain different organic N forms such as soluble proteins or amino acids derived from proteolytic processes. In particular ecosystems, some plant species are able to use these organic N forms, as described in a recent review (Näsholm *et al.*, 2009). In temperate climatic conditions, inorganic N forms are predominant and fertilizers are often supplied as nitrate, ammonium or urea (<http://www.fertilizer.org/ifa/>). In this

review, the focus will be on nitrate as a main nitrogen source for *Arabidopsis* plants, and why and how it is present in soils, how it is taken up by plant roots, distributed in the whole plant or inside one cell, and, finally, what the 'tour operators' are that organize and regulate this complex journey.

Origin of nitrate

It is axiomatic that all the nitrate on earth today originates from atmospheric nitrogen gas (N₂). However, this conversion to nitrate has involved both abiotic and biotic processes. In Fig. 1 a time-course of nitrate production on earth, from early pre-biotic times to the present day, is

proposed. Originally, in an anoxic early-earth atmosphere, small amounts of NO (nitric oxide) would have been produced by lightning acting in the atmosphere (N_2 and CO_2) and this NO settled into the oceans where nitrate and nitrite would have formed (Canfield *et al.*, 2006). The early organisms (facultative heterotrophs such as *Archaea* and *Bacteria*) evolved a process of using this nitrate as an electron acceptor for respiration in the absence of oxygen (Pina-Ochoa *et al.*, 2010). Some of these bacteria can accumulate up to 800 mM nitrate in their vacuole (Schullz-Vogt, 2006). Recent genome sequencing of some of these bacteria (Musmann *et al.*, 2007) indicates that the transport of nitrate into the vacuole most probably involved an early version of chloride channels/transporters, of which one has recently been discovered to load nitrate into *Arabidopsis* vacuoles (see ‘Travelling within the cell’). A reduction of abiotic N fixation soon after the origin of life resulted in a possible N crisis, which triggered the development of biological nitrogen fixation (Navarro-Gonzalez *et al.*, 2001). Once aerobic organisms (cyanobacteria) evolved on earth, the atmosphere was oxygenated and production of nitrate steadily increased, and as Falkowski points out, this production of nitrate must have evolved after the advent of oxygenic photosynthesis, as there can be no nitrate without oxygen (Falkowski, 1997). Roughly 42 million years ago, the *Arabidopsis* genus split from the *Brassica* complex (Beilstein *et al.*, 2010), so clearly, the evolutionary ancestors of *Arabidopsis* were exposed to nitrate and therefore evolved mechanisms to absorb and transport nitrate. More recently, the introduction of the Haber–Bosch process dramatically increased the amount of ammonium-nitrogen produced and, when added as fertilizer to soil, has resulted in a large increase in nitrogen and nitrate in soils.

Nitrate in soils

The vast majority of the total nitrogen in soil (>98%) is in organic matter, which is mostly unavailable directly to

plants. Only a very small fraction of this total N is in inorganic forms. This conversion to inorganic forms (ammonium, nitrite, and then nitrate) occurs via biological processes involving soil microorganisms. Generally in aerated soils, nitrate predominates and if it is not absorbed by plant roots or utilized by microorganisms, it is available for leaching. Nitrate leaching occurs because nitrate has a very weak affinity to form surface complexes with soil minerals and most soils more strongly adsorb cations compared with anions (Strahm and Harrison, 2006). Because of this, the diffusion coefficient for nitrate is very high, i.e. nitrate diffuses quickly to areas of depletion such as to the rhizosphere. The concentration of nitrate in soil solutions is very variable, both spatially and temporally (Miller *et al.*, 2007), depending very much on soil type, fertilizer addition, microbial activity etc. Nitrate concentrations in soil solutions have been reported by a number of surveys and reviews (Reisenauer, 1966; Wolt, 1994). Concentrations generally range from very low levels of a few hundred micromolar to around 20 mM, the highest up to 70 mM. Consequently, plant roots are exposed to this wide range of concentrations, and it is then understandable that plants have developed a system of regulation of nitrate transporters to cope with this variability (see the next section, ‘Travelling from the soil to plant roots’). It is important to note that the plant’s demand for N is the actual pacemaker for nitrate uptake by the roots from the soil solution.

Travelling from the soil to plant roots

The selective uptake of water and solutes to support plant growth and development is achieved by the root system. Its species-specific size and its architecture may vary depending on a wide variety of developmental and environmental factors (reviewed in Zhang *et al.*, 2007). The main root, the

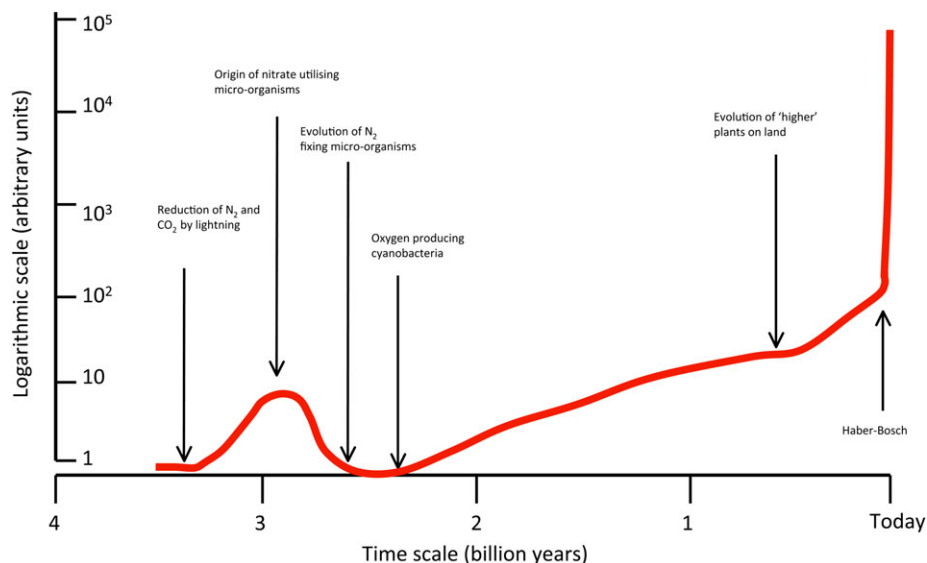


Fig. 1. A proposed time-course of the relative amount of nitrate produced on earth (based on Canfield *et al.*, 2006, 2010; Pina-Ochoa *et al.*, 2010; Navarro-Gonzalez *et al.*, 2001; Falkowski, 1997; DE Canfield, personal communication).

lateral roots, and the root hairs are the major components of a root system that are organized in a simple or complex manner, such as in *Arabidopsis* or in cereal crops (Osmond *et al.*, 2007). The nitrate fluxes through the root part can be considered in two dimensions: the radial and basipetal fluxes.

Transport across the root to the vascular tissue can occur through the inter-cellular space (apoplastic transport) or through the different cell layers (symplastic transport), namely the epidermis, cortex, and endodermis in *Arabidopsis*. Characterized by cell wall deposition that surrounds the cell like a belt, the endodermis layer separates the outer (peripheral) from the inner (central) root cell layers (Enstone and Peterson, 2002). Recently, Baxter and co-workers showed that suberin on the endodermis acts as a barrier to the apoplastic transport of both water and mineral ions (Baxter *et al.*, 2009). Thus, whatever the nitrate routes from the soil to the stele, nitrate must enter either the epidermal, the cortex or the endodermal cell before being loaded into the xylem vessels.

Early studies indicated that ions enter the plant at the root tip and are translocated basipetally to the shoot (Cannings and Kramer, 1957). However, since this publication, many studies have shown that the root axis is characterized by regions that are heterogeneous in their uptake and transport capacities (Siebrecht *et al.*, 1995).

Depending on the external nitrate concentrations, two different uptake systems occur within the plant: the so-called high- (HATS) and low-affinity (LATS) systems operate when nitrate is present in the soil at low (<1 mM) or high concentration (>1 mM), respectively. Physiological studies demonstrated that each system is composed of constitutive and nitrate inducible components (Glass and Siddiqi, 1995).

In the apical part of the *Arabidopsis* root, one master gene is expressed, *NRT1.1*, coding for a protein that, at the same time, plays the roles of nitrate transporter (Tsay *et al.*, 1993) and nitrate sensor to activate the expression of nitrate-related genes (Ho *et al.*, 2009). *NRT1.1* is also involved in different signalling processes leading to changes in root development and seed germination (Ho and Tsay, 2010). Very recently, Krouk *et al.* showed that *NRT1.1* is able to facilitate auxin transport in a nitrate repressible way (Krouk *et al.*, 2010). *NRT1.1* was thus proposed to repress lateral root growth at low nitrate availability by promoting basipetal auxin transport out of these roots. Discovered in the 1990s, the *NRT1.1* gene, also named *CHLI*, belongs to the *NRT1* family comprising 53 members in *Arabidopsis* (reviewed in Tsay *et al.*, 2007). It was first described as a low-affinity nitrate transporter characterized by a K_m of 5 mM, involved in the LATS. The expression of the *NRT1.1* gene is inducible by nitrate, suggesting a role of the protein in the inducible component of the LATS. Near the root tip, it is found primarily in the epidermis where nitrate can enter directly by the symplastic route and, further from the root tip, its expression takes place in the cortex and endodermis (Huang *et al.*, 1996). The same protein was also shown to be involved in HATS (Liu *et al.*, 1999). Liu *et al.* demonstrated

that the phosphorylation–dephosphorylation of threonine T101 was responsible for the shift from a low to a high affinity uptake characteristic (Liu and Tsay, 2003). The CBL-interacting protein kinase CIPK23 (SnRK3.23) is able to phosphorylate T101 under low nitrate conditions, allowing *NRT1.1* to function as a high-affinity nitrate transporter (Ho *et al.*, 2009).

In the root tip and in the mature regions of roots, a second gene of the same family, *AtNRT1.2*, is expressed in root hairs and root epidermis (Huang *et al.*, 1999). In contrast to the nitrate inducible expression of the *NRT1.1* gene, *NRT1.2* mRNA accumulates without prior nitrate exposure and was shown to participate to the constitutive component of the LATS.

Absent from the *Arabidopsis* root tip but expressed in the mature part of the root, the *AtNRT2.1* gene belongs to another gene family, comprising seven members in *Arabidopsis* (Orsel *et al.*, 2002). GUS expression, directed by the *AtNRT2.1* promoter, is found in the epidermal, cortical, and endodermal cell layers of mature root parts (Nazoa *et al.*, 2003). The *NRT2.1* protein is localized on the plasma membrane (Chopin *et al.*, 2007a) and is the major actor of the HATS system, particularly when the external nitrate concentration is low (Filleur *et al.*, 2001; Orsel *et al.*, 2004). However, the *NRT2.1* protein is not acting alone in the nitrate transport process but requires a second protein, named *NAR2* (*AtNRT3.1*), as shown in barley (Tong *et al.*, 2005) or in *Arabidopsis* (Okamoto *et al.*, 2006; Orsel *et al.*, 2006). In addition to possibly being involved in *NRT2.1* stability (Wirth *et al.*, 2007), *NAR2* was recently found to be physically associated to *NRT2.1* at the plasma membrane and to form the active nitrate transporter as a tetramer consisting of two subunits each of *AtNRT2.1* and *AtNAR2.1* (Yong *et al.*, 2010). A second *AtNRT2.2* gene is located near the *AtNRT2.1* on chromosome I. Li and co-workers dissected the HATS activity in *AtNRT2.1* and *AtNRT2.2* single and double mutants and showed that *AtNRT2.1* is responsible for 72% of HATS activity. This result suggests that *AtNRT2.2* makes only a small contribution to the system, except when *AtNRT2.1* is lost, its contribution increases and results in a partial compensation (Li *et al.*, 2007).

Net root nitrate uptake results from the balance between nitrate influx, described above, and passive nitrate efflux whose physiological role still remains obscure. In response to biotic (Garcia-Brugger *et al.*, 2006) or abiotic stresses (Macduff and Jackson, 1992; Aslam *et al.*, 1995), this efflux increases and can even overcome the influx leading to net nitrate excretion. Using a functional biochemical approach, the *NAXT1* protein from a sub-family of seven members from the large *NRT1* family was identified and shown to be responsible for the prolonged root nitrate excretion occurring after acidification of the culture medium (Segonzac *et al.*, 2007). The protein is localized on the plasma membrane of the cortical cells of mature roots but other members of this *NAXT* sub-family are expressed in different cellular types such as the root epidermis or root stele, possibly being involved in nitrate xylem loading.

Subsequently to this loading, nitrate is then translocated to the upper part of the plant where other NRT proteins allow its distribution in the whole plant.

Travelling within the plant

Nitrate concentrations vary to a large extent according to organs and nitrate supply. Figure 2 summarizes the nitrate contents of plants in the vegetative phase (Fig. 2A) grown under two nitrogen regimes, and plants in the reproductive stage (Fig. 2B) grown with full nutrient supply (J Dechorgnat, M Jossier, unpublished results). Nitrate is found in all organs and must therefore reach each of them by different routes.

The first step to transport nitrate towards the plant aerial part is the loading into the xylem vessels of the vascular stele and it has been shown that this step is a separate control point for transport of nutrient into the shoot (Herdel *et al.*, 2001). The release of ions, such as potassium, across the plasma membrane of xylem-parenchyma cells into the xylem occurs through ion channels whose activity is regulated by membrane voltage (Gaymard *et al.*, 1998). Köhler and co-workers used the patch-clamp technique on protoplasts isolated from xylem-parenchyma barley cells and showed that apoplastic nitrate itself controls the

voltage-dependence of X-QUAC, the Quickly Activating Anion Conductance, exerting a positive feed-back on its loading into the xylem (Köhler *et al.*, 2002). The potential of the plasma membrane is negative (around -100 mV), thus nitrate might only be passively transported from the parenchyma cells into the xylem. However, a nitrate transporter belonging to the NRT1 family, AtNRT1.5, was found to be expressed in the pericycle cells surrounding the protoxylem (Lin *et al.*, 2008). Expression in *Xenopus* oocytes revealed that it is able to transport nitrate in the low affinity range but in both directions. In addition, nitrate uptake is not affected in *atnrt1.5* knock-out mutants but translocation of nitrate, followed by the ^{15}N tracer, is slower in the mutant compared with the wild type. Taken together, these results suggest that AtNRT1.5 plays a major role in the loading of root nitrate into the xylem from the pericycle cells but other mechanisms must co-exist within the root.

Moving up to the aerial part of the plant, the petiole is an important organ, ensuring nitrate distribution towards the leaves. It is generally characterized by a high nitrate content (Raab and Terry, 1995). One member of the NRT1 family, AtNRT1.4, encodes a low-affinity nitrate transporter that is constitutively and specifically expressed in petioles and mid-ribs of *Arabidopsis* leaves. In addition, *atnrt1.4* knock-out mutants showed a reduced nitrate content in the petiole and the mid-rib (45–50% of wild-type levels), while that of the lamina was slightly increased (Chiu *et al.*, 2004). These results suggest that this NRT1 protein plays a role in the nitrate distribution to the lamina of the leaves where nitrate reduction takes place. However, the AtNRT1.4 mRNA, detected by whole-mount *in situ* hybridization, does not seem to be located in the vascular tissues. The mild phenotype of the mutants indicates that AtNRT1.4 is not the only actor of nitrate distribution to the lamina. Another gene of the same family, the AtNRT1.8, is in fact expressed predominantly in parenchyma cells within the vasculature in both roots and shoots of seedlings, suggesting a role in xylem loading and/or unloading (Li *et al.*, 2010). Further experiments showed that xylem sap collected from mutants accumulate more nitrate than the wild-type, allowing the authors to demonstrate that the protein, localized in the plasma membrane, is a low-affinity nitrate transporter, the function of which is to transport nitrate across parenchyma cells to unload nitrate from the xylem sap. Thus, two proteins, AtNRT1.5 and AtNRT1.8, closely related phylogenetically, are, respectively, involved in nitrate loading into the root stele and nitrate unloading from the root stele or from the shoot vasculature, ensuring the fine-tuning of long-distance transport from the roots to the shoots.

Once inside the cell, nitrate can follow different routes. It can be stored as ‘temporary parking’, in the vacuole, where it can serve as an osmoticum or as a stock to be mobilized when the plant is growing under unfavourable conditions (see ‘Travelling within the cell’). Similarly to amino acids remobilized from proteins during seed filling (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010), nitrate can be exported from the vacuole and transported towards growing organs, such as

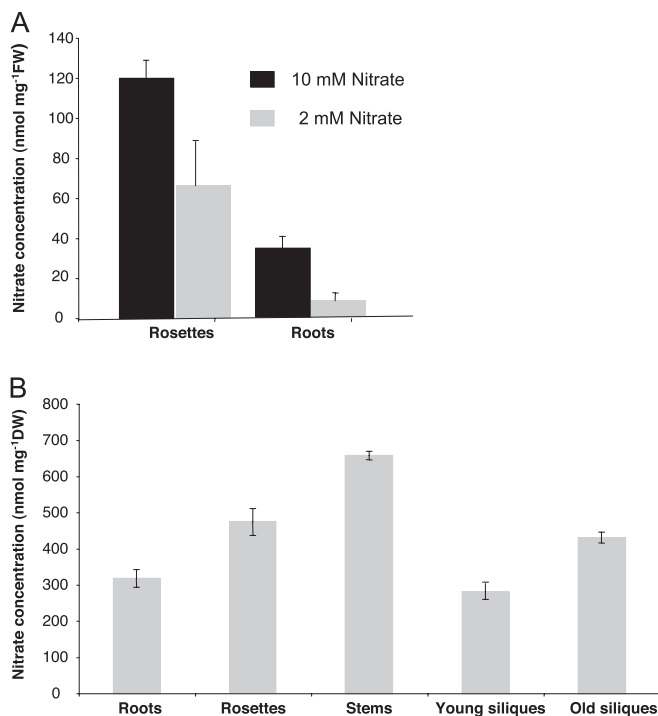


Fig. 2. Concentration of nitrate in different organs. (A) Vegetative stage: *Arabidopsis* plants were grown for 35 d under short days on sand under high (10 mM, black) or limiting (2 mM, grey) nitrate supply. (B) Reproductive stage: *Arabidopsis* plants were grown for 46 d under long days on sand under full nitrogen supply (5 mM nitrate). Young and old siliques were harvested 0–10 d and 10–20 d after fertilization, respectively. The values are means \pm SE of six independent plants.

young leaves, when the external resource availability is decreasing, or when the mature leaf is ageing and becomes a source leaf. Thus, membrane(s) protein(s) must transport nitrate through the plasma membrane towards the vascular tissues of source organs. Looking at this specific expression, Fan *et al.* showed recently that the *AtNRT1.7* was a good candidate to achieve this function (Fan *et al.*, 2009). The protein is localized in the plasma membrane of companion cells and sieve element complex of mature leaves and characterization of null mutants revealed that they accumulate higher amounts of nitrate in older leaves and are defective in remobilizing nitrate from older leaves to young leaves. The *AtNRT1.7* gene expression is also induced by nitrogen starvation and, as a consequence, null mutants showed growth retardation under these stress conditions (Fan *et al.*, 2009). Two genes of the NRT2 family, *AtNRT2.4* and *AtNRT2.5*, are also regulated by nitrogen availability, being induced by nitrogen starvation and repressed by nitrogen re-supply (Orsel *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2003). They could represent complementary actors for nitrate remobilization and the double or triple mutants' sensitivity to nitrogen starvation would be interesting to study.

In some species, nitrate uptake seems to be completely repressed by flowering and no longer operates during seed filling (Malagoli *et al.*, 2004) whereas in *Arabidopsis* this process is lower than during the vegetative stage but still occurs (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). In addition, as shown in Fig. 2, not only the vegetative organs contain nitrate but also reproductive organs such as stems, siliques, and even seeds (Chopin *et al.*, 2007b). Although nitrate is not the major nitrogen form in seeds, it plays an important role in the regulation and breaking of seed dormancy (Alboresi *et al.*, 2005). How does nitrate reach this particular organ? One good candidate is the *AtNRT1.6*, a low-affinity nitrate transporter localized on the plasma membrane (Almagro *et al.*, 2008). The gene is expressed in the vascular tissue of the silique and in the funiculus, which ensures the link between the developing seed and the sustaining silique. In agreement with the expected decrease in nitrate supply to developing embryos, *atnrt1.6* seed nitrate content was found to be reduced. Interestingly, the mutant also showed an increased seed abortion due to embryo abnormalities at the globular stage of development (Almagro *et al.*, 2008). This phenotype was found only under normal nitrate supply but not under deficiency conditions, suggesting that the plant can sense the nitrogen availability and modulate its nutrition strategy for grain development. In summary, up to now, 12 genes are shown to encode transport proteins involved in nitrate fluxes through the whole plant and they are represented in a schematic diagram in Fig. 3.

Travelling within the cell

Techniques for measuring intracellular nitrate concentrations include the compartmental tracer efflux method,

nitrate selective-microelectrodes, cellular nitrate reductase assays, and ^{133}Cs nuclear magnetic resonance (NMR) (Miller and Smith, 2008). The nitrate concentrations measured depend very much on the technique used, cell type, and growing conditions, but a few generalizations can be made. Cytosolic nitrate concentrations (1–6 mM) are more stable than vacuolar concentrations (5–75 mM) when the external nitrate concentrations vary 10 000-fold (van der Leij *et al.*, 1998; Cookson *et al.*, 2005; Miller and Smith, 2008). This result is consistent with the idea that the vacuolar nitrate pool provides a reservoir of stored nitrate that can be used to maintain the cytosolic nitrate concentration. This was confirmed by the fact that the nitrate pool is not maintained at a steady-state in the cytosol of the root tip cells where the vacuoles are not fully developed (Radcliffe *et al.*, 2005; Miller and Smith, 2008). Nitrate can also be found in chloroplasts. For example, in isolated chloroplasts from spinach leaves, the concentration of this anion is around 5 mM and stays constant independently of the external nitrate conditions (Schropelmeier and Kaiser, 1988). Finally, it is assumed that nitrate might be present in other organelles, mainly ER (Siddiqi and Glass, 2002). The future development of fluorescent probes that report nitrate concentrations would be the ultimate tool for measuring more precisely intracellular nitrate concentrations and following possible changes in different nitrate pools

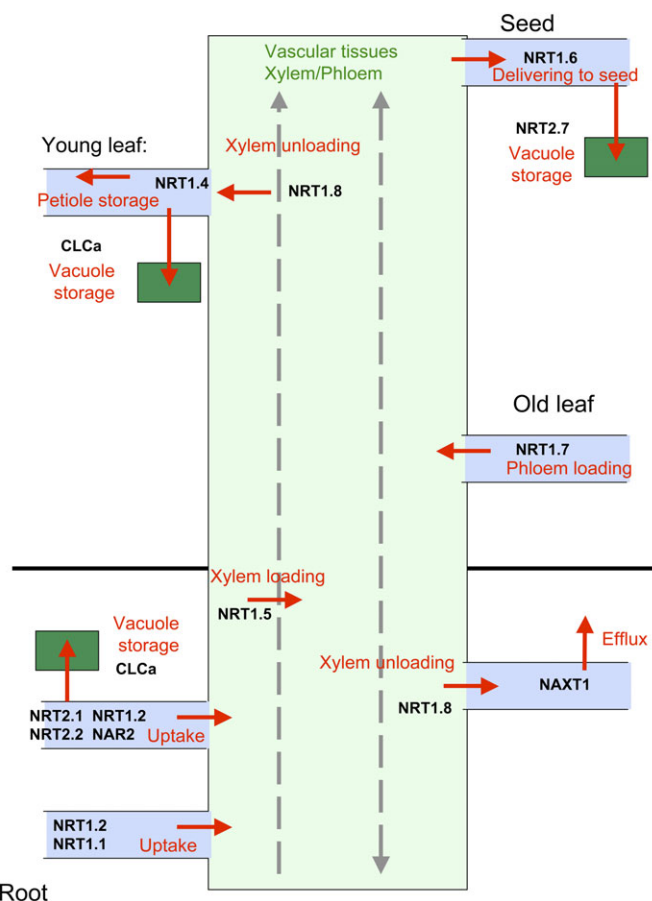


Fig. 3. Schematic representation of nitrate routes within the *Arabidopsis* plant.

according to environmental conditions. Recent advances in FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) and FP (Fluorescent Protein) technologies have allowed the production of fluorescent probes for calcium, glucose, sucrose, and phosphate (Okumoto, 2010). Similar probes for nitrate have yet to be developed (Okunola *et al.*, 2008). However, the discovery of proteins that transport nitrate and their crystallization provides future hope for developing such nitrate-specific fluorescent probes. The challenge will be to ensure a nitrate probe highly selective for nitrate (over nitrite and chloride) and relatively pH-insensitive for use in different cellular compartments.

It is now well established that nitrate in the vacuole is not only important for storage but also for turgor maintenance (McIntyre, 2001; Miller and Smith, 2008). Very early studies suggested the presence of a NO_3^-/H^+ transporter in the tonoplast (Schumaker and Sze, 1987; Miller and Smith, 1992). Recent evidence shows that the activities of these nitrate transporters are connected to the activity of the vacuolar H^+ -ATPase, confirming the key role of the pH gradient as a driving force of fluxes through the tonoplast (Krebs *et al.*, 2010). AtCLCa was the first $\text{NO}_3^-/2\text{H}^+$ exchanger discovered, responsible for nitrate loading into the vacuole in *Arabidopsis* (Fig. 4) (De Angeli *et al.*, 2006). This protein belongs to a family of chloride channel/transporters. The difference of selectivity between AtCLCa and the other AtCLCs is mainly due to the presence of a proline residue in the selectivity motif (Bergsdorf *et al.*, 2009; Wege *et al.*, 2010; Zifarelli and Pusch, 2010).

Knock-out plants for *AtCLCa* have only a 50% reduction in nitrate accumulation compared to the wild-type (Geelen *et al.*, 2000; Monachello *et al.*, 2009). This indicates that there are additional genes that are also responsible for nitrate loading into the vacuole. Recently, AtCLCb, the AtCLCa closest related protein, has also been shown to be a nitrate transporter in the tonoplast (von der Fecht-Bartenbach *et al.*, 2010). Nevertheless, it is still unclear if AtCLCb is involved in nitrate loading or release from the vacuole. In contrast to the CLC family, only one member of the NRT families has been shown to be involved in nitrate flux within the cell, the AtNRT2.7 protein. The gene is specifically expressed at the final stage of seed maturation and the protein is localized on the tonoplast (Chopin *et al.*, 2007b). Characterization of null mutants, showing reduced nitrate contents in mature seeds, suggests that the AtNRT2.7 protein is involved in the loading of nitrate into the embryo vacuoles, and thus complements the role of the AtNRT1.6 in seed nitrate feeding (Almagro *et al.*, 2008, see previous section ‘Travelling within the plant’).

The analyses of these vacuolar transporters revealed that co-operation between the tonoplast and plasma membrane exists at the molecular level to regulate the fluxes to maintain the cytosolic nitrate homeostasis. For example, in *atclca* mutants, both expression of *NRT1.1* and *NRT2.1* are reduced (Monachello *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). Further analyses will be needed in the future to understand the integrated network responsible for this process.

Nitrate homeostasis is buffered as well by the cytosolic nitrate reductase (NR), the first enzyme in the nitrate assimilation pathway, reducing nitrate into nitrite (Fig. 4) in an NAD(P)H-dependent manner (Cookson *et al.*, 2005; Fan *et al.*, 2006). Once nitrite is formed in the cytosol, it is translocated into the chloroplast to be reduced into ammonium by the nitrite reductase (NiR). The transport of nitrite from the cytosol to the chloroplast remains largely unknown in higher plants. Although a free diffusion has been proposed, the physiological nitrite concentration in the cytosol (in the range of micromolar) is too low to allow this mechanism (Kawamura *et al.*, 1996) and requires the presence of transporters. A nitrite transporter has been isolated in cucumber: CsNitr1 (*Cucumis sativus* nitrite transporter) (Sugiura *et al.*, 2007). This transporter belongs to the proton-dependent oligopeptide transporter (POT) family and is able to export nitrite when expressed in yeast. CsNitr1 is localized in the inner membrane of the chloroplast envelope and *Arabidopsis* mutants of the orthologous gene (At1g68570), which belongs to the NRT1 family (Tsay *et al.*, 2007) over-accumulates NO_2^- compared with the wild type. Another transporter which could participate to nitrite transport in the chloroplast is the AtCLCe member of CLC family (Fig. 4), targeted to thylakoid membranes (Marmagne *et al.*, 2007). Knock-out mutants of *AtCLCe* present an altered photosynthetic activity, an under-accumulation of nitrate associated with an over-accumulation of nitrite (Monachello *et al.*, 2009). Nevertheless, it is difficult to conclude as to the exact function of AtCLCe as the expression of several genes implicated in nitrate fluxes (*NRT2.1* or *NRT1.1*) are modified in *atclce* mutants (Monachello *et al.*, 2009). Another actor of NO_2^- fluxes from the cytosol to the chloroplast is the highly conserved PII protein, a sensor of carbon/nitrogen balance and energy status in bacteria, cyanobacteria, and plants (Lillo, 2008). In *Arabidopsis*, one PII homologue (GLB1) has been cloned (Hsieh *et al.*, 1998). *Arabidopsis* PII mutant seedlings present an increased sensitivity to NO_2^- toxicity (Ferrario-Mery *et al.*, 2005). This sensitivity can be explained by an increase by 30–40% of the light-dependent NO_2^- uptake observed on isolated chloroplasts of the PII mutant compared with the wild type (Ferrario-Mery *et al.*, 2008). Thus, PII appears to be involved in the down-regulation of NO_2^- uptake into the chloroplast; however, its partners in this mechanism remain to be identified.

The four operators

The importance of nitrate for growth and development lead to the existence of tightly regulating systems to co-ordinate nitrate transport and assimilation with developmental needs and environment cues. Globally, operators of nitrate trips can be summarized as (i) nitrate itself, (ii) the plant N status (amino acids) exerting a negative regulation on transporters, and (iii) the plant C status (light, carbohydrate) or reduced nitrogen forms (ammonium or amino acids) stimulating or inhibiting, respectively, nitrate transport and assimilation (see Gojon *et al.*, 2009, for a review).

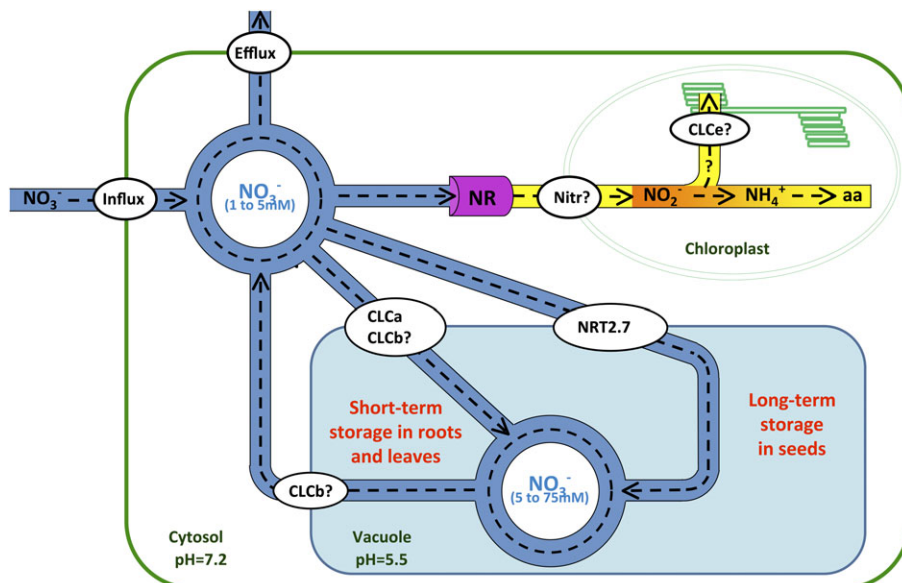


Fig. 4. Schematic representation of nitrate routes within the cell; NR, nitrate reductase.

Nitrate itself, either as an external nutrient or as an intracellular ion induces specific sets of genes to shape plant shoot and root morphology, influence flowering time, and relieve seed dormancy (Bernier *et al.*, 1993; Alboresi *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007). The typical primary nitrate response, observed after re-providing nitrate to short-term starved plants, is characterized by the induction of nitrate transporters (*NRT2.1*; *NAR2*; *NRT1.1*) and nitrogen assimilation genes (nitrate reductase, glutamine synthetase). Nitrate uptake is decreased if internal N status is high or when other nitrogen sources are provided. Glutamine was shown to be the most powerful repressor of *NRT2.1* transcript and represents the main shoot-to-root N status signal to regulate N uptake (Vidmar *et al.*, 2000; Gansel *et al.*, 2001; Nazoa *et al.*, 2003). In contrast to the amino acid negative regulation, induction of nitrate transporters by photosynthesis products involves metabolites downstream of the hexokinase activity and requires the oxidative pentose phosphate pathway (Lejay *et al.*, 2008). A putative signalling candidate would be glucose-6-P, already known to be an allosteric regulator of the key carbohydrate metabolic steps phosphoenolpyruvate carboxylase and sucrose phosphate synthase (Matsumura *et al.*, 2002; Takahashi-Terada *et al.*, 2005). The glucose-6-P level was found to be well correlated with the transcript levels of *NRT1.1* and *NRT2.1* in roots, but further work is needed to assign a regulatory function of this metabolite for nitrate uptake. Interestingly, this new regulation mode also concerns members of the NO_3^- and SO_4^{2-} transporter family, thus illustrating a coordinated regulation of different nutrient uptake (Lejay *et al.*, 2008).

Next to these operators, means of regulating N nutrition acting either at the transcriptional or post-translational levels of target gene products have been characterized. They include protein kinases, transcription factors, RING-type ubiquitin ligase or microRNAs (for reviews see Gojon *et al.*,

2009; Miller *et al.*, 2009; Castaings *et al.*, 2011). Ordering this complex web of regulating components into a primary master regulator or secondary developmental regulatory loops around nitrate pools is a major challenge.

Other parameters of the environment also affect the nitrate journey into a plant. For example, cadmium stress was shown to induce the expression of the xylem nitrate unloading transporter *AtNRT1.8* (Li *et al.*, 2010) and to repress the xylem nitrate loading system *AtNRT1.5* (Lin *et al.*, 2008). This response illustrates a strategy of nitrate reallocation under Cd^{2+} stress aiming at maintaining nitrate in roots. In plants experiencing a prolonged potassium deficiency, nitrate absorption is reduced by reversibly repressing the expression of *AtNRT2.1*, *AtNRT2.3*, and *AtNRT2.6* (Armengaud *et al.*, 2004). In these conditions, the concomitant depletion of root nitrate content, together with the stimulation of nitrogen assimilatory pathway (NR, GS, GOGAT), represents an original situation where nitrogen absorption and assimilation are uncoupled (Armengaud *et al.*, 2009). The interaction between water and nitrate are already known and molecular (Wang *et al.*, 2001) and genetic interactions (Loudet *et al.*, 2003) have been investigated. Interestingly, *AtNRT1.1* is expressed and functions in *Arabidopsis* guard cells. In the absence of *NRT1.1* protein, stomatal opening and transpiration rates are reduced, leading to enhanced drought tolerance when compared with the wild type (Guo *et al.*, 2003).

Concluding remarks

During the last decade, huge efforts have been devoted to the molecular dissection of nitrate fluxes through the whole plant. A very complex picture is now emerging (Figs 3, 4), combining the action of members of at least four gene families, namely *NRT1*, *NRT2*, *NAR*, and *CLC*. Given that

the specific functions of 12 *NRT1* and *NRT2* genes are at present described in *Arabidopsis* (Tsay *et al.*, 2007; this review), there are still 48 genes whose roles *in planta* remain to be elucidated. In addition, we are just at the beginning of understanding how these different proteins act in a coordinated manner, particularly when fluxes through the plasma membrane, tonoplast or chloroplast envelopes take place in the same cell. Finally, even if *Arabidopsis* constitutes a very good model to study this complex biological process, the function of orthologous genes in crops is yet to be elucidated. However, efforts must be emphasized particularly in species characterized, for example, by different nitrogen metabolisms such as rice (paddy environment). For example, in rice, one *NRT1* gene has been functionally characterized (Lin *et al.*, 2000) while the functions of two *NAR2* like (Araki and Hasgawa, 2006) and four *NRT2* like genes (Cai *et al.*, 2008) are still under investigation. Symbiotic interactions, bacterial or mycorrhizal, may also have pronounced effects on the functions and regulations of nitrogen transport. Recent studies on mycorrhizal interactions have highlighted the roles of newly identified key transporters, in the fungi or in the host plants as well (Chalot *et al.*, 2006, Javot *et al.*, 2007).

Acknowledgements

P Armengaud and M Jossier are supported by a French ANR program (Nitrapool, ANR08-Blan-008). We thank A Krapp for critical reading of our manuscript.

References

- Alboresi A, Gestin C, Leydecker MT, Bedu M, Meyer C, Truong HN.** 2005. Nitrate, a signal relieving seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment* **28**, 500–512.
- Almagro A, Lin SH, Tsay YF.** 2008. Characterization of the *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.6 reveals a role of nitrate in early embryo development. *The Plant Cell* **20**, 3289–3299.
- Araki R, Hasegawa H.** 2006. Expression of rice (*Oryza sativa* L.) genes involved in high-affinity nitrate transport during the period of nitrate induction. *Breeding Sciences* **56**, 295–302.
- Armengaud P, Breitling R, Amtmann A.** 2004. The potassium-dependent transcriptome of *Arabidopsis* reveals a prominent role of jasmonic acid in nutrient signaling. *Plant Physiology* **136**, 2556–2576.
- Armengaud P, Sulpice R, Miller AJ, Stitt M, Amtmann A, Gibon Y.** 2009. Multilevel analysis of primary metabolism provides new insights into the role of potassium nutrition for glycolysis and nitrogen assimilation in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology* **150**, 772–785.
- Aslam M, Travis RL, Huffaker RC.** 1995. Effect of pH and calcium on short-term NO₃⁻ fluxes in roots of barley seedlings. *Plant Physiology* **108**, 727–734.
- Baxter I, Hosmani PS, Rus A, Lahner B, Borevitz JO, Muthukumar B, Mickelbart MV, Schreiber L, Franke RB, Salt DE.** 2009. Root suberin forms an extracellular barrier that affects water relations and mineral nutrition in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* **5**, e1000492.
- Beilstein MA, Nagalingum NS, Clements MD, Manchester SR, Mathews S.** 2010. Dated molecular phylogenies indicate a Miocene origin for *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* **107**, 18724–18728.
- Bergsdorf EY, Zdebek AA, Jentsch TJ.** 2009. Residues important for nitrate/proton coupling in plant and mammalian CLC transporters. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 11184–11193.
- Bernier G, Havelange A, Houssa C, Petitjean A, Lejeune P.** 1993. Physiological signals that induce flowering. *The Plant Cell* **5**, 1147–1155.
- Cai CH, Wang JY, Zhu YG, Shen QR, Li B, Tong YP, Li ZS.** 2008. Gene structure and expression of the high-affinity nitrate transport system in rice roots. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**, 443–451.
- Castaigns L, Marchive C, Meyer C, Krapp A.** 2011. Nitrogen signalling in *Arabidopsis*: how to get insights into a complex signalling network. *Journal of Experimental Botany* **62**, 0000–0000.
- Canfield DE, Glazer AN, Falkowski PG.** 2010. The evolution and future of earth's nitrogen cycle. *Science* **330**, 192–196.
- Canfield DE, Rosing MT, Bjerrum C.** 2006. Early anaerobic metabolisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences* **361**, 1819–1841.
- Cannings RE, Kramer PJ.** 1957. Salt absorption and accumulation in various region of roots. *American Journal of Botany* **45**, 378–382.
- Chalot M, Blaudez D, Brun A.** 2006. Ammonia, a candidate for nitrogen transfer at the mycorrhizal interface. *Trends in Plant Science* **11**, 263–266.
- Chiu C, Lin CS, Hsia AP, Su RC, Lin HL, Tsay YF.** 2004. Mutation of a nitrate transporter, AtNRT1.4, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development. *Plant and Cell Physiology* **45**, 1139–1148.
- Chopin F, Orsel M, Dorbe MF, Chardon F, Truong HN, Miller AJ, Krapp A, Daniel-Vedele F.** 2007b. The *Arabidopsis* ATNRT2.7 nitrate transporter controls nitrate content in seeds. *The Plant Cell* **19**, 1590–1602.
- Chopin F, Wirth J, Dorbe MF, Lejay L, Krapp A, Gojon A, Daniel-Vedele F.** 2007 a. The *Arabidopsis* nitrate transporter AtNRT2.1 is targeted to the root plasma membrane. *Plant Physiology and Biochemistry* **45**, 630–635.
- Cookson SJ, Williams LE, Miller AJ.** 2005. Light–dark changes in cytosolic nitrate pools depend on nitrate reductase activity in *Arabidopsis* leaf cells. *Plant Physiology* **138**, 1097–1105.
- De Angeli A, Monachello D, Ephritikhine G, Frachisse JM, Thomine S, Gambale F, Barbier-Brygoo H.** 2006. The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* **442**, 939–942.
- Enstone DE, Peterson CA.** 2002. Root endodermis and exodermis, structure, function, and responses to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation* **21**, 335–351.
- Falkowski PG.** 1997. Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO₂ in the ocean. *Nature* **387**, 272–275.

- Fan SC, Lin CS, Hsu PK, Lin SH, Tsay YF.** 2009. The Arabidopsis nitrate transporter NRT1.7, expressed in phloem, is responsible for source-to-sink remobilization of nitrate. *The Plant Cell* **21**, 2750–2761.
- Fan X, Gordon-Weeks R, Shen Q, Miller AJ.** 2006. Glutamine transport and feedback regulation of nitrate reductase activity in barley roots leads to changes in cytosolic nitrate pools. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1333–1340.
- Ferrario-Mery S, Bouvet M, Leleu O, Savino G, Hodges M, Meyer C.** 2005. Physiological characterisation of Arabidopsis mutants affected in the expression of the putative regulatory protein PII. *Planta* **223**, 28–39.
- Ferrario-Mery S, Meyer C, Hodges M.** 2008. Chloroplast nitrite uptake is enhanced in Arabidopsis PII mutants. *FEBS Letters* **582**, 1061–1066.
- Filleur S, Dorbe MF, Cerezo M, Orsel M, Granier F, Gojon A, Daniel-Vedele F.** 2001. An Arabidopsis T-DNA mutant affected in *Nrt2* genes is impaired in nitrate uptake. *FEBS Letters* **489**, 220–224.
- Gansel X, Munos S, Tillard P, Gojon A.** 2001. Differential regulation of the NO_3^- and NO_4^+ transporter genes *AtNrt2.1* and *AtAmt1.1* in Arabidopsis: relation with long-distance and local-controls by N status of the plant. *The Plant Journal* **26**, 143–155.
- Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D, Pugin A.** 2006. Early signalling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 711–724.
- Gaymard F, Pilot G, Lacombe B, Bouchez D, Bruneau D, Bouchez J, Michaux-Ferrière NM, Thibaud JB, Sentenac H.** 1998. Identification and disruption of a plant Shaker-like outward channel involved in K^+ release into the xylem sap. *Cell* **94**, 647–655.
- Geelen D, Lurin C, Bouchez D, Frachisse JM, Lelievre F, Courtial B, Barbier-Brygoo H, Maurel C.** 2000. Disruption of putative anion channel gene *AtCLC-a* in Arabidopsis suggests a role in the regulation of nitrate content. *The Plant Journal* **21**, 259–267.
- Glass ADM, Siddiqi MY.** 1995. Nitrogen absorption by plant roots. In: Srivastava HS, Singh RP, eds. *Nitrogen nutrition in higher plants*. New Delhi, India: Associated Publishing Co, 21–56.
- Gojon A, Nacry P, Davidian JC.** 2009. Root uptake regulation, a central process for NPS homeostasis in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 328–338.
- Gordon T, Lea PJ, Rosenberg C, Trinchnat JC.** 2001. Nodule formation and function. In: Lea P, Morot-Gaudry JF, eds. *Plant nitrogen*. Berlin: Springer-Verlag, 101–146.
- Guo FQ, Young J, Crawford NM.** 2003. The nitrate transporter AtNRT1.1 (CHL1) functions in stomatal opening and contributes to drought susceptibility in Arabidopsis. *The Plant Cell* **15**, 107–117.
- Herdel K, Schmidt P, Feil R, Mohr A, Schurr U.** 2001. Dynamics of concentrations and nutrient fluxed in the xylem of *Ricinus communis*: diurnal course, impact of nutrient availability and nutrient uptake. *Plant, Cell and Environment* **24**, 41–52.
- Ho CH, Lin SH, Hu HC, Tsay YF.** 2009. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* **138**, 1184–1194.
- Ho CH, Tasy YF.** 2010. Nitrate, ammonium and potassium sensing and signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 604–610.
- Hsieh MH, Lam HM, van de Loo FJ, Coruzzi G.** 1998. A PII-like protein in Arabidopsis, putative role in nitrogen sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **95**, 13965–13970.
- Huang NC, Chiang CS, Crawford NM, Tsay YF.** 1996. CHL1 encodes a component of the low-affinity nitrate uptake system in Arabidopsis and shows cell type-specific expression in roots. *The Plant Cell* **8**, 2183–2191.
- Huang NC, Liu KH, Lo HJ, Tsay YF.** 1999. Cloning and functional characterization of an Arabidopsis nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *The Plant Cell* **11**, 1381–1392.
- Javot H, Penmetsa R, Terzaghi N, Cook DR, Harrison MJ.** 2007. A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **104**, 1720–1725.
- Kawamura Y, Takahashi M, Arimura G, Isayama T, Irifune K, Goshima N, Morikawa H.** 1996. Determination of levels of NO_3^- , NO_2^- , and NO_4^+ ions in leaves of various plants by capillary electrophoresis. *Plant and Cell Physiology* **37**, 878–880.
- Köhler B, Wegner LH, Osipov V, Raschke K.** 2002. Loading of nitrate into the xylem, apoplastic nitrate controls the voltage dependence of X-QUAC, the main anion conductance in xylem-parenchyma cells of barley roots. *The Plant Journal* **30**, 133–142.
- Krebs M, Beyhl D, Gorlich E, Al-Rasheid KA, Marten I, Stierhof YD, Hedrich R, Schumacher K.** 2010. Arabidopsis V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **107**, 3251–3256.
- Krouk G, Lacombe B, Bielach A, et al.** 2010. Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Developmental Cell* **18**, 927–937.
- Lejay L, Wirth J, Pervent M, Cross JM, Tillard P, Gojon A.** 2008. Oxidative pentose phosphate pathway-dependent sugar sensing as a mechanism for regulation of root ion transporters by photosynthesis. *Plant Physiology* **146**, 2036–2053.
- Li JY, Fu YL, Pike SM, et al.** 2010. The Arabidopsis nitrate transporter NRT1.8 functions in nitrate removal from the xylem sap and mediates cadmium tolerance. *The Plant Cell* **22**, 1633–1646.
- Li W, Wang Y, Okamoto M, Crawford NM, Siddiqi MY, Glass ADM.** 2007. Dissection of the AtNRT2.1, AtNRT2.2 inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. *Plant Physiology* **143**, 425–433.
- Lillo C.** 2008. Signalling cascades integrating light-enhanced nitrate metabolism. *Biochemical Journal* **415**, 11–19.
- Lin CHM, Koh S, Stacey G, Yu SM, Lin TY, Tsay YF.** 2000. Cloning and functional characterization of a constitutively expressed nitrate transporter gene, *OsNRT1*, from rice. *Plant Physiology* **122**, 379–388.
- Lin SH, Kuo HF, Canivenc G, et al.** 2008. Mutation of the Arabidopsis NRT1.5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. *The Plant Cell* **20**, 2514–2528.
- Liu KH, Huang CY, Tsay YF.** 1999. CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of Arabidopsis involved in multiple phases of nitrate uptake. *The Plant Cell* **11**, 865–874.

- Liu KH, Tsay YF.** 2003. Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *EMBO Journal* **22**, 1005–1013.
- Loudet O, Chaillou S, Krapp A, Daniel-Vedele F.** 2003. Quantitative trait loci analysis of water and anion contents in interaction with nitrogen availability in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. **163**, 711–722.
- Macduff JH, Jackson SB.** 1992. Influx and efflux of nitrate and ammonium in italian ryegrass and white clover roots: comparisons between effects of darkness and defoliation. *Journal of Experimental Botany* **43**, 525–535.
- McIntyre GI.** 2001. Control of plant development by limiting factors: a nutritional perspective. *Physiologia Plantarum* **113**, 165–175.
- Malagoli P, Lainé P, Le Deunff E, Rossato L, Ney B, Ourry A.** 2004. Modeling nitrogen uptake in oilseed rape cv. Capitol during a growth cycle using influx kinetics of root nitrate transport systems and field experimental data. *Plant Physiology* **134**, 388–400.
- Marmagne A, Vinauger-Douard M, Monachello D, de Longevialle AF, Charon C, Allot M, Rappaport F, Wollman FA, Barbier-Brygoo H, Ephritikhine G.** 2007. Two members of the *Arabidopsis* CLC (chloride channel) family, AtCLCe and AtCLCf, are associated with thylakoid and Golgi membranes, respectively. *Journal of Experimental Botany* **58**, 3385–3393.
- Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A.** 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants, challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* **105**, 1141–1157.
- Matsumura H, Xie Y, Shirakata S, Inoue T, Yoshinaga T, Ueno Y, Izui K, Kai Y.** 2002. Crystal structures of C₄ from maize and quaternary complex of *E. coli* phosphoenolpyruvate carboxylases. *Structure* **10**, 1721–1730.
- Miller AJ, Fan X, Orsel M, Smith SJ, Wells DM.** 2007. Nitrate transport and signalling. *Journal of Experimental Botany* **58**, 2297–2306.
- Miller AJ, Shen Q, Xu G.** 2009. Freeways in the plant, transporters for N, P and S and their regulation. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 284–290.
- Miller AJ, Smith SJ.** 1992. The mechanism of nitrate transport across the tonoplast of barley root cells. *Planta* **187**, 554–557.
- Miller AJ, Smith SJ.** 2008. Cytosolic nitrate ion homeostasis, could it have a role in sensing nitrogen status? *Annals of Botany* **101**, 485–489.
- Monachello D, Allot M, Oliva S, Krapp A, Daniel-Vedele F, Barbier-Brygoo H, Ephritikhine G.** 2009. Two anion transporters AtClCa and AtClCe fulfil interconnecting but not redundant roles in nitrate assimilation pathways. *New Phytologist* **183**, 88–94.
- Musmann M, Hu FZ, Richter M, et al.** 2007. Insights into the genome of large sulfur bacteria revealed by analysis of single filaments. *PLoS Biology* **5**, e230.
- Näsholm T, Kielland K, Ganeteg U.** 2009. Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytologist* **182**, 31–48.
- Navarro-Gonzalez R, McKay CP, Mvondo DN.** 2001. A possible nitrogen crisis for Archaean life due to reduced nitrogen fixation by lightning. *Nature* **412**, 61–64.
- Nazoa P, Videmar J, Tranbarger TJ, Mouline K, Damiani I, Tillard P, Glass ADM, Touraine B.** 2003. Regulation of the nitrate transporter gene *AtNRT2.1* in *Arabidopsis thaliana*, responses to nitrate, amino acids, and developmental stage. *Plant Molecular Biology* **52**, 689–703.
- Okamoto M, Kumar A, Li W, Wang Y, Sidiqi MY, Crawford NM, Glass AD.** 2006. High-affinity nitrate transport in roots of *Arabidopsis* depends on expression of the NAR2-like gene *AtNRT3.1*. *Plant Physiology* **142**, 1304–1317.
- Okamoto M, Vidmar JJ, Glass ADM.** 2003. Regulation of *NRT1* and *NRT2* gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. *Plant and Cell Physiology* **44**, 304–317.
- Okumoto S.** 2010. Imaging approach for monitoring cellular metabolites and ions using genetically encoded biosensors. *Current Opinion in Biotechnology* **21**, 45–54.
- Okunola OA, Santacroce PV, Davis JT.** 2008. Natural and synthetic receptors for nitrate anion. *Supramolecular Chemistry* **20**, 169–190.
- Osmond KS, Sibout R, Hardtke C.** 2007. Hidden branches, developments in root system architecture. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 93–113.
- Orsel M, Chopin F, Leleu O, Smith SJ, Krapp A, Daniel-Vedele F, Miller AJ.** 2006. Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis*: physiology and protein–protein interaction. *Plant Physiology* **142**, 1304–1317.
- Orsel M, Eulenburg K, Krapp A, Daniel-Vedele F.** 2004. Disruption of the nitrate transporter genes *AtNRT2.1* and *AtNRT2.2* restricts growth at low external nitrate concentration. *Planta* **219**, 714–721.
- Orsel M, Krapp A, Daniel-Vedele F.** 2002. Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in *Arabidopsis*. Structure and gene expression. *Plant Physiology* **129**, 886–896.
- Pina-Ochoa E, Hogslund S, Geslin E, Cedhagen T, Revsbech NP, Nielsen LP, Schweizer M, Jorissen F, Rysgaard S, Risgaard-Petersen N.** 2010. Widespread occurrence of nitrate storage and denitrification among Foraminifera and Gromiida. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **107**, 1148–1153.
- Raab TK, Terry N.** 1995. Carbon, nitrogen and nutrient interactions in *Beta vulgaris* L. as influenced by nitrogen source, NO₃⁻ versus NO₂⁻. *Plant Physiology* **107**, 575–584.
- Radcliffe SA, Miller AJ, Ratcliffe RG.** 2005. Microelectrode and Cs-133 nuclear magnetic resonance evidence for variable cytosolic and cytoplasmic nitrate pools in maize root tips. *Plant, Cell and Environment* **28**, 1379–1387.
- Reisenauer HM.** 1966. Mineral nutrients in soil solution. In: Altman PL, Dittman DW, eds. *Environmental biology*. Bethesda, Maryland: Federal American Society of Experimental Biology, 5137–5508.
- Schroppelmeier G, Kaiser WM.** 1988. Ion homeostasis in chloroplasts under salinity and mineral deficiency. 1. Solute concentrations in leaves and chloroplasts from spinach plants under NaCl or NaNO₃ salinity. *Plant Physiology* **87**, 822–827.
- Schulz-Vogt HN.** 2006. Vacuoles. In: Shively JM, ed. *Inclusions in Prokaryotes, Microbiology monographs* **1**. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 295–298.

- Schumaker KS, Sze H.** 1987. Decrease of pH gradients in tonoplast vesicles by NO_3^- and Cl^- —evidence for H^+ coupled anion transport. *Plant Physiology* **83**, 490–496.
- Segonzac C, Boyer JC, Ipotesi E, Szponarski W, Tillard P, Touraine B, Sommerer N, Rossignol M, Gibrat R.** 2007. Nitrate efflux at the root plasma membrane: identification of an *Arabidopsis* excretion transporter. *The Plant Cell* **19**, 3760–3777.
- Siddiqi MY, Glass ADM.** 2002. An evaluation of the evidence for, and implications of, cytoplasmic nitrate homeostasis. *Plant, Cell and Environment* **25**, 1211–1217.
- Siebrecht S, Mäck G, Tischner R.** 1995. Function and contribution of the root tip in the induction of NO_3^- uptake along the barley root axis. *Journal of Experimental Botany* **46**, 1669–1676.
- Strahm BD, Harrison RB.** 2006. Nitrate sorption in a variable-charge forest soil of the Pacific Northwest. *Soil Science* **171**, 313–321.
- Sugiura M, Georgescu MN, Takahashi M.** 2007. A nitrite transporter associated with nitrite uptake by higher plant chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* **48**, 1022–1035.
- Takahashi-Terada A, Kotera M, Ohshima K, Furumoto T, Matsumura H, Kai Y, Izui K.** 2005. Maize phosphoenolpyruvate carboxylase. Mutations at the putative binding site for glucose 6-phosphate caused desensitization and abolished responsiveness to regulatory phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 11798–11806.
- Tong Y, Zhou JJ, Li Z, Miller AJ.** 2005. A two-component high-affinity nitrate uptake system in barley. *The Plant Journal* **41**, 442–450.
- Tsay YF, Schroeder JI, Feldmann KA, Crawford NM.** 1993. The herbicide sensitivity gene *CHL1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* **72**, 705–713.
- Tsay YF, Chiu CC, Tsai CB, Ho CH, Hsu PK.** 2007. Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Letters* **58**, 2290–2300.
- van der Leij M, Smith SJ, Miller AJ.** 1998. Remobilisation of vacuolar stored nitrate in barley root cells. *Planta* **205**, 64–72.
- Vidmar JJ, Zhuo D, Siddiqi MY, Schjoerring JK, Touraine B, Glass AD.** 2000. Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley. *Plant Physiology* **123**, 307–318.
- von der Fecht-Bartenbach J, Bogner M, Dynowski M, Ludewig U.** 2010. CLC-b-mediated NO_3^-/H^+ exchange across the tonoplast of *Arabidopsis* vacuoles. *Plant and Cell Physiology* **51**, 960–968.
- Wang R, Xing X, Wang Y, Tran A, Crawford NM.** 2009. A genetic screen for nitrate regulatory mutants captures the nitrate transporter gene *NRT1.1*. *Plant Physiology* **151**, 472–478.
- Wang YH, Garvin DF, Kochian LV.** 2001. Nitrate induced in tomato roots. Array analysis reveals novel genes that may play a role in nitrogen nutrition. *Plant Physiology* **127**, 345–359.
- Wege S, Jossier M, Filleur S, Thomine S, Barbier-Brygoo H, Gambale F, De Angeli A.** 2010. The proline 160 in the selectivity filter of the *Arabidopsis* NO_3^-/H^+ exchanger *AtCLCa* is essential for nitrate accumulation in *planta*. *The Plant Journal* **63**, 861–869.
- Wolt JD.** 1994. *Soil solution chemistry, Applications in environmental science and agriculture*. NY: John Wiley & Sons, Inc.
- Wirth J, Chopin F, Santoni V, Viennois G, Tillard P, Krapp A, Lejay L, Daniel-Vedele F, Gojon A.** 2007. Regulation of root nitrate uptake at the *NRT2.1* protein level in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 23541–23552.
- Yong Z, Kotur Z, Glass ADM.** 2010. Characterization of an intact two-component high-affinity nitrate transporter from *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal* **63**, 739–748.
- Zhang H, Rong H, Pilbeam D.** 2007. Signalling mechanisms underlying the morphological responses of the root system to nitrogen in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **58**, 2329–2338.
- Zifarelli G, Pusch M.** 2010. CLC transport proteins in plants. *FEBS Letters* **584**, 2122–2127.

SUMMARY

Identification and characterization of the chloride channel, AtCLCg, involved in salt stress response in *Arabidopsis thaliana*

In plant cells, anion channels and transporters are essential for key functions such as nutrition, ion homeostasis and, resistance to biotic or abiotic stresses. In *Arabidopsis thaliana*, members of the ChLoride Channel (CLC) family located on the tonoplast have been shown to be required for nitrate homeostasis (AtCLCa¹, AtCLCb²) or involved in salt tolerance (AtCLCc³).

In this study, we identified and characterized the chloride channel AtCLCg in *A. thaliana*. Use of an AtCLCg:GFP fusion revealed the localization of this protein on the tonoplast. Studies on the disruption of the *AtCLCg* gene by a T-DNA insertion in two independent lines demonstrated that AtCLCg is involved in response to salt stress and not in nitrate homeostasis in our conditions. Although no difference in shoot and root NO₃⁻ content is observed, mutant plants show a phenotype compared to wild-type when they are grown on 75 mM NaCl: (i) a decrease by 20% of total plant fresh weight; (ii) a diminution by 16% of primary root length and a reduction by 19% of secondary root number; (iii) an over-accumulation of chloride and sulfate in shoots by 21% and 26% respectively. These phenotypes are abolished in complemented lines with 35S::AtCLCg. *atclcg* mutants show a similar phenotype in the presence of 75 mM KCl, but no difference is detected in response to 140 mM mannitol. This result suggests that the hypersensitivity phenotype of *atclcg* mutant depends on the ionic component and not on osmotic effect of salt stress.

Knowing that AtCLCg and AtCLCc share a high degree of homology, approximately 75% of identity at protein level, and both are involved in response to salt stress, we generated a *clcc/clcg* double mutant. Phenotypic analysis showed that the two KO mutations do not have additive effect under salt stress of 75 mM NaCl. In parallel, gene expression analysis showed that *AtCLCg* is repressed in the *clcc* mutant background, and conversely. Expression analysis of reporter gene displayed a different pattern for *P_{AtCLCg}::GUS*, strongly expressed in mesophyll cells, compared with a strong expression of *P_{AtCLCc}::GUS* in guard cells and pollen. Altogether these results demonstrate that both AtCLCc and AtCLCg are involved in response to salt stress but they are not functionally redundant.

RÉSUMÉ

Identification et caractérisation d'un canal chlorure, AtCLCg, impliqué dans la réponse au stress salin chez *Arabidopsis thaliana*

Dans les cellules végétales, les canaux et les transporteurs anioniques sont essentiels pour les fonctions clés telles que la nutrition, l'homéostasie ionique et la tolérance aux stress biotiques ou abiotiques. Chez *Arabidopsis thaliana*, les membres de la famille CLC (pour Chloride Channel), situés sur le tonoplaste, sont requis pour l'homéostasie du nitrate (AtCLCa et AtCLCb) ou impliqués dans la tolérance au sel (AtCLCc).

Dans mon travail de thèse, j'ai identifié et caractérisé un canal chlorure, AtCLCg, chez *A. thaliana*. L'étude de la protéine fusion AtCLCg::GFP a révélé que cette protéine est localisée sur le tonoplaste. Deux lignés mutants indépendants d'insertion ADN-T, *atclcg* ont été sélectionnés. Les études physiologiques sur ces deux lignés ont démontré qu'AtCLCg joue un rôle dans le passage de chlorure mais pas dans l'homéostasie du nitrate au travers du tonoplaste. En effet, aucune différence de contenu en nitrate (NO_3^-) racinaire et foliaire n'a été observée entre le sauvage et les mutants dans nos conditions. Par contre, les plantes mutantes présentent un phénotype par rapport au sauvage lorsqu'elles se développent sur milieu de croissance contenant 75 mM NaCl: (i) une diminution de 20% de la masse fraîche; (ii) une diminution de 16% de la longueur de racines primaires et une réduction de 19% du nombre de racines secondaires; (iii) une sur-accumulation de 21% et 26% de chlorure et sulfate foliaire, respectivement. Ces phénotypes sont abolis chez les lignés complétées avec 35S::AtCLCg. De plus, les mutants *atclcg* présentent un phénotype similaire à la présence de 75 mM KCl, mais aucune différence n'est détectée en réponse à 140 mM mannitol. Ce résultat suggère que le phénotype d'hypersensibilité des mutants *atclcg* dépend du chlorure et non du l'effet osmotique du stress salin.

Sachant qu'AtCLCg et AtCLCc partagent un haut degré d'homologie, environ 75% d'identité au niveau des protéines, et que les deux sont impliquées dans la réponse au stress salin de la plante, nous avons généré le double mutant *atclcc/atclcg*. L'analyse phénotypique a montré que le double mutant ne présente pas un phénotype additif sur milieu de stress 75 mM NaCl. En parallèle, l'analyse de l'expression des gènes a montré qu'AtCLCg est réprimé dans le fond mutant *atclcc*, et inversement. Par ailleurs, l'analyse de l'expression de gène rapporteur démontre que $P_{AtCLCg}::GUS$ est fortement exprimé dans les cellules du mésophylle alors qu'une forte expression de $P_{AtCLCc}::GUS$ dans les cellules de garde et le pollen est observé. Ainsi, l'ensemble de ces résultats montrent que ces deux protéines AtCLCc et AtCLCg sont impliquées dans la réponse au stress salin de la plante, mais elles n'ont pas de fonction redondante.