

MONTPELLIER SUPAGRO  
CENTRE INTERNATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES EN SCIENCES AGRONOMIQUES  
2, place P. Viala – 34060 Montpellier Cedex 2 – France

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN PHYSIOLOGIE VEGETALE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

Discipline : Physiologie  
Formation doctorale : Biologie Intégrative des Plantes  
Ecole doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosiences,  
Environnement

présentée et soutenue publiquement

par

Magali DI PIETRO

**REGULATION DES AQUAPORINES ET REPOSE DES RACINES  
D'*ARABIDOPSIS THALIANA* A DES STIMULI ABIOTIQUES ET NUTRITIONNELS**

JURY

Mme Hélène BARBIER-BRYGOO, Directeur de Recherche, CNRS, Gif-sur-Yvette	Rapporteur
Mr Michel ZIVY, Chargé de Recherche, INRA, Gif-sur-Yvette	Rapporteur
Mme Françoise SIMON-PLAS, Directeur de Recherche, INRA, Dijon	Examineur
Mr Alain GOJON, Directeur de Recherche, INRA, Montpellier	Examineur
Mr Rafaël MORILLON, Chercheur, CIRAD, Montpellier	Examineur
Mme Véronique SANTONI, Directeur de Recherche, INRA, Montpellier	Directrice de thèse





MONTPELLIER SUPAGRO  
CENTRE INTERNATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES EN SCIENCES AGRONOMIQUES  
2, place P. Viala – 34060 Montpellier Cedex 2 – France

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN PHYSIOLOGIE VEGETALE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

Discipline : Physiologie  
Formation doctorale : Biologie Intégrative des Plantes  
Ecole doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosiences,  
Environnement

présentée et soutenue publiquement

par

Magali DI PIETRO

**REGULATION DES AQUAPORINES ET REPONSE DES RACINES  
D'*ARABIDOPSIS THALIANA* A DES STIMULI ABIOTIQUES ET NUTRITIONNELS**

JURY

Mme Hélène BARBIER-BRYGOO, Directeur de Recherche, CNRS, Gif-sur-Yvette	Rapporteur
Mr Michel ZIVY, Chargé de Recherche, INRA, Gif-sur-Yvette	Rapporteur
Mme Françoise SIMON-PLAS, Directeur de Recherche, INRA, Dijon	Examineur
Mr Alain GOJON, Directeur de Recherche, INRA, Montpellier	Examineur
Mr Rafaël MORILLON, Chercheur, CIRAD, Montpellier	Examineur
Mme Véronique SANTONI, Directeur de Recherche, INRA, Montpellier	Directrice de thèse



## LISTE D'ABREVIATIONS

1P : monophosphorylation

2P : diphosphorylation

3P : triphosphorylation

$\Delta P$  : gradient de pression imposé

ABTS : 2,2'-Azino-bis-3-ethylBenzThiazoline-6-Sulphonic acid

ACN: acétonitrile

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

ADN-T : Acide DésoxyriboNucléique de Transfert

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

BSA : Bovine serum albumine

CAPS : 3-(CyclohexylAmino)-1-PropaneSulfonic acid

Chymo/AspN : Chymotrypsine/Asparagine N

CID : Collision Induced Dissociation

CoA : Coenzyme A

Col0 : Columbia 0

cPTI : 2-(4-carboxyPhenyl)-4,4,5,5-Tetramethylimidazoline-1-oxyl

cPTIO : 2-(4-carboxy-Phenyl)-4,4,5,5-Tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-Oxide

DEA-NO : DiEthylAmine NONOate

DTT : DiThioThreitol

EDTA : Ethylene Diamine Tetraacetic Acid

EGTA : Ethylene Glycol Tetraacetic Acid

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ESI : ElectroSpray Ionization

ETD : Electron Transfer Dissociation

FASP : Filtre Aided Proteome Preparation

GFP : Green Fluorescent Protein

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

IAA : IodoAcétAmine

ICAT : Isotope-Coded Affinity Tags

IMAC : Immobilized Metal ion Affinity Chromatography

iTRAQ : Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation



J<sub>v</sub> : flux de sève exudée  
kb : kilo paire de base  
kDa : kilo Dalton  
KO : *knockout*  
kPa : kilo Pascal  
L<sub>0</sub> : conductance hydraulique racinaire  
LC : Liquid Chromatography  
L<sub>p<sub>r</sub></sub> : conductivité hydraulique racinaire  
LV : Vacuole Lytique  
LysC/Trypsine : EndolysineC/Trypsine  
*m/z* : masse/charge  
MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization  
MAMP : Microbe-Associated Molecular Patterns  
MF : Matière Fraiche  
MPT : Modification Post-Traductionnelle  
MRM : Multiple Reaction Monitoring  
MS : Spectrométrie de Masse  
MS/MS : Spectrométrie de Masse en tandem  
NIP : Nodulin 26-like Intrinsic Protein  
NO : oxyde nitrique  
NO<sub>2</sub> : dioxyde d'azote  
PAMP : Pathogens-Associated Molecular Patterns  
pb : paire de base  
PBS : Phosphate Buffer Saline  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
PIP : Plasma membrane Intrinsic Protein  
PMSF : PhenylMethylSulphonylFluoride  
PSV : Vacuole de Stockage de Protéines ou d'ions  
PVDF : PolyVinylidene DiFluoride  
QTOF : Quadrupole – Time Of Flight  
RIPA : Radio ImmunoPrecipitation Assay  
ROS : espèces réactives à l'oxygène  
RNOS : espèces réactives de l'oxygène et de l'azote  
r<sub>t</sub> : temps de rétention



RT-PCR : Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction

RT-PCR quantitative : Real Time - Polymerase Chain Reaction quantitative

SAX : colonne échangeuse d'anions

SCX : colonne échangeuse de cations

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SILAC : Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture

SIP : Small and basic Intrinsic Protein

SRM : Single Reaction Monitoring

SUMO : Small Ubiquitin – like Modifier

TFA : acide trifluoroacétique

TiO<sub>2</sub> : dioxyde de titane

TIP : Tonoplast Intrinsic Protein

UTR : UnTranslated Region

YFP : Yellow Fluorescent Protein



Introduction .....	5
.I Le transport d'eau dans la racine .....	6
.I.1 Anatomie de la racine.....	6
.I.2 Relation entre morphologie et fonction racinaire.....	7
.I.3 La conductivité hydraulique racinaire.....	8
.II Les aquaporines.....	8
.II.1 Une sous-famille multigénique .....	8
.II.2 Structure et spécificité de substrat.....	9
.II.3 Mécanismes moléculaires de régulation : modifications co- et post-traductionnelles .....	10
.II.4 Expression des aquaporines dans la racine .....	12
.III Implication des aquaporines dans la $Lp_r$ .....	12
.IV Régulation de la $Lp_r$ et des aquaporines .....	14
.IV.1 Les hormones .....	14
.IV.2 Les contraintes environnementales .....	15
.IV.3 Le statut nutritionnel .....	20
.IV.4 Les espèces réactives de l'oxygène et les espèces oxygénées et azotées.....	21
.IV.5 Les interactions biotiques.....	23
.V Spectrométrie de masse quantitative .....	24
.V.1 Méthode de quantification relative.....	25
.V.2 Méthodes de quantification absolue.....	27
.VI Apport de la MS pour l'étude des modifications post-traductionnelles.....	28
.VI.1 La phosphorylation : une MPT majeure.....	29
.VI.2 Enrichissements en phosphopeptides pour l'étude en MS .....	29
.VI.3 Phospho-protéomique quantitative.....	30
Objectifs .....	32
Matériel et méthode.....	33
.I Matériel végétal et conditions de culture .....	34
.I.1 Matériel biologique .....	34
.I.2 Culture des plantes .....	34
.I.3 Traitements.....	35
.II Mesure de transport d'eau racinaire.....	37
.III Méthodes de biologie moléculaire .....	38
.III.1 Caractérisation des mutants <i>tip2;3</i> .....	38



.III.2	Analyse de l'expression de <i>TIP2;3</i> .....	38
.IV	Imagerie cellulaire.....	39
.IV.1	Microscopie à lumière blanche .....	39
.IV.2	Microscopie confocale .....	39
.V	Extraction de protéines.....	39
.V.1	Purification des protéines microsomales hydrophobes .....	39
.V.2	Immunoprécipitation de protéine fusionnée à la YFP.....	40
.VI	Méthodes de biochimie .....	40
.VI.1	Dosage de protéines .....	40
.VI.2	Electrophorèse en conditions dénaturantes .....	41
.VI.3	Western blot .....	41
.VI.4	ELISA.....	42
.VII	Etude de spectrométrie de masse .....	43
.VII.1	Digestion des protéines en gel (M. di Pietro et V. Rofidal, ou J. Vialaret).....	43
.VII.2	Digestion des protéines en solution (J. Vialaret).....	43
.VII.3	Dessalage sur colonne C18 (J. Vialaret) .....	44
.VII.4	Fractionnement selon la charge : Strong Cation Exchange (J. Vialaret) .....	44
.VII.5	Enrichissement des phosphopeptides (J. Vialaret).....	45
.VII.6	Regroupement des fractions .....	45
.VII.7	Spectrométrie de masse.....	46
.VII.8	Analyse des données de (phospho)-protéomique.....	47
.VIII	Analyse statistique.....	49
.VIII.1	Tests statistiques.....	49
.VIII.2	Représentation des données de (phospho)-protéomique quantitative.....	49
	Régulation de la conductivité hydraulique racinaire par des traitements biotiques, abiotiques et nutritionnels.....	50
.I	Mesure du transport d'eau racinaire .....	51
.II	Stress osmotiques .....	52
.II.1	NaCl .....	52
.II.2	Mannitol .....	52
.III	Stress oxydants.....	53
.III.1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	53
.III.2	Oxyde nitrique (NO) .....	53
.IV	Stress biotique .....	55



.V	Stress nutritionnels .....	56
.V.1	Le saccharose .....	56
.V.2	Le nitrate .....	57
.V.3	Le phosphate .....	58
.VI	Discussion .....	59
.VI.1	Stress biotique .....	59
.VI.2	Carence en éléments minéraux.....	60
.VI.3	Carence en éléments carbonés.....	61
	Régulation des aquaporines par des traitements abiotiques et nutritionnels.....	62
.I	Broyage de racines .....	63
.II	Quantification des aquaporines PIPs.....	65
.II.1	Stress osmotique.....	66
.II.2	Stress oxydants.....	66
.II.3	Statut nutritionnel.....	67
.III	Etude de phosphoprotéomique quantitative .....	68
.III.1	Préparation des échantillons.....	68
.III.2	Inventaire des protéines et des MPTs.....	69
.III.3	Inventaires des protéines phosphorylées .....	71
.III.4	Inventaire des autres MPTs .....	72
.III.5	Analyse quantitative .....	73
.IV	Discussion .....	83
.IV.1	Choix méthodologiques.....	83
.IV.2	Approches de quantification.....	83
.V	Un nouveau contexte de dégradation des aquaporines ?.....	85
.VI	Les aquaporines : des protéines très modifiées .....	87
.VI.1	La formylation.....	87
.VI.2	La méthylation.....	87
.VI.3	La déamidation.....	88
.VI.4	La phosphorylation.....	88
.VII	Interaction entre les trois sites de phosphorylation de l'extrémité C-terminale de PIP <sub>2</sub> ;1/2;2/2;3 .....	89
	TIP <sub>2</sub> ;3.....	91
.I	Que savons-nous de TIP <sub>2</sub> ;3 ?.....	92
.I.1	La vacuole et les aquaporines TIPs.....	92



.I.2	Régulation des aquaporines TIPs .....	93
.I.3	TIP2;3 .....	94
.II	Caractérisation moléculaire des lignées invalidées pour <i>TIP2;3</i> .....	95
.III	Rôle de TIP2;3 dans le transport d'eau racinaire .....	96
.III.1	Implication de TIP2;3 dans le transport d'eau racinaire .....	96
.III.2	Régulation de la $Lp_r$ des plantes <i>tip2;3</i> en réponse au stress salin .....	97
.IV	Analyse biochimique .....	98
.IV.1	Sensibilité des plantes TIP2;3-YFP au traitement NaCl .....	98
.IV.2	Localisation sub-cellulaire de TIP2;3 en réponse au traitement NaCl .....	98
.IV.3	Dégradation de la protéine TIP2;3 en réponse au traitement NaCl .....	99
.IV.4	Modification post-traductionnelle de TIP2;3 .....	100
.V	Discussion .....	101
	Discussion générale .....	103
	Conclusions et perspectives .....	107
.VI	Perspectives à court terme .....	110
.VII	Perspectives à moyen terme .....	111
.VII.1	Etudier l'effet d'un autre stress biotique sur la $Lp_r$ .....	111
.VII.2	Comprendre l'effet du fer et du NO sur l'abondance des aquaporines PIP ...	111
.VII.3	Les MPTs des aquaporines .....	111
.VII.4	Rôle des aquaporines TIPS dans la $Lp_r$ .....	112
	Références bibliographiques .....	114



# **INTRODUCTION**

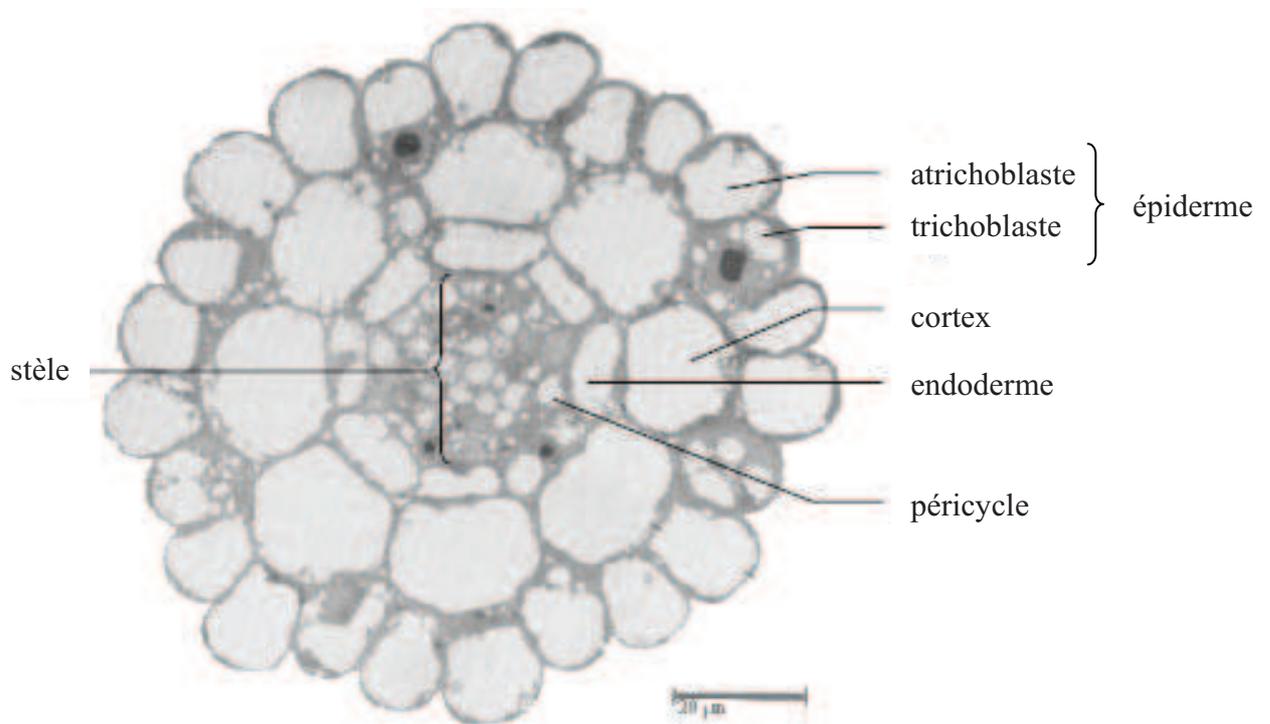


Figure 1 : Coupe transversale d'une racine d'Arabidopsis.

Photographie obtenue en microscopie à transmission illustrant la structure simple de la racine d'Arabidopsis. On notera la présence d'une seule couche de cellules par tissu et l'absence de structure secondaire.

Dans un contexte où la demande en matière première agricole est en augmentation constante et rapide et où les surfaces agricoles cultivables viennent à être limitantes, réunir les conditions adéquates pour la culture des plantes d'intérêt agronomique est un enjeu majeur. En effet, une agriculture durable requiert une utilisation raisonnée des produits phytosanitaires et une utilisation parcimonieuse de la ressource en eau qui peut dans certains environnements s'avérer restreinte. Les plantes sont des organismes sessiles qui ne peuvent pas échapper à leur environnement et leur croissance est sensible aux conditions de cultures ainsi qu'aux stress qu'elles subissent, ce qui conditionne leurs rendements. Elles ont donc développé de nombreuses stratégies adaptatives pour faire face à ces contraintes environnementales. La plupart des contraintes partagent des effets et des réponses communes comme la réduction de la croissance et de la photosynthèse, des dommages oxydatifs, des changements hormonaux et l'accumulation de protéines de stress. Ces changements sont souvent le résultat de la déshydratation des tissus [1], qui s'opère à cause de l'installation d'un déséquilibre entre l'absorption racinaire d'eau et la transpiration foliaire [2]. Leur capacité à percevoir et à répondre à de multiples signaux biotiques et abiotiques font des racines un tissu essentiel pour l'adaptation des plantes aux contraintes environnementales. L'absorption de l'eau du sol par les racines étant un processus central du maintien du statut hydrique des plantes, la régulation du transport d'eau racinaire en réponse à un environnement fluctuant fait l'objet de recherches intensives.

## **.I LE TRANSPORT D'EAU DANS LA RACINE**

Les plantes supérieures sont composées d'organes reproducteurs, les fleurs, et végétatifs, la tige, les feuilles et les racines. De façon simplifiée, c'est au sein des feuilles que se produit la photosynthèse, mécanisme permettant la fixation du dioxyde de carbone et le rejet du dioxygène. La tige permet le port érigé de la plante. Elle porte les bourgeons et les fleurs et fait le lien entre les feuilles et les racines. Enfin, les racines ont un rôle d'ancrage et de nutrition puisque c'est à leur niveau que les nutriments et l'eau du sol sont prélevés.

### **.I.1 Anatomie de la racine**

Les racines présentent deux niveaux d'organisation. D'un point de vue transversal, leurs cellules sont organisées de manière concentrique (figure 1). Chez *Arabidopsis thaliana*, la structure de la racine est simple car elle présente une couche de chaque type cellulaire. La couche la plus extérieure est l'épiderme puis viennent les cellules du cortex. Enfin, les cellules de l'endoderme délimitent le cylindre central au sein duquel se trouvent les vaisseaux du

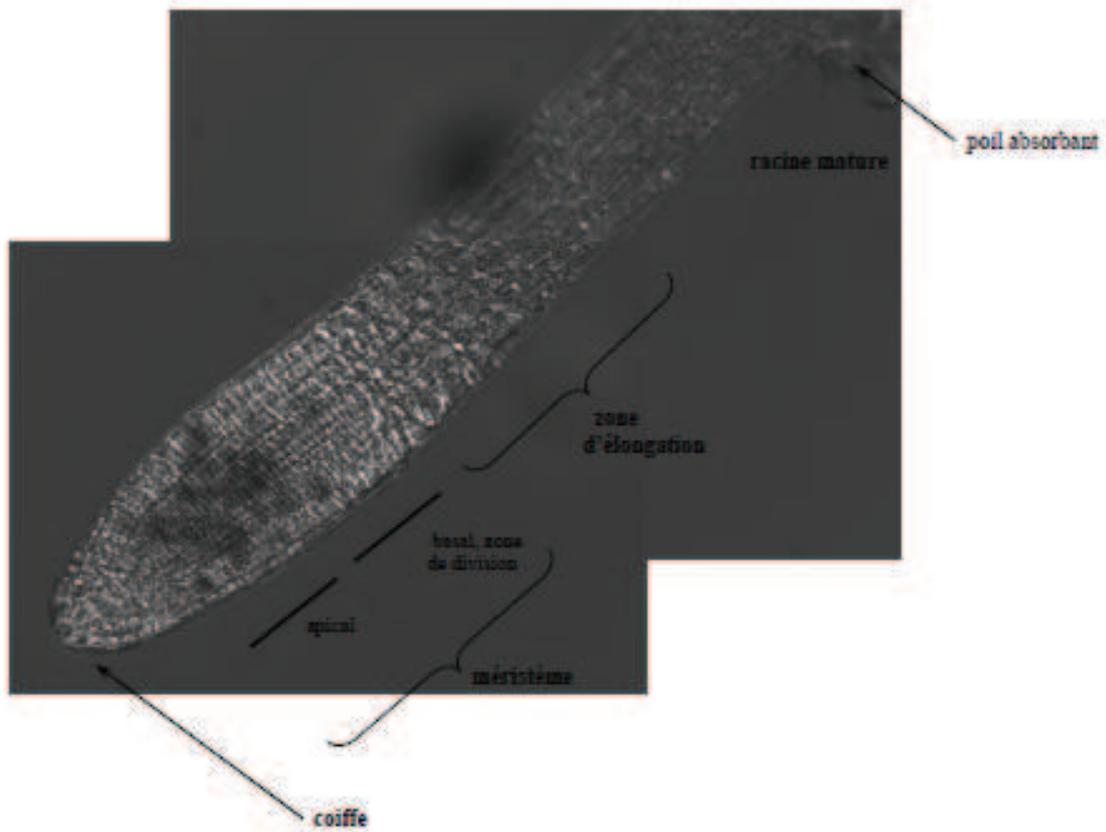


Figure 2 : Structure de la racine.

Photographie obtenue en microscopie optique d'une extrémité de la racine mettant en évidence différentes zones : la coiffe, le méristème apical qui comprend une zone de cellules quiescentes, le méristème basal dont les cellules sont en division, une zone d'élongation cellulaire et enfin la zone mature de la racine dont certaines cellules épidermiques sont différenciées en trichoblastes ou poils absorbants (photographies Bertrand Muller).

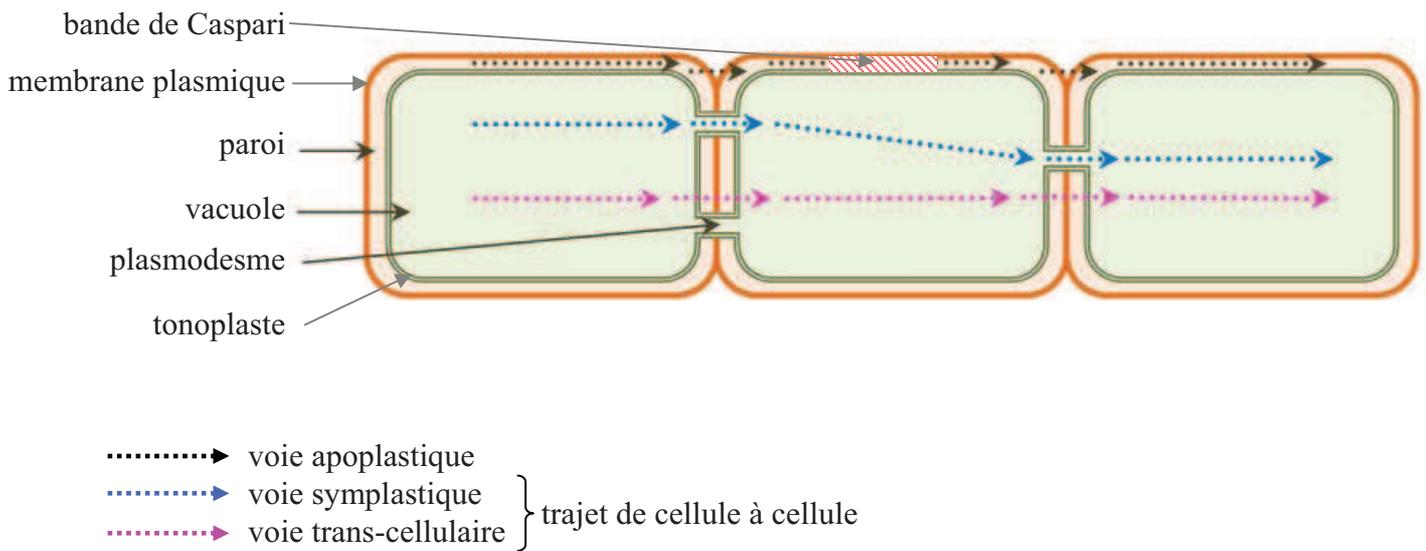


Figure 3 : Trajet radial de l'eau et des éléments minéraux au travers de la racine.

Coupe longitudinale schématique de racine représentant les trois voies pour le trajet radial de l'eau et des éléments minéraux, de la solution du sol vers les vaisseaux du xylème. La voie apoplastique est définie par un continuum de parois. La voie trans-cellulaire, *via* les membranes et parois, ainsi que la voie symplastique au travers du continuum de cytoplasme, sont regroupées au sein du trajet dit "de cellule à cellule".



xylème et du phloème. D'un point de vue longitudinal, la racine est divisée en trois zones principales (figure 2). La coiffe racinaire protège le méristème apical où se déroulent les divisions cellulaires qui permettent la croissance de la racine. Les cellules qui en dérivent s'allongent dans la zone d'élongation qui s'étend sur quelques millimètres ou au plus quelques centimètres en arrière de l'apex. Au-delà se trouve la zone de maturation au niveau de laquelle les cellules se différencient en poils absorbants par exemple. Ils représentent le lieu principal d'absorption de l'eau et des éléments minéraux du sol.

### **.I.2 Relation entre morphologie et fonction racinaire**

Le transport hydrique racinaire est divisé en deux composantes. D'une part, le transport axial consiste en des mouvements d'eau le long des vaisseaux du xylème vers les parties aériennes. D'autre part, le transport radial, de la solution du sol vers les vaisseaux du xylème, implique trois voies [3] : la voie apoplastique par laquelle l'eau traverse la paroi cellulaire et les espaces intercellulaires, la voie symplasmique qui comprend les mouvements d'eau *via* les plasmodesmes et le cytoplasme, et la voie transcellulaire dans laquelle l'eau traverse les membranes cellulaires (figure 3). Les deux dernières voies ne pouvant pas être empiriquement différenciées, la somme des deux est appelée la voie de cellule à cellule [3]. Cette dernière fait intervenir des canaux à eau, ou aquaporines et représente la part majoritaire du transport hydrique racinaire.

Le rôle nutritionnel de la racine nécessite une bonne capacité d'absorption des éléments nutritionnels du sol. L'architecture racinaire est déterminée en grande partie par cette fonction car elle peut permettre l'exploration optimale du substrat en créant une surface d'échange importante [4]. Classiquement, la taille des racines augmente significativement en réponse à une carence. Cela permet d'accéder à de nouvelles sources nutritionnelles mais aussi d'augmenter de façon significative la surface de prélèvement de la racine. Par exemple, en réponse à une carence en phosphate, la croissance longitudinale de la racine est inhibée au profit de sa croissance latérale (pour revue [5]), favorisant l'exploration par la racine d'une plus grande surface de sol à la recherche de phosphate. Une carence en azote favorise préférentiellement la croissance des racines latérales [4]. De nombreuses espèces de plantes sont mycorhizées : leur appareil racinaire est en contact étroit avec un champignon dont les hyphes pénètrent rapidement dans le sol et en explorent un volume important. En condition de stress hydrique, l'interaction symbiotique avec un champignon ectomycorhizien résistant à la sécheresse représente un avantage adaptatif pour les plantes qui peuvent survivre plus longtemps à ce stress. Les hyphes du champignon forment un capuchon autour des apex

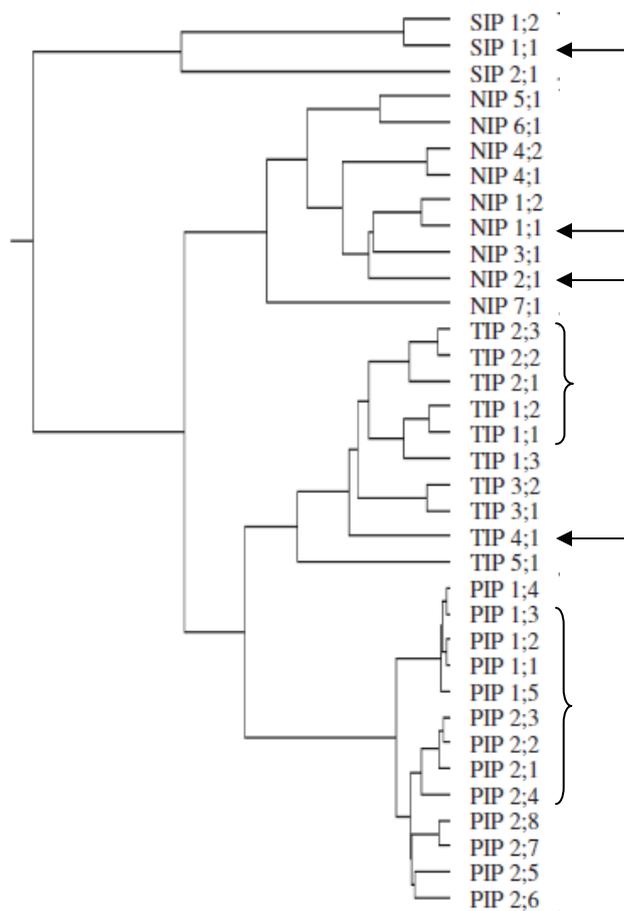


Figure 4 : Classification des 35 MIPs d'Arabidopsis.

Cette classification est réalisée sur la base d'une comparaison des séquences protéiques. Les quatre sous-familles PIP, TIP, NIP et SIP sont présentées (d'après [240]). Les flèches et accolades ciblent les isoformes prédites comme exprimées dans la racine (eFP Browser).

racinaires, protégeant ces zones sensibles du sol, augmentant la surface d'échange avec le sol et promouvant ainsi l'absorption d'eau [6]. De plus, un dialogue fin existe à l'interface entre la plante et le champignon pour déterminer les propriétés de transport d'eau de chacun des partenaires [7].

En plus de l'augmentation des surfaces de prélèvements, une autre adaptation de la racines aux carences est l'augmentation de sa capacité d'absorption grâce à l'activation de systèmes de transport, aux niveaux transcriptionnels et post-traductionnels [8, 9].

### **.I.3 La conductivité hydraulique racinaire**

La teneur en eau d'un organisme végétal est finement régulée. La majeure partie du volume d'eau absorbé par la plante est perdue par transpiration au niveau des stomates. Malgré ces pertes importantes qui peuvent représenter plusieurs fois la quantité totale en eau de la plante par jour, la teneur en eau d'une plante est un paramètre finement régulé. Une faible diminution de cette teneur peut induire une perte de turgescence des cellules, un flétrissement des feuilles et à terme à la mort du végétal. La perte en eau au niveau des stomates au cours de la transpiration est compensée par l'absorption de l'eau au niveau des racines. Le moteur du flux d'eau ( $J_v$ ) est la différence de potentiel hydrique entre le sol et le xylème ( $\Delta\Psi$ ). Ces deux paramètres sont liés par la relation  $J_v = S.Lp_r.\Delta\Psi$ , où  $S.Lp_r$  représente la conductance hydraulique racinaire ( $L_0$ ) avec  $S$  ( $m^2$ ) qui est la surface d'échange entre le sol et la plante, c'est-à-dire la surface racinaire, et  $Lp_r$  ( $mL.g^{-1}.h^{-1}.MPa^{-1}$ ) qui est la conductivité hydraulique racinaire. La  $L_0$  traduit la capacité globale de la racine à transporter l'eau. En rapportant cette conductance à la surface racinaire, on obtient la  $Lp_r$  qui traduit la facilité avec laquelle l'eau circule à travers un segment élémentaire de racine. Dans cette relation,  $\Delta\Psi$  et la  $Lp_r$  sont modulables par la plante avant toute modification d'architecture racinaire et donc de surface. La régulation de la  $Lp_r$  apparaît au travers de nombreuses études comme un élément central de la relation hydrique entre la plante et le sol [3, 10] (voir partie IV).

## **.II LES AQUAPORINES**

### **.II.1 Une sous-famille multigénique**

Les aquaporines forment la famille multigénique des Major Intrinsic Proteins (MIP), protéines identifiées initialement du fait de leur abondance dans les membranes cellulaires. Un nombre important de gènes MIP a été identifié chez les plantes : par exemple, il en existe 35 chez *Arabidopsis* [11] (figure 4), 31 chez le maïs (*Zea mays*, [12]) et 33 chez le riz (*Oryza sativa*, [13]). Une comparaison des séquences en acides aminés et des études de phylogénie révèlent

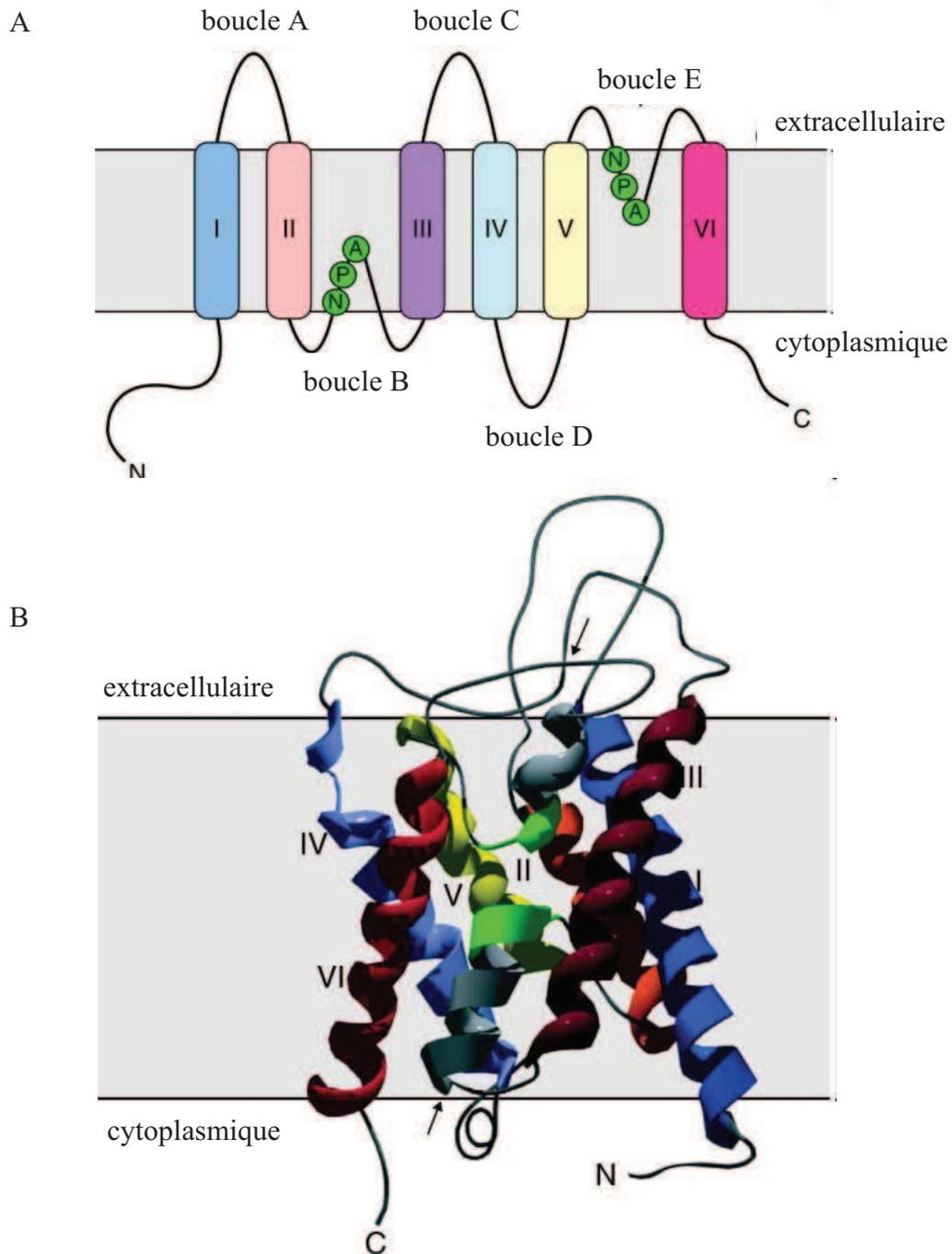


Figure 5 : Structure des aquaporines.

(A) Topologie d'une aquaporine dans une membrane. La protéine est composée de six hélices trans-membranaires (I-VI) reliées par cinq boucles (A-E) et inclut deux motifs de type hélice-hélice-NPA-hélice, en tandem (respectivement I-III et IV-VI). Les boucles B et E contiennent le motif conservé NPA. Les extrémités N- et C-terminales (respectivement N et C sur le schéma) baignent dans le cytoplasme (adapté de [18]).

(B) Structure tri-dimensionnelle d'un monomère de l'aquaporine *NtAQP1* du tabac. La structure présente les six hélices trans-membranaires (I-VI) et les domaines formant les deux pores (flèches). Les domaines NPA sont indiqués en vert (adapté de [18]).

que les MIPs se subdivisent en quatre sous-familles majeures qui sont les PIPs (Plasma membrane Intrinsic Proteins), les TIPs (Tonoplast Intrinsic Proteins), les NIPs (Nodulin26-like Intrinsic Proteins) et les SIPs (Small basic Intrinsic Proteins). Trois sous-familles ont été récemment identifiées chez la mousse *Physcomitrella patens* : les GIPs, pour GlpF-like Intrinsic Proteins, sont homologues des transporteurs bactériens de glycérol [14], les HIPs, pour Hybrid Intrinsic Proteins, et les XIPs, pour Uncharacterised Intrinsic Proteins [15]. Seules les XIPs sont identifiées chez certaines dicotylédones, mais pas chez *Arabidopsis* ni chez le maïs [15]. Chez *Arabidopsis*, on dénombre 13 PIPs qui sont prédominantes à la membrane plasmique, 10 TIPs dont certaines sont localisées au niveau des vacuoles lytiques ou de stockage, 9 NIPs localisées au niveau du réticulum endoplasmique ou de la membrane plasmique et 3 SIPs localisées au niveau du réticulum endoplasmique (pour revue [16]). Au niveau de la plante entière, les aquaporines ont un profil d'expression complexe, certaines étant exprimées dans tous les organes et d'autres étant exprimées spécifiquement dans certains tissus ou à certains stades de développement [16]. D'après la base de données eFP browser (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) 17 aquaporines sont exprimées dans la racine de plantules d'*Arabidopsis* (figure 4).

## **.II.2 Structure et spécificité de substrat**

L'analyse de séquence primaire indique que la plupart des MIPs sont de petites protéines hydrophobes de 25 à 34 kDa [17] comportant une organisation symétrique typique due à une duplication génique précoce. Les aquaporines possèdent six hélices trans-membranaires (numérotées de 1 à 6) et cinq boucles (notées A à E) et les extrémités N- et C-terminales sont cytoplasmiques (figure 5 [18]). Une partie des boucles B et E, contenant un motif Asn-Pro-Ala (NPA) très conservé chez les aquaporines, est enchassée dans la membrane par le repliement de boucles au milieu des hélices transmembranaires [19, 20]. Cet agencement provoque la formation d'un pore en forme de sablier qui est responsable du passage des molécules au travers de la membrane. Des structures obtenues par microscopie cryo-électronique et par rayons X indiquent que comme dans le cas des aquaporines animales et microbiennes, les PIPs et les TIPs sont organisées en tétramères dans leur membrane native [21-23], chaque monomère délimitant un pore individuel. La spécificité de substrat des aquaporines peut s'expliquer par différents mécanismes incluant une exclusion de taille au niveau de deux zones majeures de constriction du pore [22]. Les bases moléculaires de la sélectivité des aquaporines végétales ont été évaluées par des analyses de modélisation de la structure des pores à l'une de ces zones de constriction [23] : alors que les PIPs montrent une



structure étroite de pore typique d'un transport spécifique d'eau, une spécificité de substrats plus gros est prédite pour d'autres aquaporines végétales comme certaines NIPs [24]. Des approches fonctionnelles menées en ovocytes de xénope ont montré que des aquaporines de chaque sous-famille fonctionnent comme des canaux à eau (pour revue [16]). Ces mêmes types d'approches ont permis de montrer que certaines aquaporines peuvent transporter du glycérol [25], de l'urée [26], du formamide et de l'acétamide [27], du méthylammonium [28], de l'acide borique [29], lactique [30] ou silicique [31]. D'autres approches, telles que l'expression d'aquaporines en levure, ont montré que certaines peuvent transporter de l'ammonium [28], du CO<sub>2</sub> [32] ou encore de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [33].

### **.II.3 Mécanismes moléculaires de régulation : modifications co- et post-traductionnelles**

En raison de leur forte abondance dans les membranes et malgré leur degré élevé d'hydrophobicité, des approches biochimiques ont permis de caractériser certaines aquaporines [34-36]. Des études protéomiques et en particulier l'utilisation de techniques de spectrométrie de masse (MS) ont permis de décrire précisément certaines des modifications portées par les aquaporines [37-39].

Ainsi, la maturation de l'extrémité N-terminale des aquaporines PIPs se manifeste par l'acétylation de la méthionine initiatrice dans le cas des PIP1s et par le clivage de cette même méthionine chez les PIP2s [38]. Les modifications de l'extrémité N-terminale jouent un rôle sur le destin des protéines en conditionnant leur activité, leur stabilité ou même leur localisation subcellulaire [40, 41]. Cependant dans le cas des aquaporines, leur rôle est inconnu.

Des études de marquage *in vivo* et *in vitro*, des expériences utilisant des anticorps anti-phosphopeptides et des études par MS ont démontré l'existence de résidus sérines et thréonines phosphorylés sur les extrémités N- et C-terminales d'aquaporines de différentes sous-familles [36, 37, 39, 42-60]. Un résidu phosphorylé est aussi prédit sur la boucle B des PIPs mais n'a toujours pas été identifié par MS [61, 62]. Les aquaporines PIP2s se caractérisent par la présence de multiples phosphorylations adjacentes et interdépendantes sur leur extrémité C-terminale [54]. La base de données PhosPhAt (<http://phosphat.mpimp-golm.mpg.de/>) répertorie l'ensemble des données de phosphorylation expérimentalement déterminées par MS sur les protéines d'*Arabidopsis*. Le tableau 1 résume les phosphorylations décrites dans le cas des aquaporines végétales. Des expériences d'expression hétérologue en ovocytes de xénope exprimant des formes sauvages ou mutées sur des sites de phosphorylation, ainsi que l'utilisation d'outils pharmacologiques altérant l'activité de kinases

**Tableau 1:** Liste des aquaporines de plantes présentant des sites de phosphorylation identifiés expérimentalement

Protéines	Séquences	n_ph	Références
<i>AtNIP1</i> ;2/1;2	<sup>281</sup> SG <u>S</u> FLK <sup>286</sup>	1	[51, 52]
<i>AtPIP1</i> ;5	<sup>176</sup> GSGLGAEIVGTFVLVYTVFSATDAK <sup>200</sup>	2*	[52]
<i>AtPIP2</i> ;1/2;2/2;3	<sup>277</sup> SLGS <u>S</u> FR <sup>282</sup>	1	[37, 51, 52]
<i>AtPIP2</i> ;1/2;2/2;3	<sup>277</sup> SLGS <u>S</u> FRSAANV <sup>287</sup>	1	[54]
<i>AtPIP2</i> ;1/2;2/2;3	<sup>277</sup> SLGS <u>S</u> FR <u>S</u> AANV <sup>287</sup>	2	[45, 46, 49, 51, 54, 56, 59, 220]
<i>AtPIP2</i> ;1/2;2/2;3	<sup>272</sup> ASGSKSLGS <u>S</u> FR <u>S</u> AANV <sup>287</sup>	2	[45]
<i>AtPIP2</i> ;4	<sup>277</sup> ALGSFGSFG <u>S</u> FR <sup>288</sup>	1	[57, 59]
<i>AtPIP2</i> ;4	<sup>277</sup> ALGS <u>S</u> FG <u>S</u> FGSFR <sup>288</sup>	2	PhosphAt
<i>AtPIP2</i> ;4	<sup>277</sup> ALGS <u>S</u> FGSFGSFRSFA <sup>291</sup>	1	[54, 56, 57]
<i>AtPIP2</i> ;4	<sup>277</sup> ALGS <u>S</u> FG <u>S</u> FGSFRSFA <sup>291</sup>	2	[54, 56]
<i>AtPIP2</i> ;4	<sup>277</sup> ALGSFGSFGSFRSFA <sup>291</sup>	3*	[54]
<i>AtPIP2</i> ;5	<sup>276</sup> ALGS <u>S</u> FR <u>S</u> QPHV <sup>286</sup>	2	PhosphAt
<i>AtPIP2</i> ;5/2;7	<sup>270</sup> ALGS <u>S</u> FR <sup>275</sup>	1	[53]
<i>AtPIP2</i> ;6	<sup>282</sup> <u>S</u> QLHELHA <sup>289</sup>	1	[51, 58]
<i>AtPIP2</i> ;6	<sup>276</sup> AYGSVRS <u>S</u> QLHELHA <sup>289</sup>	1*	[49]
<i>AtPIP2</i> ;6	<sup>4</sup> DELTEEESLSGK <sup>15</sup>	1*	[58]
<i>AtPIP2</i> ;6	<sup>2</sup> TKDELTEEESLSGK <sup>15</sup>	1*	[51, 58, 220]
<i>AtPIP2</i> ;6	<sup>2</sup> TKDELTEEESLSGK <sup>15</sup>	2*	[58]
<i>AtPIP2</i> ;6	<sup>2</sup> TKDELTEEESLSGKDYLDP <u>P</u> <u>P</u> <u>P</u> VK <sup>24</sup>	1*	[58]
<i>AtPIP2</i> ;6	<sup>2</sup> TKDELTEEESLSGKDYLDP <u>P</u> <u>P</u> <u>P</u> VK <sup>24</sup>	2*	[58]
<i>AtPIP2</i> ;7	<sup>4</sup> EV <u>S</u> EEGK <sup>10</sup>	1	[45]
<i>AtPIP2</i> ;7	<sup>270</sup> ALGS <u>S</u> FRSNATN <sup>280</sup>	1	[45, 54, 58, 220]
<i>AtPIP2</i> ;7	<sup>270</sup> ALGS <u>S</u> FR <u>S</u> NATN <sup>280</sup>	2	[45, 46, 49, 53, 54, 58, 59, 220]
<i>AtPIP2</i> ;7	<sup>270</sup> ALGS <u>S</u> FRSNATN <sup>280</sup>	3	[52]
<i>AtPIP2</i> ;7	<sup>265</sup> ASAIKALGS <u>S</u> FR <sup>275</sup>	1	[58]
<i>AtPIP2</i> ;7	<sup>265</sup> ASAIKALGSFRSNATN <sup>280</sup>	2*	[58]
<i>AtPIP2</i> ;8	<sup>268</sup> ALAS <u>S</u> FR <u>S</u> NPTN <sup>278</sup>	2	[58, 59, 220]
<i>AtPIP2</i> ;8	<sup>268</sup> ALAS <u>S</u> FR <u>S</u> NPTN <sup>278</sup>	3	[54]

<i>At</i> NIP1;2	<sup>284</sup> SG <u>S</u> FLK <sup>289</sup>	1	[45, 51]
<i>Hv</i> $\gamma$ -TIP like	<sup>6</sup> IAVG <u>S</u> HR <sup>12</sup>	1	[60]
<i>Hv</i> $\gamma$ -TIP like	<sup>6</sup> IAVG <u>S</u> HREVVYEVGALK <sup>21</sup>	1	[60]
<i>Hv</i> $\gamma$ -TIP like	<sup>241</sup> THEQLPTTDY <sup>250</sup>	1	[60]
<i>Os</i> PIP2;1	<sup>284</sup> ALGSFR <u>S</u> NA <sup>292</sup>	1	[49]
<i>Os</i> PIP2;1	GKDEVME <u>S</u> GGGAAGEFAAK	1	[49]
<i>Os</i> PIP2;6	<sup>284</sup> ALGSFR <u>S</u> NPSN <sup>294</sup>	1	[49]
<i>Os</i> PIP2;6	<sup>284</sup> ALGSFR <u>S</u> NPSN <sup>294</sup>	2	[49]
<i>Os</i> PIP2;7	<sup>284</sup> ALSSFRSTSVTA <sup>285</sup>	1*	[49]
<i>Pv</i> TIP3;1	<sup>2</sup> ATRRY <u>S</u> FGRTDEATHPDSM <sup>20</sup>	1	[21]
Soybean Nod 26	ITKSAS <u>S</u> FLK	1	[43, 48]
<i>So</i> PIP2;1	<sup>271</sup> ALGSFR <u>S</u> NPTN <sup>281</sup>	1	[36]
<i>So</i> PIP2;1	<sup>271</sup> ALGSFR <u>S</u> NPTN <sup>281</sup>	2	[36]
<i>Zm</i> PIP2;1/2;2/2;7	ALGS <u>S</u> FR	1	[55]
<i>Zm</i> PIP2;1/2;2/2;7	ALGS <u>S</u> FRSNA	1	[55]
<i>Zm</i> PIP2;1/2;2/2;7	ALGS <u>S</u> FRSNA	2	[55]
<i>Zm</i> PIP2;3/2;4	ASATKL <u>G</u> SYR	1	[55]
<i>Zm</i> PIP2;6	GYGS <u>S</u> FRSNA	1	[55]
<i>Zm</i> PIP1;1à1;4	<sup>10</sup> LGANKF <u>S</u> ER <sup>18</sup>	1	[55]

La première colonne décrit le nom de l'aquaporine, la deuxième la séquence du peptide et la troisième le nombre de sites de phosphorylation identifiés sur le peptide. L'identification des sites de phosphorylation a été réalisée par MS sauf dans le cas de l'aquaporine NOD26 de soja.

S, sérine phosphorylée; T, thréonine phosphorylée. \*, la position du ou des site(s) de phosphorylation est ambiguë. La mention PhosphAt signifie que le site de phosphorylation est répertorié dans la base de données PhosphAt mais que la référence bibliographique correspondante n'est pas spécifiée.



et de phosphatases, ont montré l'importance de la phosphorylation dans le gating, c'est-à-dire le degré d'ouverture et de fermeture du pore [36, 48, 63]. Par ailleurs, de récentes études ont démontré que la fonction des aquaporines dépend de leur trafic cellulaire. Par exemple, l'incapacité des aquaporines PIP1s à être actives après expression hétérologue en ovocytes de xénope peut s'expliquer par un défaut d'adressage de ces aquaporines à la membrane de l'ovocyte, pouvant être remédiée par la co-expression de PIP1s avec une isoforme de la sous-famille PIP2 [64]. Des résultats d'imagerie confocale dans des protoplastes de maïs co-exprimant des PIP1s et des PIP2s confortent le modèle selon lequel des isoformes de ces deux sous-familles interagissent entre elles [65]. La phosphorylation des PIP1s a récemment été décrite comme intervenant dans ce processus [62]. Enfin, l'adressage correct de l'aquaporine *AtPIP2;1* à la membrane plasmique dépend en partie de la phosphorylation d'un résidu sérine (S283) [54]. De plus, la relocalisation de l'aquaporine *AtPIP2;1* dans des structures intracellulaires suite à un traitement salin dépend en partie de la phosphorylation de ce même résidu [54]. Un autre mécanisme du trafic cellulaire des aquaporines, récemment décrit chez le maïs et *Arabidopsis*, ne fait pas intervenir la phosphorylation et concerne l'export des PIP2s hors du réticulum endoplasmique [66, 67] : cet export est contrôlé par un motif di-acide situé sur l'extrémité N-terminale des aquaporines de la famille PIP2.

Bien que la plupart des aquaporines végétales ne soient pas glycosylées, cette modification a été observée chez *GmNOD26* [42] et chez *McTIP1;2* [68]. Dans le cas de *McTIP1;2*, la glycosylation est nécessaire à sa relocalisation subcellulaire du tonoplaste vers un compartiment endosomal en réponse à un traitement osmotique (200 mM de mannitol).

Les aquaporines sont les premières protéines membranaires décrites comme étant méthylées [38]. Par exemple, *AtPIP2;1* peut porter un ou deux groupements méthyles sur respectivement le résidu acide glutamique 6 et lysine 3. La méthylation de ces résidus n'est pas impliquée dans le gating d'*AtPIP2;1* [38]. Malgré la caractérisation de deux enzymes impliquées dans la méthylation de ces résidus [69], le rôle de cette modification est encore inconnu.

L'ubiquitination des aquaporines de la famille PIP a récemment été proposée comme une modification permettant de diminuer le taux d'aquaporines à la membrane plasmique suite à l'exposition des plantes à un stress hydrique [70].

L'ensemble de ces données montre qu'à la multiplicité d'isoformes s'ajoute une multiplicité de formes modifiées, suggérant qu'il existe une coordination subtile des différents mécanismes de régulations post-traductionnelles.



#### **.II.4 Expression des aquaporines dans la racine**

Les aquaporines sont détectées dans tous les tissus racinaires incluant le méristème apical racinaire et les primordia des racines latérales, les zones d'élongation et de différenciation. Elles sont également détectées dans toutes les assises cellulaires à savoir dans l'épiderme, le cortex et les tissus vasculaires (pour revue [10]). Des études protéomiques et transcriptomiques ont récemment été développées pour suivre l'expression des aquaporines. Par exemple, des expériences de RT-PCR quantitatives ont été utilisées pour mesurer l'abondance des transcrits d'aquaporines dans différents tissus, organes ou en réponse à des conditions de stress [13, 71-73]. Une cartographie fine de l'expression des gènes d'aquaporines spécifiques de types cellulaires dans la racine de maïs et d'*Arabidopsis* a aussi été menée, sur la base d'un tri cellulaire [74] ou *in situ*, par RT-PCR [72]. Cette dernière étude a permis par exemple, d'identifier chez le maïs deux isoformes majoritairement exprimées : *ZmPIP1;5* et *ZmPIP2;5*, dans des zones différenciées de la racine [72]. L'observation de l'expression polarisée de *PIP2;5* sur le côté périclinal des cellules épidermiques a suggéré un rôle pour cette aquaporine dans l'absorption primaire d'eau. L'analyse par MS de membranes plasmiques purifiées à partir de racines d'*Arabidopsis* a démontré l'expression d'au moins six isoformes PIPs [37].

La variété de profil d'expression des aquaporines est en accord avec le rôle de ces protéines dans des fonctions spécifiques racinaires, comme le transport d'eau radial, mais aussi des fonctions plus générales comme l'expansion cellulaire ou le transport de la sève dans et hors des tissus vasculaires.

### **.III IMPLICATION DES AQUAPORINES DANS LA *Lp<sub>r</sub>***

L'activité cytotoxique du mercure est liée à sa grande affinité pour le soufre, entraînant le blocage des fonctions thiol (-SH) des protéines. Ainsi, en se fixant sur les cystéines, le mercure peut inhiber les aquaporines [10]. La signification et les limitations de l'utilisation du mercure sont discutées en détails dans la revue rédigée par Javot et ses collaborateurs [10]. Il est important de noter que ce composé peut réagir avec tous les résidus cystéines exposés de toutes les protéines cellulaires et peut donc engendrer des effets toxiques graves au niveau de la cellule. Ces effets collatéraux se traduisent par une inhibition métabolique générale pouvant avoir un impact fort sur les propriétés de transport d'eau et de solutés. Il est important de vérifier que les effets primaires du mercure sont relayés par l'oxydation de composants cellulaires (en particulier les aquaporines) et peuvent être réversés par des agents réducteurs (DTT ou mercaptoéthanol). Ce contrôle n'est cependant pas systématiquement utilisé dans



toutes les études. Brièvement, les effets du mercure ont été testés sur le transport d'eau racinaire dans plus de dix espèces végétales. Bien qu'il existe des différences dans la dose de mercure appliquée (de  $10^{-6}$  à  $10^{-3}$  M) et dans la durée du traitement (10 min à quelques heures) toutes les études décrivent une inhibition du transport d'eau racinaire. Par exemple, le mercure inhibe de 57 % la  $L_p_r$  de la tomate (*Lycopersicon esculentum*) [75], de 66 % celle du blé tendre (*Triticum aestivum*) [76] et du poivron (*Capsicum annuum*) [77], de 90 % celle de l'orge (*Hordeum vulgare*) [78], de 80 % celle de la betterave à sucre (*Beta vulgaris*) [79], de 32 % celle de *Opuntia acanthocarpa* (Cactée) [80], de 57 à 84 % celle de l'oignon (*Allium cepa*) [81], de 80 % celle du melon (*Cucumis melo*) [82] et de 50 % celle d'Arabidopsis [83]. Malgré les effets secondaires provoqués par sa toxicité [10], l'utilisation de cet inhibiteur a donc permis de montrer que le transport d'eau racinaire par la voie transcellulaire est une voie majeure [75].

Face au manque d'inhibiteurs spécifiques des aquaporines, les approches de génétique inverse représentent une approche centrale dans l'étude de la fonction physiologique des aquaporines. Des approches d'inhibition de l'expression des aquaporines PIPs par une stratégie anti-sens chez Arabidopsis et le tabac (*Nicotiana Tabacum*) ont montré l'importance de ces aquaporines dans le transport d'eau racinaire. Par exemple chez le tabac, les plantes exprimant un transgène anti-sens de *NtAQPI* présentent une inhibition de  $L_p_r$  de 42 % [84]. Les équipes de R. Kaldenhoff (1998) et de P. Martre (2002) ont observé que l'extinction de l'expression des aquaporines PIPs par une approche anti-sens chez Arabidopsis provoque une augmentation d'un facteur 2 à 5 de la masse racinaire [85, 86]. La réduction de perméabilité à l'eau de la membrane plasmique des cellules racinaires serait donc compensée dans cette situation par une augmentation de la taille du système racinaire.

La contribution d'aquaporine individuelle dans le transport d'eau racinaire a aussi été évaluée par l'étude de mutants individuels d'aquaporines. Cette approche a montré que l'aquaporine *AtPIP2;2* contribue à hauteur de 25 % à la conductivité hydraulique des cellules corticales [87]. De plus, l'osmolarité de la sève est plus élevée chez ce mutant suggérant un rôle de *AtPIP2;2* dans le transport osmotique [87]. Cette dernière fonction est à relier à l'expression préférentielle de cette aquaporine dans les tissus internes de la racine. Une autre étude a récemment montré que l'extinction du gène *AtPIP1;2* réduit de 20 à 30 % la  $L_p_r$  sans modifier le transport osmotique [88]. D'autre part, en sur-exprimant une aquaporine PIP d'orge dans le riz, l'équipe de T. Katsuhara a mesuré une augmentation de la  $L_p_r$  de 140 % [89]. Cependant des précautions doivent être prises dans l'interprétation physiologique des changements induits par l'expression ectopique d'une aquaporine dans une autre espèce



végétale, car des acteurs moléculaires de la régulation de cette aquaporine peuvent être absents. Une stratégie plus fiable est celle décrite par H.L. Lian et ses collaborateurs qui ont sur-exprimé une aquaporine de la famille des PIP1s de riz dans le riz, le transgène étant placé sous le contrôle d'un promoteur induit par le stress [90]. De façon logique, la  $Lp_r$  était similaire en conditions contrôles chez les plantes sauvages et mutantes, alors qu'en conditions de stress, la  $Lp_r$  était supérieure de 25 % chez les plantes mutantes.

La majeure partie des études considère les aquaporines de la famille des PIPs comme majoritairement responsables de la  $Lp_r$ . Cependant, quelques rares études et notamment celles traitant de la réponse au stress salin, révèlent un rôle potentiel des aquaporines de la famille des TIPs [91-93]. En effet, en cas de stress salin, le rôle des aquaporines TIPs pourrait être d'équilibrer le potentiel osmotique du cytoplasme en échangeant de l'eau avec la vacuole. Des études ont montré qu'en condition de sécheresse ou de stress salin, la sur-expression d'aquaporines TIPs peut modifier la réponse de la plante au stress en augmentant leur résistance [91, 92] ou en augmentant leur sensibilité [93]. Cette apparente contradiction pourrait s'expliquer par le fait que différentes isoformes TIPs ont été sur-exprimées. Les aquaporines TIPs pourraient donc participer au transport d'eau racinaire et à sa régulation par des contraintes environnementales.

#### **.IV REGULATION DE LA $Lp_r$ ET DES AQUAPORINES**

La capacité des plantes à ajuster leurs propriétés de transport d'eau racinaire durant leur développement ou en réponse à des stimuli environnementaux a suscité l'attention de nombreux physiologistes. Les adaptations au long terme peuvent en grande partie s'expliquer par des changements morphologiques, comme les changements d'architecture racinaire ou encore la différenciation de types cellulaires. Par exemple, la sécheresse induit le développement des bandes de Caspari et de subérine dans l'exoderme et l'endoderme [94]. Il apparaît cependant maintenant que la régulation des aquaporines contribue aussi de façon significative à la régulation de la perméabilité de la racine à l'eau. La caractérisation des effets à court-terme sur le transport d'eau racinaire des hormones et des contraintes environnementales permet maintenant de dissocier les effets sur la régulation des aquaporines, des changements morphologiques plus lents.

##### **.IV.1 Les hormones**

L'acide salicylique (AS) est une molécule de signalisation initialement reliée à la défense des plantes contre des attaques pathogènes et plus récemment décrite comme répondant à



différents stress abiotiques [95, 96]. L'AS a été décrit comme impliqué dans les mouvements de stomates [97] et plus récemment, la découverte de son rôle de régulateur de la  $Lp_r$  a contribué à mieux décrire son rôle dans les relations hydriques [98]. Une étude menée chez le maïs a montré que l'AS inhibe la voie symplastique de transport d'eau [99]. L'AS induit l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ou ROS pour Reactive Oxygen Species) dans différents tissus dont les racines [97, 98] et induit à leur niveau des effets similaires à ceux induits par l'application exogène d' $H_2O_2$  (voir paragraphe IV.4). L'application de 0,5 mM d'AS inhibe la  $Lp_r$  d'*Arabidopsis* d'environ 35 % et induit l'accumulation intracellulaire de PIPs, ces deux effets étant en partie contrecarrés par l'addition de catalase, enzyme de détoxification des ROS [98].

L'acide abscissique (ABA) est une phytohormone découverte dans les années 1960 et initialement impliquée dans l'abscission des feuilles et la dormance des bourgeons. Aujourd'hui, l'ABA est considéré comme un composant clé de l'adaptation des végétaux aux stress abiotiques, notamment à la sécheresse et au stress salin. L'ABA modifie les propriétés hydrauliques de la racine : il peut stimuler la  $Lp_r$  [100-104], l'inhiber [105] ou n'avoir aucun effet [106]. Cette hormone est accumulée dans les cellules racinaires suite à des stress tels que la sécheresse [107], l'anoxie (inondation des sols) [108], le sel [109] ou les basses températures [105]. De fait, il est possible que l'ABA régule la  $Lp_r$  en réponse à certaines conditions de stress (pour revue, [110]). D'autre part, il apparaît que l'ABA module l'expression ainsi que l'abondance des aquaporines PIPs dans différentes plantes [73, 102-104]. De plus, une étude phosphoprotéomique quantitative menée sur des jeunes plantules d'*Arabidopsis* a montré que l'ABA diminue l'état de phosphorylation de PIP<sub>2;1/2;2/2;3</sub>, PIP<sub>2;4</sub>, PIP<sub>2;7</sub> et PIP<sub>2;8</sub> dès 5 min de traitement [59]. Sur la base du rôle de la phosphorylation dans le gating de l'aquaporine *SoPIP2;1* [22] et dans la localisation subcellulaire des aquaporines PIP<sub>2;1/2;2/2;3</sub> [54], Kline *et al.* en déduisent que la déphosphorylation de ces aquaporines conduirait à une diminution de leur fonction, ce qui empêcherait la réhydratation des tissus pendant la régulation de la germination et de la dormance par l'ABA et réduirait les flux d'eau racinaire en réponse à la sécheresse [59].

## **.IV.2 Les contraintes environnementales**

### **.IV.2.a La privation d'oxygène**

La privation d'oxygène intervient lors d'inondations ou de compactations du sol. Ce contexte physiologique peut-être mimé en bullant de l'azote au lieu d'air dans la solution baignant les



racines ou en traitant les racines avec un poison respiratoire comme l'azide ou le cyanure. Pour la plupart des plantes, ces traitements induisent une inhibition marquée de la  $L_{p_r}$ . En particulier, dans le cas des racines d'*Arabidopsis*, le traitement hypoxique ou un traitement par 1 mM d'azide pendant 30 min réduisent la  $L_{p_r}$  de respectivement 49 % et 87 % [111]. L'anoxie provoque une acidose cellulaire. Ce mécanisme est dû à une chute de la quantité d'ATP accompagnée d'une augmentation de phosphate inorganique cytosolique qui empêche la  $H^+$ -ATPase d'extruder les protons. Ceci induit la protonation d'un résidu histidine sur la boucle D cytosolique des aquaporines PIP. Cette protonation induit un changement conformationnel de l'aquaporine provoquant sa fermeture [22, 111, 112]. De plus, l'expression des aquaporines PIPs et TIPs est inhibée en conditions anoxiques [113], mais l'expression d'*AtNIP2;1* est induite [30, 113]. Cette dernière aquaporine transporte de l'acide lactique et sa sur-expression pourrait permettre d'évacuer ce produit de fermentation hors des racines et contribuer à réguler le pH cytosolique au cours de stress de longues périodes [30].

#### **.IV.2.b Les stress hydriques**

La régulation du transport d'eau en période de déficit hydrique fait l'objet d'intenses recherches. En effet, un déficit hydrique induit en premier lieu un efflux d'eau qui peut conduire à une chute de turgescence cellulaire pouvant entraîner une plasmolyse cellulaire. Au niveau tissulaire, différents types de travaux montrent que l'inhibition des aquaporines racinaires contribue à l'adaptation des racines à la sécheresse [80, 114]. Les effets de la sécheresse peuvent être mimés en appliquant un choc hyperosmotique à des plantes cultivées en hydroponie [115, 116]. Par exemple, le traitement de jeunes plantes de sorgho (*Sorghum vulgare*) avec une solution de polyéthylène glycol conduisant à un potentiel osmotique de -0,3 MPa réduit la  $L_{p_r}$  de 70 % en 30 à 60 h [116]. La régulation de l'expression des aquaporines PIP en réponse à un stress hydrique a été traitée dans plusieurs études [117]. Chez le riz par exemple, un stress hydrique induit une accumulation des gènes codant les PIPs dans la racine [90]. Des analyses RT-PCR quantitatives ont révélé qu'un traitement hyperosmotique par 250 mM de mannitol pendant 12 h stimule l'expression de certaines isoformes de PIPs (PIP1;3, PIP1;4, PIP2;1, PIP2;5) et diminue celle de PIP1;5, PIP2;2, PIP2;3 et PIP2;4 [73]. Cependant la relation entre les changements d'expression d'aquaporines et la régulation du transport d'eau n'a pas été établie dans ces études. Des plantes mutées dans des gènes d'aquaporines permettent plus facilement d'établir un rôle des aquaporines durant le stress hydrique. Par exemple, l'inhibition par une stratégie anti-sens des gènes de la famille PIP1 chez le tabac et *Arabidopsis* provoque un profond défaut d'adaptation des plantes au



stress hydrique [84, 86]. Dans une approche différente, HL. Lian et ses collaborateurs ont surexprimé dans une variété de riz sensible à la sécheresse, *OsPIP1;3* qui est une aquaporine spécifiquement induite par la sécheresse dans une variété de riz tolérante à ce stress [90]. Cette expérience a permis d'augmenter la résistance à la sécheresse de la première variété de riz.

Au niveau cellulaire, tout stress osmotique nécessite un ajustement de la surface de la membrane plasmique. De récents résultats permettent de corréler ce processus à la régulation de la perméabilité hydrique membranaire [118, 119]. En accord avec ces observations, on constate que certaines aquaporines sont relocalisées dans d'autres compartiments cellulaires en réponse à un stress osmotique. Par exemple, le traitement par 200 mM de mannitol induit une relocalisation de l'aquaporine *McTIP1;2* de *Mesembryanthemum crystallinum* du tonoplaste vers un compartiment endosomal [68]. Ce processus dépend de la glycosylation de cette aquaporine et d'une voie de signalisation dépendant de l'AMPC. Une observation similaire concerne la relocalisation des PIPs dans un compartiment intra-cellulaire en réponse au traitement salin [115] (voir paragraphe suivant).

#### **.IV.2.c Le stress salin**

En diminuant le potentiel hydrique du sol, la salinité peut provoquer une perte d'eau de la plante, menaçant son approvisionnement en eau et perturbant donc son statut hydrique. De plus, l'absorption de sel dans les tissus perturbe l'homéostasie des cellules. L'une des premières réponses des plantes au sel est l'inhibition de leur capacité d'absorption racinaire d'eau. Dans la plupart des plantes incluant le poivron [77], le melon [82], *Arabidopsis* [98], la tomate [120], l'orge [121] et le brocoli (*Brassica oleracea*) [122], le traitement, de quelques heures à quelques jours, par 50 à 100 mM de NaCl réduit la  $L_{p_r}$  de 30 à 75 %. L'hypothèse selon laquelle l'inhibition de la  $L_{p_r}$  par le NaCl pourrait être due à une inhibition des aquaporines a été vérifiée par des études montrant que la  $L_{p_r}$  résiduelle observée après le traitement salin était insensible au mercure [77, 82, 123]. Des études transcriptomiques ont été menées sur différentes plantes pour mesurer les variations d'expression des gènes d'aquaporines en réponse à des traitements par 100 à 150 mM de NaCl sur des périodes allant de l'heure à plusieurs jours. L'exposition à un stress salin de 6 à 24 h chez *Arabidopsis* diminue globalement l'expression des aquaporines alors que des temps de traitement plus longs augmentent l'expression de ces gènes [124]. De manière opposée, le traitement salin chez le maïs, stimule l'expression de trois aquaporines PIP dès 2 h de traitement [125] et chez le brocoli, 15 jours de traitement salin inhibent l'expression des aquaporines PIP [122]. Enfin,



une étude menée sur l'orge a montré que l'expression des aquaporines n'est pas régulée par un traitement salin modéré, mais qu'elle est inhibée par un traitement plus fort de 200 mM [121]. Concernant Arabidopsis, un traitement par 150 mM de NaCl stimule l'expression des gènes d'aquaporines PIPs, sauf PIP1;5 dont l'expression est inhibée, à partir de 4h de traitement [73]. En revanche, une autre étude menée sur Arabidopsis a montré une inhibition de l'expression des gènes d'aquaporines PIPs à partir de 4 h de traitement par 100 mM de NaCl [115]. Cette contradiction peut en partie s'expliquer par l'utilisation de matériels biologiques différents : des plantules âgées de deux semaines cultivées sous agitation et cultivées en présence de saccharose [73] et des plantes cultivées en hydroponie âgées de trois semaines environ [115].

Ces différentes études ne permettent pas, en tant que telles, d'en déduire un mécanisme commun de régulation de l'expression des aquaporines en réponse au traitement salin. Par contre, en combinant à la fois des études de transport d'eau racinaire et de transcriptomique dans le cas d'Arabidopsis, une corrélation a été établie entre l'ampleur de l'inhibition de la  $Lp_r$  et la diminution d'expression de gènes PIP1 [123]. Les mécanismes moléculaires et cellulaires de la baisse rapide de  $Lp_r$  en réponse au stress salin chez Arabidopsis ont été en partie décrits dans les travaux de Y. Boursiac et ses collaborateurs [115]. Une concentration de 100 mM de NaCl induit une inhibition de 70 % de la  $Lp_r$  avec un temps de demi-effet de 45 min. La quantité des transcrits PIPs et TIPs est stable jusqu'à 2 h de traitement et baisse de manière prononcée sur le long terme (4 à 24 h). L'abondance des aquaporines est diminuée après 30 min (PIP1s) ou 24 h (PIP2s et TIP1s) [115]. Une étude de MS quantitative a récemment confirmé la baisse de l'abondance des aquaporines PIPs d'Arabidopsis après 4 h de traitement par 150 mM de NaCl [126]. De plus, des plantes transgéniques exprimant *AtTIP1;1* fusionnée à la GFP ont montré que cette aquaporine est partiellement relocalisée dans des structures sphériques associées à la vacuole [115] appelées *bulbs* [127]. Le marquage de membranes intracellulaires par les protéines fusions GFP-PIP2;1 après 2 à 4 h de traitement par 100 mM de NaCl suggère aussi que l'internalisation des aquaporines PIP pourrait contribuer à la réduction de perméabilité hydrique de la membrane plasmique [54]. De plus, il a été montré que la phosphorylation des aquaporines, en particulier celle d'une sérine (S283) de l'extrémité C-terminale de *AtPIP2;1* interfère avec la relocalisation de cette protéine [54].



#### .IV.2.d L'éclairage et la température

La lumière est un paramètre environnemental agissant à la fois sur la croissance et le développement des plantes, ainsi que, sur des pas de temps plus courts de l'ordre de la journée, sur leur régime métabolique et donc les relations hydriques. Un effet primaire de la lumière est de contrôler l'ouverture stomatique et donc la transpiration. Des variations diurnes de la  $L_{p_r}$  ont été observées chez de nombreuses espèces et une relation a été établie par plusieurs auteurs entre ces fluctuations et la fonction des aquaporines. Par exemple, chez le lotier (*Lotus japonicus*) et le maïs, le transport hydrique racinaire est maximum à la mi-journée et parallèlement l'abondance des transcrits des aquaporines PIP1s et PIP2s augmente [128, 129]. De même, chez le maïs, l'augmentation de la perméabilité hydrique des cellules corticales racinaires est corrélée avec l'augmentation des teneurs en aquaporines *ZmPIP1;2*, *ZmPIP2;1/2;2*, *ZmPIP2;5* et *ZmPIP2;6* [130]. Chez *Mesembryanthemum crystallinum*, des changements d'abondance en aquaporines sont corrélés à des changements de perméabilité hydrique ainsi que des variations d'osmolarité cellulaire [131]. L'ensemble des résultats précédemment décrits ont conduit à l'hypothèse que les changements diurnes d'expression des aquaporines racinaires contribueraient à réguler le transport d'eau racinaire selon la demande en eau de la plante au cours du cycle jour-nuit. Une récente étude menée sur le riz avance une autre hypothèse selon laquelle l'ajustement de la  $L_{p_r}$  pendant la journée serait déclenché par la transpiration et qu'elle serait donc augmentée [132]. Ce dernier processus, combiné à la localisation polarisée d'une aquaporine spécifique (*OsPIP2;5*) contribuerait à ajuster précisément le transport d'eau racinaire radial au cours de la journée.

Le refroidissement des racines réduit la pression hydrostatique racinaire, le flux de sève et la  $L_{p_r}$  en quelques heures seulement [133, 134]. Chez une variété de maïs résistante aux basses températures, la  $L_{p_r}$  est restaurée et même stimulée suite à un traitement par le froid prolongé jusqu'à 3 jours [133]. Chez le maïs et le concombre (*Cucumis sativus*), l'inhibition rapide et réversible de la  $L_{p_r}$  suggère une variation de l'activité des aquaporines [134, 135]. Des approches transcriptomiques menées chez le riz, le maïs et *Arabidopsis* ont montré une diminution de l'abondance des transcrits des aquaporines PIP [133, 134], qui est restaurée 24 h après un retour à des températures standard. L'abondance des transcrits et des protéines n'est pas toujours corrélée [133, 134] suggérant l'implication de modifications post-traductionnelles (MPT). Cependant, la variation de l'abondance des aquaporines PIP2s phosphorylées n'est pas corrélée aux variations de la  $L_{p_r}$  [133]. Le fait que le froid augmente la production d' $H_2O_2$  dans les racines de concombre et que le traitement de ces racines par 2



mM d' $\text{H}_2\text{O}_2$  inhibe d'un facteur 2 la conductivité hydraulique des cellules corticales [135] a conduit à l'idée que le premier effet du froid sur la  $L_{p_r}$  serait en fait une inhibition des aquaporines par l' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Cependant les mécanismes qui sous-tendent cette inhibition ne sont pas connus.

### **.IV.3 Le statut nutritionnel**

La transpiration possède une fonction motrice pour le transport de l'eau et des nutriments depuis les racines vers les parties aériennes. De fortes interactions existent donc entre les statuts hydriques et nutritionnels des plantes [136, 137]. Dans la plupart des études menées sur le blé, le lotier, le sorgho ou le tournesol (*Helianthus annuus*), l'implication des aquaporines dans la réponse à des carences en nitrate ou en phosphate a été démontrée par l'utilisation de mercure lors des mesures de flux hydrique racinaire [76, 116, 136, 138].

#### **.IV.3.a Le nitrate**

Des études menées sur le blé, le lotier, le tournesol, la tomate, le concombre ou le maïs ont montré qu'une carence en nitrate inhibe la  $L_{p_r}$  et qu'une réalimentation en nitrate la stimule, voire restaure la  $L_{p_r}$  initiale [76, 136, 138-141]. Par exemple une carence totale en nitrate de cinq jours inhibe la  $L_{p_r}$  de 90 % chez le lotier et une réalimentation de trois jours permet de restaurer la  $L_{p_r}$  initiale [136]. Chez la tomate, suite à une à deux semaines de carence à 0,2 mM de nitrate, une réalimentation en nitrate stimule la  $L_{p_r}$  de 25 % [140]. Cette stimulation coïncide avec l'inhibition des gènes codant l'assimilation et le transport de nitrate. L'utilisation de tungstate, un inhibiteur de la nitrate réductase, annule la réponse de la  $L_{p_r}$  du concombre à l'application de nitrate et mais pas celle de la tomate. L'analyse du contenu tissulaire en nitrate de ces deux plantes traitées par le tungstate a montré que la tomate a accumulé plus de nitrate que le concombre. Ceci suggère que la concentration cellulaire en nitrate plutôt que les produits dérivés de l'assimilation du nitrate, est responsable de la réponse hydraulique de ces plantes [140].

Une étude transcriptomique menée sur le maïs a montré une stimulation de l'expression de gènes d'aquaporines en réponse à une semaine de carence en nitrate [141]. Une autre étude transcriptomique menée sur la tomate a montré une stimulation de l'expression de gènes d'aquaporines PIPs et TIP2s en réponse à une réalimentation suite à une carence en nitrate de 48 h [142].



### **.IV.3.b Le phosphate**

Une carence totale en phosphate de 12 jours provoque une inhibition de la  $Lp_r$  de 75 % chez des plantes de coton (*Gossypium hirsutum*) [143]. Chez le sorgho, une carence en phosphate inhibe la  $Lp_r$  d'environ 30 % puis une réalimentation stimule ou restaure la  $Lp_r$  initiale lorsqu'elle dure respectivement 7 ou 23 h [116]. Les interactions entre un stress hydrique et une carence en phosphate ont été évaluées chez le sorgho et ont montré que les plantes carencées en phosphate sont plus sensibles au stress hydrique que les plantes normalement alimentées [116].

### **.IV.3.c Le potassium**

Une carence en potassium de 4 à 6 h chez le riz induit une stimulation de la  $Lp_r$  d'un facteur 2 et stimule l'expression d'aquaporines PIP ainsi que celle de canaux potassiques [144]. Chez Arabidopsis, l'effet d'une carence en potassium sur la  $Lp_r$  est modéré mais une diminution de l'expression des PIPs a été mesurée [124]. Au cours d'une carence en potassium, l' $H_2O_2$  a été montré comme relayant l'induction des systèmes d'absorption de d'ions  $K^+$  et de gènes répondant à cette carence [145].

### **.IV.4 Les espèces réactives de l'oxygène et les espèces oxygénées et azotées**

Les espèces activées de l'oxygène (ROS) sont des molécules dont l'atome d'oxygène est réduit, ce qui les rend très réactives. Ces molécules ont initialement été considérées comme des sous-produits toxiques du métabolisme aérobie, détoxiqués par l'activité d'enzymes antioxydantes. Plus récemment les ROS sont apparues comme des intermédiaires de signalisation dans la réponse des plantes à des signaux hormonaux et environnementaux de type biotique et abiotique [146]. Les ROS sont également impliquées dans la mort cellulaire programmée. Les plantes disposent de mécanismes pour piéger les ROS, leur permettant de bénéficier de leur rôle signalétique sans pâtir de leur toxicité [147].

Deux études menées chez le maïs et Arabidopsis ont montré une inhibition de la  $Lp_r$  en réponse à une application exogène de 10  $\mu M$  à 8 mM d' $H_2O_2$  [98, 133]. Plusieurs mécanismes de régulation ont été proposés incluant les dommages membranaires [133], la fermeture des pores d'aquaporines [148] et l'internalisation d'aquaporines PIP dans des structures intracellulaires sphériques [98]. D'autre part, chez des plantes résistantes aux faibles températures, l' $H_2O_2$  n'a pas d'effet sur la  $Lp_r$  [133]. Curieusement, de faibles concentrations d' $H_2O_2$  (10  $\mu M$ ) peuvent stimuler la  $Lp_r$  d'Arabidopsis [98] et de *Phaseolus vulgaris* [149].



Une étude transcriptomique menée chez *Arabidopsis* a montré que le traitement par 1 mM d' $\text{H}_2\text{O}_2$  n'altère pas l'expression des isoformes PIP1s et inhibe celle des isoformes PIP2s dès 30 min de traitements [150]. Par contre, chez l'orge, un traitement par 10 mM d' $\text{H}_2\text{O}_2$  stimule l'expression des aquaporines PIP1;2 et PIP2;1 après respectivement 1 h et 5 h de traitement [151]. Du point de vue protéique, une étude protéomique menée sur le maïs a montré que l'abondance des aquaporines PIP1 et PIP2 n'est pas modifiée en réponse à un traitement par 100  $\mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$  alors que ce traitement altère la  $Lp_r$  de ces plantes [133]. Ceci suggère l'existence de mécanismes d'ordre post-traductionnel pouvant affecter la fonction des aquaporines sans pour autant modifier leur abondance cellulaire.

Les espèces oxygénées et azotées (RNOS), dont l'oxyde nitrique (NO), sont maintenant considérées comme des molécules de la signalisation cellulaire. Le NO a été montré comme impliqué dans la germination, la croissance des racines et du tube pollinique, la floraison et la fermeture stomatique, mais aussi dans la réponse des plantes à des stress biotiques et abiotiques en agissant en tant que molécule signal (pour revue [152]). Il apparaît que le NO peut modifier l'activité de protéines par nitrosylation de leur résidus cystéines, et peut agir sur des messagers secondaires mobilisant le calcium intracellulaire (pour revue [153]). La nitrosylation affecte la fonction d'un large éventail de protéines cellulaires, comme des protéines liées au stress, des protéines de signalisation ou des protéines du métabolisme. Jusqu'à présent, aucun facteur de transcription n'a été décrit chez les plantes comme étant régulé par nitrosylation mais des études de protéomique ont identifié de potentiels candidats [154]. Plusieurs études, basées sur l'utilisation de plantes transgéniques avec des niveaux altérés de NO, ont récemment fourni des preuves génétiques de l'importance du NO dans l'induction de gènes [155]. D'autres études soulignent une inter-relation entre le NO et l'AS ainsi qu'entre le NO et l'acide jasmonique, respectivement dans le cadre de la réponse des plantes à des attaques pathogènes et à la blessure [155]. Plusieurs études ont montré une interaction entre l' $\text{H}_2\text{O}_2$  et le NO en tant que molécules signal dans la réponse de plantes à un stress salin [156], à un stress biotique [157], à une blessure [158] et à l'ABA [159]. On sait que l' $\text{H}_2\text{O}_2$  peut moduler la  $Lp_r$  [98, 110], mais aucune donnée n'est actuellement disponible quant à la régulation de la  $Lp_r$  en réponse au NO.



## **.IV.5 Les interactions biotiques**

### **.IV.5.a La symbiose : interaction entre Rhizobium et des plantes légumineuses**

Rhizobium est capable d'induire sur les racines de légumineuses de véritables organes au sein desquels les bactéries réduisent l'azote atmosphérique en ion ammonium grâce au complexe enzymatique nitrogénase. Lors de cette symbiose, le rhizobium envahit le cytoplasme des cellules hôtes et se différencie en bactéroïde fixateur d'azote, appelé nodule. En échange de substrats carbonés, cet organelle produit l'ammoniac, normalement assimilé par les glutamine-synthétases nodulaires [160]. L'aquaporine *GmNOD26* est particulièrement exprimée au niveau des nodules [161]. Cette aquaporine est un composant majeur de la membrane pér bactéroidienne, qui est d'origine végétale, entoure le bactéroidé et permet les échanges avec les cellules racinaires. L'utilisation d'anticorps dirigés contre cette aquaporine, révèle que l'expression maximale de *GmNOD26* et de sa phosphorylation coïncide avec la maturation du bactéroidé [48]. Des travaux antérieurs ont montré que *GmNOD26* facilite le transport d'eau et de glycérol. Une étude récente vient de démontrer que cette protéine facilite aussi le transport de  $\text{NH}_3$  [162]. La sécheresse et le stress salin augmentent d'un facteur 3 la phosphorylation de *GmNOD26*, suggérant que l'augmentation de la perméabilité hydrique est importante pour l'osmorégulation du nodule et l'adaptation au stress hydrique [48].

### **.IV.5.b La symbiose : la mycorhization**

Les mycorhizes arbusculaires représentent la forme de symbiose la plus commune entre les plantes et les champignons. Cette interaction provoque de profonds changements anatomiques des cellules racinaires, impliquant la différenciation d'une membrane périarbusculaire qui est le lieu d'échanges de nutriments minéraux, de carbohydrates et d'eau entre la plante et le champignon. L'expression des aquaporines PIPs et TIPs est modifiée au sein de cette membrane, de façon spécifique en fonction de la plante hôte et du champignon mycorhizien (pour revue [163]). Chez le peuplier (*Populus spp.*), l'augmentation de 55 % de la  $L_{p_r}$  des plantes mycorhizées par rapport aux plantes non mycorhizées est liée à une modification de l'anatomie racinaire ainsi qu'à une stimulation de l'expression de la majorité des aquaporines PIPs racinaires [164]. Par contre, chez *Phaseolus vulgaris*, les plantes mycorhizées présentent une réduction d'un facteur 3 de leur  $L_{p_r}$ , liée à une diminution de l'abondance des aquaporines PIP2s et de leur formes phosphorylées [165]. Les aquaporines végétales exprimées au cours de ces interactions pourraient également contribuer au transport d'ammoniac du champignon vers la plante [163]. Des études menées chez le tabac, la laitue (*Lactuca sativa.*), le soja



(*Glycine max.*) et la tomate ont montré que ce type de symbiose pourrait également être impliqué dans la résistance des plantes à des contraintes abiotiques telles que la sécheresse, la salinité du sol ou le froid, *via* l'expression des aquaporines (pour revue [16]).

#### **.IV.5.c Les pathogènes**

Certaines aquaporines spécifiques sont impliquées dans les interactions entre la plante et un pathogène. Par exemple, une étude menée sur le tabac a montré que lors de l'interaction avec un nématode parasite, l'expression d'un gène *TIP* est stimulée [166]. Ce processus pourrait être impliqué dans l'approvisionnement en eau et en solutés du parasite au niveau de la cellule géante nourricière (*giant cell*) ainsi que dans la régulation osmotique de cette cellule. Chez la tomate, l'interaction avec le parasite *Cuscuta reflexa* induit l'expression d'une protéine homologue de PIP1, probablement liée à un processus d'élongation cellulaire dépendant de l'auxine [167]. A ce jour, aucune étude n'est disponible sur la régulation de la  $Lp_r$  en réponse à une interaction entre une plante et un agent pathogène.

### **.V SPECTROMETRIE DE MASSE QUANTITATIVE**

La MS est désormais la technique de choix pour l'identification des protéines et leur quantification. Il existe deux stratégies de MS pour identifier les protéines et leurs MPTs : la stratégie dite *top-down* et la stratégie dite *bottom-up*. Les approches *top-down* consistent à fragmenter la protéine entière (*i.e.* la protéine n'est pas digérée) pour obtenir un spectre de fragmentation qui permet d'avoir accès à des étiquettes de séquence permettant d'identifier la protéine par recherche dans les banques de données. Les approches *bottom-up* sont plus souvent utilisées. Elles consistent à digérer de façon enzymatique des protéines puis à analyser les peptides soit par MS, ce qui conduit à une cartographie peptidique soit par MS/MS. Dans le premier cas, la confrontation de la carte peptidique aux bases de données de séquence protéiques est utilisée pour identifier la protéine. Dans le deuxième cas, l'obtention d'une séquence en acides aminés permet d'identifier la protéine. Les récents progrès des technologies de MS et notamment les instruments de nouvelle génération, permettent d'accéder à des quantités de l'ordre de la femtomole [168] et ont permis le développement d'outils de quantification relative et absolue (pour revue [169]).



## **.V.1 Méthode de quantification relative**

### **.V.1.a Méthode de quantification relative sans marquage**

La principale difficulté de quantification relative est due au fait que l'intensité d'un ion observée dans un spectre MS ne reflète pas l'abondance du peptide, car les peptides ont généralement des propriétés d'ionisation différentes. Cependant, pour le même peptide dans les mêmes conditions de MS, les différences d'intensités peuvent refléter des variations de son abondance. La principale difficulté de cette approche est de s'assurer que les procédures expérimentales soient identiques. Sur cette base il existe deux types d'approches de quantification : l'une est basée sur l'utilisation de marquage et l'autre n'utilise aucun marquage.

Cette dernière approche repose sur la mesure dans le profil LC-MS (Liquid Chromatography-MS) de l'aire d'un ion précurseur donné. Elle permet d'établir des cartes à trois dimensions (3D) virtuelles représentant l'emprunte des peptides, c'est-à-dire les données de rapport masse/charge ( $m/z$ ), de temps de rétention ( $r_t$ ) et d'intensité. Les cartes 3D sont comparées et les ions peptidiques présentant des intensités différentes en MS entre deux conditions sont ensuite identifiés par fragmentation MS/MS. Une étape de normalisation est ensuite menée pour minimiser la variabilité entre échantillons et augmenter la qualité de l'analyse statistique, afin de mettre en évidence des variations quantitatives spécifiquement induites par les traitements (pour revue [170]). L'avantage de cette approche est la possibilité de comparer un grand nombre de situations. L'inconvénient est la nécessité de devoir aligner les spectres LC-MS.

Une seconde approche repose sur des mesures de type LC-MS/MS. Le principe est de quantifier une protéine par le nombre de spectres MS/MS qui conduisent à son identification. Ceci est possible car le spectromètre de masse fonctionne en mode LC-MS et déclenche régulièrement une analyse MS/MS en fonction de l'intensité mesurée lors de la LC-MS. Par conséquent, plus la surface du pic en LC-MS est élevée, plus le mode d'analyse MS/MS est déclenché pour ce peptide et plus le nombre de spectres menant à la protéine sera accumulée. Cette approche est appelée *spectral counting* [171]. Le principal avantage de cette méthode par rapport à la précédente est qu'il n'est pas nécessaire d'aligner les cartes LC-MS/MS qui sont, dans ce cas, analysées indépendamment. L'inconvénient réside dans sa plus faible sensibilité.

Ces deux approches sans marquage sont complémentaires. L'approche utilisant la LC-MS fournit des résultats plus précis, parce que tous les peptides peuvent potentiellement



être considérées dans une analyse LC-MS alors que seul un faible pourcentage de peptides sont analysés dans une approche LC-MS/MS. D'un autre côté, l'approche LC-MS nécessite des analyses de type LC-MS/MS pour identifier les protéines. Des approches hybrides, combinant les deux stratégies ont été proposées [172].

#### **.V.1.b Méthodes de quantification relative avec marquage**

Afin de réduire la variabilité due à la préparation des échantillons, au moins l'un des deux échantillons à comparer peut être marqué. Les deux échantillons sont ensuite mélangés et analysés ensemble en un seul passage par LC-MS ou par des expériences de type LC-MS/MS. Cette approche permet donc de visualiser simultanément des paires de peptides [173]. Ces peptides sont chimiquement identiques, mais ont des masses différentes, de sorte qu'ils puissent être distingués par un spectromètre de masse. Ainsi, le rapport d'intensité du signal observé, entre les versions de l'échantillon marqué et non marqué du même peptide, permet de mesurer de façon précise l'abondance relative de chaque espèce. Plusieurs types de marquages métaboliques, enzymatiques et chimiques peuvent être employés pour mener ce type de quantification relative.

##### **.V.1.b.i Marquage *in vivo***

Le marquage métabolique *in vivo* représente la voie la plus simple et la plus stable d'incorporation d'isotopes. Les cellules ou les plantes sont cultivées soit en présence de l'isotope de l'azote  $^{14}\text{N}$ , soit en présence de l'isotope  $^{15}\text{N}$ . Il s'agit d'un marquage peu coûteux qui permet d'obtenir un taux d'incorporation proche de 100 % en quelques jours [174]. Une autre stratégie, appelée Stable Isotope Labeling by Amino Acid in Cell culture (SILAC), permet de marquer les protéines par l'incorporation d'acides aminés essentiels (leucine, lysine ou arginine) avec des formes isotopiques différentes [175]. Pour cela, les cellules ou les plantes sont cultivées soit en présence de l'isotope léger, soit en présence de l'isotope lourd. Cependant, ce type de marquage ne permet une incorporation totale que si des lignées mutées pour la voie de biosynthèse correspondante sont disponibles. Dans le cas contraire, l'étude est limitée aux variations protéiques les plus importantes.

##### **.V.1.b.ii Marquage *in vitro***

Contrairement au marquage *in vivo*, ce type de marquage est réalisé après la biosynthèse des protéines et peut donc être utilisé sur tout matériel biologique. Il peut être chimique ou



enzymatique et peut être réalisé avant ou après la digestion. De ce fait, il concerne soit les protéines, soit les peptides.

#### **.V.1.b.ii.1 Marquage chimique**

Le marquage des fonctions thiols des cystéines est réalisé par le réactif Isotope Coded Affinity Tag (ICAT) qui est composé d'une extrémité réactive et spécifique du groupement thiol, espacée du groupement biotine par une chaîne aliphatique lourde ou légère. La biotine permet la purification de l'échantillon marqué sur une colonne d'avidine. Pour être quantifié, il est donc indispensable que le peptide détecté en MS possède au moins une cystéine dans sa séquence et qu'il soit détectable en MS.

Le marquage chimique peut être réalisé au niveau des fonctions amines. Pour cela, le réactif iTRAQ<sup>PM</sup> (isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification) est utilisé. Il s'agit d'étiquettes marquées isotopiquement par quatre combinaisons différentes d'isotopes lourds de carbone (<sup>13</sup>C), azote (<sup>15</sup>N) et oxygène (<sup>18</sup>O). Les étiquettes ont des rapports *m/z* différents après fragmentation MS/MS, ce qui permet de différencier les peptides et de les quantifier les uns par rapport aux autres [176].

#### **.V.1.b.ii.2 Marquage enzymatique**

Les protéines peuvent également être marquées de façon enzymatique. Pour cela, les protéines sont digérées en présence d'eau légère ou lourde (H<sub>2</sub><sup>18</sup>O). L'isotope <sup>18</sup>O est incorporé dans le groupement carboxyl des peptides par l'enzyme de digestion pendant la protéolyse [177]. Cependant cette réaction est difficilement maîtrisable.

### **.V.2 Méthodes de quantification absolue**

A l'aide de standards internes adéquats, les expériences de MS peuvent également fournir une quantification absolue de peptides. Ces méthodologies de quantification absolue reposent sur l'introduction dans l'échantillon d'intérêt d'une quantité connue de peptides isotopiquement marqués. Deux types d'approches sont décrits. Dans la méthode de quantification absolue appelée « AQUA » (Absolute QUAntification) [178], des quantités connues de peptides synthétiques marqués isotopiquement sont introduits dans l'échantillon après la digestion mais avant l'analyse MS. Alternativement, des standards peptidiques internes obtenus après synthèse et marquage métabolique d'un concatémère artificiel de peptides souhaités peuvent aussi être utilisés. Il s'agit de la méthode dite « QconCAT » [179]. Dans ce cas, ils sont introduits dans l'échantillon avant la digestion. Cependant, comme aucune de ces deux



méthodes ne permet d'introduire les standards peptidiques dès le début de la préparation de l'échantillon, des erreurs de quantification peuvent se produire.

Lorsque la quantification est ciblée sur une ou quelque protéine(s), la technique de SRM (Single Reaction Monitoring) ou MRM (Multiple Reaction Monitoring) peut être utilisée. Cette technique consiste à filtrer au niveau des quadripôles du spectromètre de masse les espèces ioniques d'intérêt (ions parents) et des ions fragments. Cette technique permet d'augmenter la sensibilité et la spécificité de la détection en ne réalisant plus de balayage sur la gamme totale de masse comme c'est le cas en MS/MS, mais en consacrant tout le temps d'acquisition à la mesure des transitions sélectionnées [180]. Ensuite, deux méthodes de quantification absolue reposant sur la synthèse de peptides légers ou lourds, analogues au peptide à quantifier, sont envisageables. La première est la technique des ajouts dosés, qui consiste en la réalisation d'une gamme d'étalonnage à partir de peptides légers de synthèse, incorporés en quantités connues dans l'échantillon analysé. Cette gamme permet d'établir une relation linéaire entre la quantité du peptide de synthèse et l'intensité du signal mesurée par MS pour le peptide natif [181]. La deuxième méthode consiste en l'introduction dans les échantillons de quantités connues de peptides marqués par des isotopes lourds, qui constituent donc des standard internes.

## **.VI APPORT DE LA MS POUR L'ETUDE DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES**

Les MPTs offrent un mécanisme dynamique de régulation de la fonction des protéines et une diversité de formes protéiques au-delà de celle fournies par le seul agencement des 20 acides aminés. Environ 300 MPTs sont répertoriées dans la littérature. Grâce à sa sensibilité et à sa spécificité, la MS est une technologie largement utilisée pour identifier la nature des MPTs [182]. En effet, un peptide modifié peut être détecté à cause de l'incrément de masse ou du déficit de masse induit par la MPT par rapport au peptide non modifié. Par exemple l'observation d'un incrément de masse de 80 Da ou de 14 Da suggère la présence respectivement d'un groupement phosphate et d'un groupement méthyl. Cependant cette prédiction n'est pas suffisante et requiert une analyse MS/MS pour confirmation. L'étude des MPTs présente cependant certaines limitations en MS : les peptides modifiés sont difficilement détectables notamment à cause de leur faible abondance par rapport aux peptides non modifiés et de la labilité de certaines modifications (exemple : phosphorylation et glycosylation). Une solution réside dans l'enrichissement préalable en peptide modifié ainsi que dans l'adaptation des stratégies d'analyse MS au type de modification étudiée.



### **.VI.1 La phosphorylation : une MPT majeure**

La phosphorylation est une MPT ubiquitaire qui régule la plupart des processus cellulaires. Avec environ 30000 protéines codées par les génomes végétaux, il est estimé que 30 % d'entre elles peuvent être phosphorylées à un moment donné. L'étude de cette MPT est particulièrement délicate car elle présente une large gamme dynamique et les protéines phosphorylées sont faiblement abondantes. Alors que la phosphorylation était connue depuis un siècle, ce n'est que depuis les années 1990 que le nombre de protéines phosphorylées identifiées a augmenté [183]. Ceci tient aux divers développements méthodologiques, tant au niveau de la MS que des méthodes de fractionnement de protéines, de peptides et d'enrichissement en phosphopeptides [169, 184-186].

### **.VI.2 Enrichissements en phosphopeptides pour l'étude en MS**

Le succès de l'enrichissement en phosphopeptides vient du fait que le groupement phosphate porte une charge négative, possède la capacité d'interagir avec des billes échangeuses d'ions et de se lier de façon covalente avec des ions métalliques (pour revue [169, 183, 187]).

La méthode IMAC, pour Immobilized Metal ion Affinity Chromatography, utilise des ions ferriques ( $\text{Fe}^{3+}$ ) immobilisés dans des billes, qui se lient spécifiquement aux groupements phosphates des phosphopeptides. Dans un premier temps, elle a été utilisée pour isoler les phosphopeptides à partir d'une protéine d'intérêt pour cartographier ses sites de phosphorylation. Elle a ensuite été utilisée pour isoler des phosphopeptides à partir d'un extrait complexe de protéines. La méthode IMAC a été utilisée avec succès dans de nombreuses études de phosphoprotéomiques [47, 188-191]. Dans le but d'améliorer l'enrichissement en phosphopeptides de cette méthode, les peptides peuvent être préalablement fractionnés à l'aide de colonnes échangeuses de cations (SCX pour Strong Cation eXchange) ou d'anions (SAX pour Strong Anion eXchange) [46, 192, 193] qui profitent de la différence de charge qui existe à bas pH entre les phosphopeptides et les peptides non phosphorylés. Par exemple, dans le cas d'une colonne SCX qui est composée d'ions  $\text{SO}_3^-$ , les peptides présentant des résidus  $\text{K}^+$  et  $\text{R}^+$  se fixent sur la colonne alors que les ions phosphorylés présentant des ions  $\text{PO}_4^-$  sont repoussés. Des études de phosphoprotéomiques menées sur les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe* ont utilisé avec succès cette méthode [194, 195].

Les colonnes d'oxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ) sont des matrices solides ayant prouvé leur grande efficacité d'enrichissement en phosphopeptides et qui sont plus robustes que la technique IMAC pour l'analyse d'échantillons complexes de protéines [196]. Le groupement phosphate



présente trois sites potentiels de liaison (trois atomes d'oxygène) avec la colonne TiO<sub>2</sub>. De l'acide lactique est utilisé lors du chargement des échantillons sur la colonne en tant que compétiteur des peptides contenant les acides aminés carboxyliques (D et E), eux-mêmes compétiteurs des peptides phosphorylés pour l'accrochage sur la colonne. D'autres métaux oxydés tels que le zirconium et l'aluminium sont également utilisés, mais plus rarement que le titane.

Il est également possible de combiner plusieurs méthodes d'enrichissement. Par exemple, la technique appelée SIMAC, qui consiste en la combinaison des techniques IMAC et titane, semble capable de séparer les peptides monophosphorylés des peptides multiphosphorylés [197]. La complémentarité de ces deux techniques a été montrée lors de l'étude du phosphoprotéome de *S. pombe* [195].

### **.VI.3 Phospho-protéomique quantitative**

Il existe encore peu d'études phosphoprotéomique quantitative chez les plantes. Ces études ont utilisé des techniques sans marquage [51, 198, 199] ou avec différents types de marquages [45, 52, 56, 59, 200]. Certaines de ces études permettent d'identifier des situations environnementales et hormonales qui modulent de taux de phosphorylation des aquaporines. Ainsi, dans les racines d'*Arabidopsis*, un traitement de 2 h par 100 mM de NaCl provoque une déphosphorylation d'environ 30 % du résidu S283 d'*AtPIP2;1*, alors qu'en réponse à un traitement de 15 min par 2 mM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, on observe une augmentation de 20 % de phosphorylation des résidus S280 et S283 de cette aquaporine [54]. Dans une autre étude menée sur des plantules d'*Arabidopsis* en suspension, un traitement de 3 jours par 200 mM de NaCl diminue de 70 % l'abondance du peptide diphosphorylé de l'extrémité C-terminale de PIP2;1, et augmente de respectivement 20 % et de 237 % l'abondance des peptides mono- et diphosphorylés de l'extrémité C-terminale de PIP2;4 [56]. L'alimentation en saccharose des plantules d'*Arabidopsis*, suite à une carence en saccharose et à une nuit prolongée de 24 h, induit une augmentation transitoire après 5 min de traitement de l'état de phosphorylation de l'aquaporine PIP2;6 [51]. Enfin, une étude récente menée sur des plantules d'*Arabidopsis* montre qu'un traitement par 50 μM d'ABA pendant 30 min conduit à une diminution de l'état de phosphorylation de l'extrémité C-terminale de PIP2;1, PIP2;4, PIP2;7 et PIP2;8 [59].

Une question majeure émergeant désormais d'études de phospho-protéomique quantitative est que des variations d'abondance d'un site phosphorylé suite à un traitement *in vivo* ne signifient pas systématiquement que ce site soit biologiquement actif. Pour cela, il est souvent nécessaire de mener des expériences de génétique inverse dans lesquelles le résidu



sérine, thréonine ou tyrosine, est muté en un acide aminé non-phosphorylable (alanine) ou mimant une phosphorylation constitutive en installant une charge négative (acide aspartique ou acide glutamique). Si des changements phénotypiques sont observés suite aux mutations et si les mutants A et D montrent des caractéristiques différentes, cela peut accréditer l'hypothèse d'un rôle de la phosphorylation identifiée [54, 201].



## OBJECTIFS

De nombreuses études montrent que la  $Lp_r$  peut être modulée en réponse à diverses contraintes environnementales et d'autres études montrent que l'expression des aquaporines, leur abondance et leur état de modification post-traductionnelle peuvent être régulées en réponse à ces contraintes. Cependant peu d'études portent simultanément sur les modulations de la  $Lp_r$  et la régulation des aquaporines. Le premier objectif de ce travail de thèse est de caractériser un ensemble de situations environnementales reflétant diverses contraintes biotiques, abiotiques ou différents états nutritionnels de la plante, qui conduisent à une modulation de la  $Lp_r$  chez *Arabidopsis*. Le deuxième objectif est de mener des approches de protéomique et de phosphoprotéomique quantitative pour inventorier et quantifier l'ensemble des aquaporines racinaires et leurs MPTs, en particulier la phosphorylation, dans les situations environnementales affectant la  $Lp_r$ . Cette étude vise à représenter les relations existant entre les stimuli étudiés, l'abondance des aquaporines, leur état de modification et les modulations de la  $Lp_r$ , et à dégager des éléments de régulation des aquaporines impliqués dans l'ensemble des situations étudiées ou typique de certains types de contraintes.



## **MATERIEL ET METHODE**



## **.I MATERIEL VEGETAL ET CONDITIONS DE CULTURE**

### **.I.1 Matériel biologique**

Les plantes sauvages utilisées sont d'écotype Columbia 0 (Col0). Les lignées transgéniques TIP2;2-YFP et TIP2;3-YFP, sous le contrôle de leur propre promoteur, ont été fournies par Mathias Sorieul (laboratoire du Dr. Lorenzo Frigerio, department of biological sciences, University of Warwick, Royaume Uni). Les lignées mutantes *tip2;3-1*, *-2* et *-3*, invalidées pour le gène *TIP2;3*, ont été fournies par l'équipe du Dr. Nicolaus Von Wiren (Institute for Plant Nutrition, University of Hohenheim, Stuttgart, Allemagne). Ces mutants d'insertion correspondent aux lignées SALK\_142179, SALK\_000414 et SALK\_074989. Cependant, en l'absence de correspondance stricte entre les lignées reçues et l'annotation du SALK, chacune de ces lignées a été caractérisée par des approches de biologie moléculaire (paragraphe III).

### **.I.2 Culture des plantes**

#### **.I.2.a Amplification des lignées d'*Arabidopsis thaliana***

L'amplification des lignées a été prise en charge par l'équipe "Moyen de culture" du laboratoire. Les graines sont semées en serre (photopériode de 16 h, température comprise entre 22°C et 25°C) sur terreau. Pendant la première semaine, les plantules sont recouvertes d'une plaque en plastique transparent de façon à conserver un fort taux d'humidité et ainsi favoriser la germination et la croissance. Les plantes sont sub-irriguées de façon hebdomadaire pendant 5 semaines environ puis laissées à dessécher. Une fois les siliques à maturité, les graines sont récoltées. Celles-ci sont stockées dans des pochettes en plastique ou papier à température ambiante.

#### **.I.2.b Culture *in vitro***

Les graines d'*Arabidopsis thaliana* écotype Col0 sont stérilisées dans une solution de 14 % Bayrochlore, 86 % éthanol et 0,02 % CleanN, puis lavées deux fois de suite par de l'éthanol absolu. Les graines stérilisées sont semées *in vitro* sur un milieu gélosé MS dilué 2 fois ([202]; Sigma M5519), complémenté par 1 % de saccharose, 0,05 % de MES et 7 g.L<sup>-1</sup> d'agar, et ajusté à pH 5,7 avec du KOH, puis elles sont placées 2 jours à l'obscurité et à 4°C afin de synchroniser leur germination. Ensuite, elles sont cultivées pendant 9 jours en chambre de culture en conditions de jours longs (photopériode de 16 h, 20°C jour et nuit, 70 % d'humidité relative (HR) et environ 120 μE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>).

Tableau 2 : Composition des solutions de culture hydroponique

Macroéléments	Milieu standard (mM)	Milieu appauvri en NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mM)	Milieu dépourvu de PO <sub>4</sub> (mM)
KNO <sub>3</sub>	1,25	0,029	1,25
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1,50	0,035	1,50
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	0,61	0
CaCl <sub>2</sub>	0	1,465	0
MgSO <sub>4</sub>	0,75	0,75	0,75
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,50	0,50	0

Les trois types de milieux contiennent également 50 µM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 12 µM MnSO<sub>4</sub>, 0,70 µM CuSO<sub>4</sub>, 1 µM ZnSO<sub>4</sub>, 0,24 µM MoO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>, 50 µM Fe-EDTA, 100 µM Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>.

Tableau 3 : Protocole de préparation de la solution de DEA-NO

DEA-NO (g)	NaOH 0,01M (µL)	Tampon Phosphate (µL)	[DEA-NO] finale (µM)
0,00103	10	990	100
0,00129	12,5	987,5	125
0,00258	25	975	250
0,00516	50	950	500
0,01031	100	900	1000

Les expérimentations se déroulent dans un tube contenant 49 mL de solution hydroponique standard DEA-NO et 1 mL de la solution concentrée de DEA-NO dont la préparation est indiquée dans ce tableau. Il présente la masse de DEA-NO (colonne 1) à dissoudre dans le volume de NaOH 0,01 M (colonne 2), puis à ajouter au volume de tampon phosphate (colonne 3) de façon à obtenir 1 mL de DEA-NO qui, une fois ajouté à 49 mL de solution standard DEA-NO, aura la concentration finale indiquée dans la colonne 4.

### **.I.2.c Culture en hydroponie**

Les plantules cultivées *in vitro* sont transférées en hydroponie sur des plaques de PVC (30x30x0,5 cm) équipées de deux flotteurs de polystyrène expansé qui sont déposées sur des bassines contenant 8 litres de milieu hydroponique standard (tableau 2). Durant les 2 premiers jours, les cultures sont recouvertes d'une plaque de plastique transparente de façon à minimiser le stress dû au changement d'hygrométrie suite au transfert. Le milieu est renouvelé toutes les semaines et les premières expériences débutent après un minimum de 11 jours de culture en hydroponie.

### **.I.3 Traitements**

#### **.I.3.a Mannitol et NaCl**

Des plantes âgées de 21 jours sont traitées pendant 45 min à 6 h par 200 mM de mannitol, et pendant 45 min et 2 h par 100 mM NaCl [115].

#### **.I.3.b H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Des plantes âgées de 21 jours sont traitées par 500 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 8 et 20 min, qui sont respectivement les temps nécessaires pour induire une demi-inhibition ( $t_{1/2}$ ) et une inhibition maximale ( $t_{max}$ ) de la  $Lp_r$  d'Arabidopsis décrits par Boursiac *et al.* en 2008 [98].

La molarité de la solution stock d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est titrée selon un protocole fourni par Sigma. Un mélange de 10 mL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dilué 100 fois et de 10 mL d'acide sulfurique 1 N est préparé en triplicat. Du KMnO<sub>4</sub> 0,1 M est ensuite ajouté au mélange, goutte à goutte sous agitation, jusqu'à obtenir une coloration rose persistante. Le volume x de KMnO<sub>4</sub> 0,1 N ajouté permet le calcul de la molarité de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selon l'équation suivante:

$$\text{Molarité H}_2\text{O}_2 = [(\text{mL de KMnO}_4 \text{ ajouté}) \times (\text{molarité KMnO}_4) \times \frac{1}{2} \times 100] / (10 \text{ mL d'H}_2\text{O}_2)$$

#### **.I.3.c NO**

Le diéthylamine NONOate (DEA-NO - Sigma D5431), est un donneur de NO relarguant sans délai toute sa charge en 1 à 3,5 min à pH 7,4 et à 30°C [203]. Il s'avère donc pertinent pour étudier la réponse rapide de la plante à ce stress oxydatif. Une solution concentrée de 500 mM de DEA-NO dissout dans NaOH 0,01 M est préparée extemporanément et stockée dans la glace pendant une journée au maximum. Pour initier le relargage de NO, cette solution est diluée dans du tampon phosphate 100 mM pH 7,2, selon les rapports présentés dans le



tableau 3 [204]. Les racines issues de plantes âgées de 21 jours sont traitées avec des concentrations de DEA-NO allant de 50  $\mu\text{M}$  à 500  $\mu\text{M}$  dans une solution hydroponique (tableau 2) de laquelle est supprimé le Fe-EDTA : solution dite "standard DEA-NO", donc dépourvue de métaux de façon à limiter la formation de complexes Métal/NO (ex : Fe/NO). Les plantes contrôles sont traitées avec les mêmes volumes de NaOH 0,01 M et de tampon phosphate (115 mM NaCl, 4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 16 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,3, pH 7,2) mais sans le DEA-NO. La spécificité d'effet du DEA-NO est testée en pré-traitant les plantes pendant 10 min avec 100  $\mu\text{M}$  de cPTIO (Sigma C221), molécule piégeant le NO [204, 205], avant un traitement avec 100  $\mu\text{M}$  de DEA-NO.

#### **.I.3.d Flagelline (flg22)**

La flagelline est un éliciteur général produit par les eubactéries [206]. Flg22 est un peptide de 22 acides aminés (QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA) correspondant à la partie N-terminale de la flagelline et sa séquence est très conservée chez les eubactéries. Sa synthèse a été réalisée par le laboratoire CASLO, Université technique du Danemark, Diplomvej 381, Lyngby, Danemark. Les plantes âgées de 21 jours sont traitées par 200 nM à 1  $\mu\text{M}$  de flg22. La réponse est mesurée dès l'application et jusqu'à 2 h après le début du traitement.

#### **.I.3.e Traitement par le saccharose**

Des plantes âgées de 21 jours cultivées en milieu hydroponique standard sont transférées dans une chambre de culture à l'obscurité pendant 24 à 48 h. Ensuite, elles sont transférées dans un milieu contenant 30 mM de saccharose ou de mannitol, à l'obscurité ou à la lumière, pendant 2 à 4 h.

#### **.I.3.f Carence et réalimentation en nitrate**

Des plantes âgées de 15 jours sont transférées pendant 6 jours dans un milieu hydroponique appauvri en nitrate contenant 0,1 mM de cet ion. Dans ce milieu,  $\text{KNO}_3$  et  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  sont remplacés respectivement par  $\text{K}_2\text{SO}_4$  et  $\text{CaCl}_2$  (tableau 2). Les plantes sont ensuite réalimentées en nitrate par transfert dans le milieu de culture standard contenant 4,25 mM de nitrate.

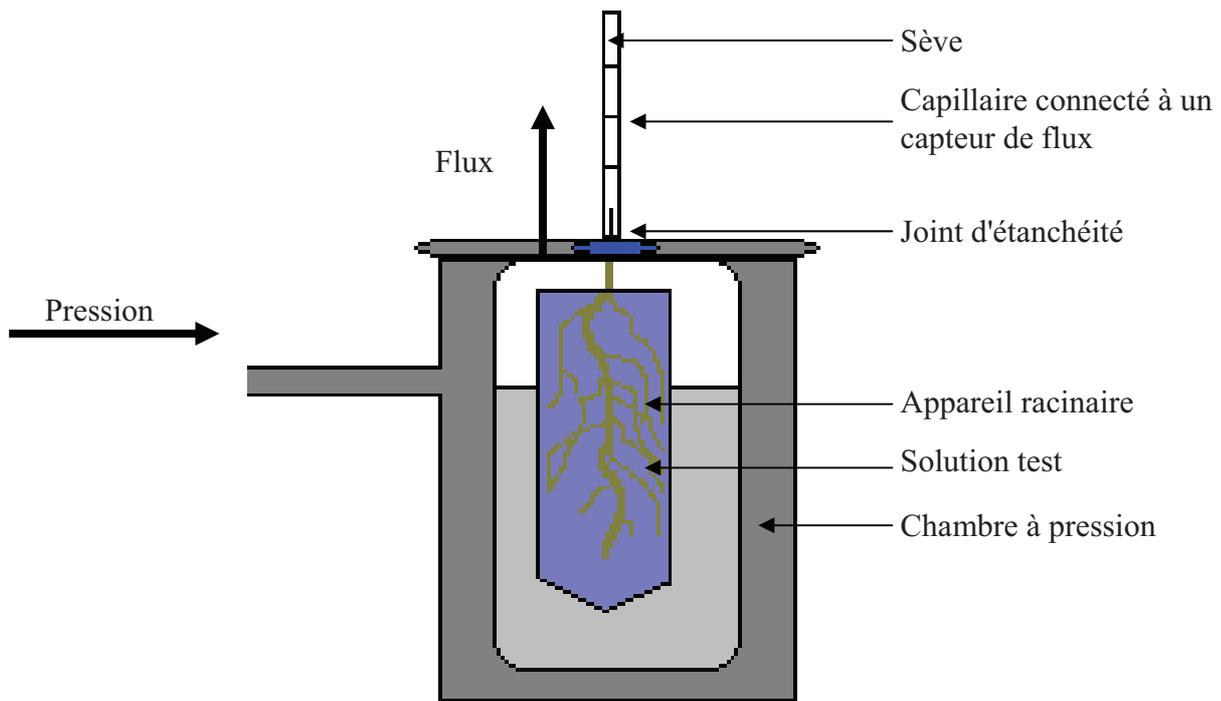


Figure 6 : Dispositif de la chambre à pression.

Un appareil racinaire excisé est inséré dans la chambre qui est fermée de façon étanche puis mise sous pression. A la sortie de la chambre, l'hypocotyle est relié à un capillaire connecté à un capteur de flux.

### **.I.3.g Carence et réalimentation en phosphate**

Des plantes âgées de 15 jours sont transférées pendant 6 jours dans un milieu hydroponique dépourvu de phosphate (tableau 2). Les plantes sont ensuite réalimentées en phosphate par transfert dans le milieu de culture standard contenant 0,5 mM de phosphate.

## **.II MESURE DE TRANSPORT D'EAU RACINAIRE**

Les mesures de flux d'eau racinaire et de  $L_{p_r}$  sont réalisées avec une chambre à pression qui permet d'appliquer une pression hydrostatique à un appareil racinaire excisé (figure 6). La plante, âgée d'environ 3 semaines (paragraphe I.2.c), est décapitée au niveau de l'hypocotyle puis l'appareil racinaire est introduit dans le joint du couvercle de la chambre. Un adaptateur est fixé à l'hypocotyle par de la pâte dentaire (Coltène, Président Microsystem) pour étanchéifier le système. Après 10 min de polymérisation de la pâte, l'ensemble est transféré dans la chambre à pression où les racines plongent dans la solution de traitement. Un capillaire relie l'adaptateur à un capteur de flux (Bronkhorst) qui effectue une mesure toutes les 2 sec tandis qu'une électrovanne reliée à une bouteille d'azote et asservie à un capteur de pression (SMC corporation) permet de réguler la pression dans la chambre. L'ensemble est coordonné par un programme développé dans l'équipe par Yann Boursiac. Pour obtenir un flux stabilisé de sève exudée avant de commencer les mesures, 10 min de pressurisation préalable à 350 kPa, ou 600 kPa dans le cas de traitements à fort potentiel osmotique, sont nécessaires.

Deux types de mesures sont réalisés. L'un permet de mesurer des variations du flux racinaire d'eau au cours du temps suite à l'application d'un traitement dont la réponse est mesurable dès les premières min de l'application (cas du DEA-NO et de l' $H_2O_2$ ). La mesure consiste à suivre l'évolution du flux de sève à la pression constante de 340 kPa. L'autre type de mesure, qui permet de mesurer les variations de la  $L_{p_r}$ , est utilisé dans le cas de traitements pouvant affecter le potentiel osmotique de la solution de mesure (cas du traitement par 200 mM mannitol et 100 mM NaCl), ou lorsque la réponse est mesurable à partir de 30 min après l'application quelque soit le potentiel osmotique (cas des traitements de carences et réalimentation en nitrate et phosphate, par flg22, d'obscurité, par 30 mM de mannitol et de saccharose). Il s'effectue selon un protocole de mesure de flux pour trois pressions successives (320 kPa, 160 kPa puis 240 kPa pour des traitements sans modification de potentiel osmotique, ou 720 kPa, 560 kPa puis 640 kPa lors des traitements à fort potentiel osmotique). Une fois les mesures terminées, les racines sont déshydratées à 60°C pendant 48 h, puis leur

Tableau 4 : Amorces utilisées pour la caractérisation des mutants *tip2;3*.

Nom	Numéro	Séquence (5'-3')	Orientation	Température d'appariement (°C)	
				PCR avec kit Phire	PCR classique
BAB09071S	4S	GTGAGATCCGAGTGTAATTGACTG	sens	64,01	70
TIP2;3-Ex2-S	2S	ATCGTTGTGACCTTTGCA	sens	60,87	52
TIP2;3-5'-S	1S	CCCATACAAAGCCCAAATAAC	sens	62,25	56
BAB09071A	3AS	GAAAGAAACCAAACATGCTATACG	antisens	62,74	60
LBb1	/	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	/	76,47	62

Cinq amorces ont été utilisés pour la caractérisation moléculaire des lignées mutantes *tip2;3*. Ce tableau présente leur nom (colonne 1), le numéro qui leur est associé (colonne 2), leur séquence (colonne 3), leur orientation (colonne 4), leur Tm selon le type de PCR (colonnes 5 et 6).

masse sèche est mesurée. La relation existant entre le flux de sève exudée ( $J_v$ ) et le gradient de pression imposé ( $\Delta P$ ) répond à l'équation suivante:  $J_v = S.Lp_r.\Delta P$ , où  $S$  est la surface racinaire, et  $Lp_r$  la conductivité hydraulique racinaire. La valeur absolue du flux ou la régression linéaire des points expérimentaux permet ainsi d'obtenir la valeur de la conductance hydraulique racinaire ( $L_0$ ). Sachant qu'il existe une relation linéaire entre la masse et la surface racinaire (thèse Hélène Javot, 2002), la  $Lp_r$  est calculée en rapportant la valeur de conductance à la masse racinaire, exprimée en  $mL.g^{-1}.h^{-1}.MPa^{-1}$ .

### **.III MÉTHODES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE**

#### **.III.1 Caractérisation des mutants *tip2;3***

Les trois lignées mutantes invalidées pour le gène *TIP2;3*, fournies par l'équipe de Nicolas Van Wieren, correspondent aux lignées SALK\_142179, SALK\_000414 et SALK\_074989. En l'absence de correspondance entre les lignées reçues et l'annotation SALK, chacune des lignées a été caractérisée par PCR ou par séquençage à l'aide des amorces listées dans le tableau 4. Les PCR sont effectuées avec le kit Phire Plant direct PCR, Finnzymes. Brièvement, un échantillon de la plante est prélevé à l'aide d'un emporte-pièce fourni dans le kit, puis écrasé dans un tampon de dilution. Le surnageant servira ensuite de matrice. Aucune extraction d'ADN n'est nécessaire. Une réaction de 20  $\mu l$  comprend 10  $\mu l$  de tampon Phire plant PCR (contenant les nucléotides), 0,4  $\mu l$  de polymérase (Phire Hot Start II DNA polymérase), 0,5  $\mu l$  de matrice et 1  $\mu l$  de chaque amorce. Le  $T_m$  des amorces est calculé selon le protocole du kit sur le site Internet [https://www.finnzymes.fi/tm\\_determination.html](https://www.finnzymes.fi/tm_determination.html) (tableau 4). La température d'appariement est obtenue en ajoutant 3°C au plus faible  $T_m$ . L'appariement dure 5 sec. L'extension s'effectue à 72°C pendant 20 sec pour un amplicon de longueur inférieure à 1 kb ou de 20 s/kb pour les amplicons plus longs.

Le séquençage est effectué par la société GATC sur le produit de PCR purifié à l'aide du kit GeneClean® (qbiogene).

#### **.III.2 Analyse de l'expression de *TIP2;3***

La vérification de l'absence d'ARNm chez ces lignées mutantes a été effectuée par RT-PCR. Les ARNm sont extraits selon le protocole du kit "SV total RNA isolation system" (Promega). Brièvement, un minimum de 30 mg d'appareil racinaire de plante cultivée en hydroponie (paragraphe I.2.c) est broyé à l'aide d'un pilon et d'un mortier dans l'azote liquide. Le broyat subit ensuite des dilutions et lavages ainsi qu'un traitement à la DNase I. Enfin, les ARNm sont élués dans de l'eau puis dosés à l'aide du spectromètre Nanodrop ND-1000.



La réaction de transcription inverse est effectuée selon le protocole de RT-PCR M-MLV de Promega. Brièvement, 1 µg d'ARNm est dénaturé à 70°C puis mis en présence du tampon de réaction du kit, d'oligonucléotides et de transcriptase inverse M-MLV RT (H-). Les ADNc ainsi obtenus subissent une PCR (température d'appariement : 50°C, temps d'élongation 1,5 min, voir amorces dans le tableau 4. Un couple d'amorces supplémentaires correspondant au facteur d'élongation EF1 $\alpha$  est utilisé comme témoin positif de la transcription inverse.

## **.IV IMAGERIE CELLULAIRE**

### **.IV.1 Microscopie à lumière blanche**

Dans le but d'évaluer l'efficacité de différentes méthodes de broyage, 50 µl de broyat racinaire sont montés entre lame et lamelle, puis observés au microscope à lumière blanche Olympus BH-2 (Tokyo, Japon) au grossissement x 10. Les images ont été capturées à l'aide du logiciel Cella<sup>®</sup> (Soft imaging system solutions, Münster, Allemagne).

### **.IV.2 Microscopie confocale**

Des plantules TIP2;3-YFP sont cultivées *in vitro* sur du milieu MS/2 pendant 7 jours. Elles sont ensuite incubées pendant 2 h dans du milieu hydroponie standard (paragraphe I.2.c) avec ou sans 100 mM NaCl. L'émission de la YFP (530 nm) a été observée en utilisant un filtre dichroïque. L'imagerie confocale a été effectuée avec un microscope confocal Zeiss LSM510 AX70, avec un objectif 63x/1,4 DIC dans l'huile. Un minimum de 40 cellules a été analysé par condition.

## **.V EXTRACTION DE PROTEINES**

### **.V.1 Purification des protéines microsomaux hydrophobes**

L'ensemble des étapes décrites par la suite est réalisé à 4°C. Le matériel racinaire est broyé au broyeur à rouleaux (Conception C. Fauvel, INRA Avignon) à raison de 0,25 g.mL<sup>-1</sup> de tampon de broyage (50 mM Tris, 500 mM saccharose, 10 % glycérol, 20 mM EDTA, 20 mM EGTA, 50 mM NaF, 5 mM  $\beta$ -glycérophosphate, 1 mM phénantroline, 0,6 % PVP, 10 mM acide ascorbique, ajusté à pH 8 avec Mes 1 M, de 1 µM leupeptine, 5 mM DTT, 1 mM vanadate stabilisé, 1 mM PMSF). Le broyat est centrifugé à 2000 rpm (centrifugeuse eppendorf 5810 R) pendant 2 min de façon à sédimenter les débris. Le surnageant est ensuite centrifugé à 9000 g pendant 12 min de façon à sédimenter les organelles. Le surnageant résultant est centrifugé à 50000 g pendant 12 min et le culot de microsomes est resuspendu



dans un volume minimal de tampon de conservation (10 mM Tris, 10 mM borate, 300 mM saccharose, 9 mM KCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 50 mM NaF, ajusté à pH 8,3, additionné de 4,2  $\mu$ M leupeptine, 1 mM PMSF, 5 mM DTT) et conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les protéines sont dosées par la technique de Bradford [207] (paragraphe I.8.a). De façon à enrichir l'échantillon en protéines membranaires, les microsomes sont ensuite traités successivement par 4 M d'urée à pH 11 et 20 mM de NaOH selon Santoni *et al.*, 2003 pour décaper les protéines solubles [37]. Les protéines microsomaux hydrophobes sont ensuite solubilisées en présence de SDS à l'aide d'un tampon de type Laemmli (2 % SDS, 10 % glycérol, 100 mM DTT, 0,001 % bleu de bromophénol, 50 mM Tris pH 6,8) concentré 2 fois [208], à raison de 50  $\mu$ l pour 500  $\mu$ g d'équivalent microsomes non traités, sous agitation pendant 3 h. Une centrifugation de 13000 rpm pendant 2 min est effectuée de façon à ne conserver que le surnageant de protéines solubilisées. Les protéines solubilisées sont conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **.V.2 Immunoprécipitation de protéine fusionnée à la YFP**

L'immunoprécipitation de protéines étiquetées par la YFP est réalisée à  $4^{\circ}\text{C}$  à partir de racines de plantes cultivées en hydroponie comme décrit dans le paragraphe I.2.c. Elles sont broyées à l'aide d'un broyeur à rouleaux en présence de 2,1 mL de tampon RIPA (Radio ImmunoPrecipitation Assay) pour 1 g de matière fraîche (150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0,5 % Na deoxycholate, 0,1 % SDS, 50 mM Tris, pH 8, 2 mM Leupeptine, 1 mM PMSF et 5 mM DTT). Le broyat est centrifugé à 10000 g pendant 15 min, puis le surnageant obtenu est centrifugé à 10000 g pendant 15 min. L'immunoprécipitation est réalisée à partir du surnageant en y ajoutant des microbilles couplées à l'anti-GFP ( $\mu$ MACS GFP tagged protein isolation kit, human MACS molecular Miltenyi Biotec) à raison de 50  $\mu$ l pour 1,25 g de matière fraîche pendant 1 h à  $4^{\circ}\text{C}$  sous agitation. Ensuite, l'échantillon est chargé sur la colonne  $\mu$ MACS préalablement conditionnée avec 200  $\mu$ l de tampon de lyse (150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 50 mM Tris HCl, pH 8,0). Après quatre lavages avec 200  $\mu$ l de tampon contenant 150 mM NaCl, 1 % d'Igepal CA-630, 0,5 % sodium deoxycholate, 0,1 % SDS et 50 mM Tris HCl, à pH 8,0, et un lavage avec 100  $\mu$ l de tampon contenant 20 mM de Tris HCl à pH 7,5, les protéines sont éluées par 2 x 20  $\mu$ l de tampon Laemmli.

## **.VI METHODES DE BIOCHIMIE**

### **.VI.1 Dosage de protéines**

Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford modifiée, à l'aide du kit "Protein Assay" de Bio-Rad. La modification consiste à rajouter 50  $\mu$ l de NaOH 1 M dans un volume



réactionnel total de 800 µl afin d'exposer un maximum de résidus membranaires au Bleu de Coomassie. La densité optique est mesurée au spectrophotomètre à 595 nm. La quantité de protéines est évaluée à l'aide d'une courbe d'étalonnage réalisée avec des quantités connues d'albumine d'origine bovine (de 0 à 10 µg).

### **.VI.2 Electrophorèse en conditions dénaturantes**

Les protéines solubilisées dans le tampon de type Laemmli sont séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide 10 % en présence de SDS (SDS-PAGE) à ampérage constant (20 mA par gel, Mighty Small II, Hoefer Scientific Instrument, San Francisco) pendant environ 2 h, jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel.

### **.VI.3 Western blot**

Après migration sur un gel SDS-PAGE, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF à l'aide d'une solution de CAPS-méthanol (10 mM CAPS, 10 % méthanol, pH 11) à 35 V pendant 16 h à 4°C. Pour cela, le gel et la membrane sont mis en contact direct. Ils sont entourés de deux épaisseurs de papier Whatman puis d'éponges imbibées de la solution CAPS-méthanol. Le montage est maintenu par une grille en plastique, et placé dans une cuve de migration verticale contenant le CAPS-méthanol.

A l'issue du transfert, les sites libres de la membrane sont saturés par une solution de PBS-TB (PBS : 115 mM NaCl, 4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,3, additionné de 0,1% Tween-20 (PBS-T) et 1 % BSA (PBS-TB)) pendant 1 h à température ambiante. Ensuite, l'anticorps primaire dirigé contre la GFP (A6455 Invitrogen) reconnaissant également la YFP, produits dans le lapin, utilisé à la dilution 2000 dans du PBS-TB, est incubé pendant 2 h à température ambiante. Après deux lavages successifs de 10 min au PBS-T, l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin (A6154 Sigma), couplé à la peroxydase, dilué 10000 fois dans du PBS-TB, est incubé pendant 1 h à température ambiante. Après quatre rinçages successifs de 5 min au PBS 1X, la présence des protéines est révélée par chemiluminescence catalysée par la peroxydase (Supersignal West Pico chemiluminescent substrate, Thermo scientific) et détectée par un imageur Fujifilm life science LAS3000 pour évaluer le temps d'exposition nécessaire pour visualiser les bandes, puis par impression sur un film radiographique (chemiluminescence biomax, Kodak).

Les protéines glycosylées ont été détectées à l'aide du kit GE Healthcare, Amersham, ECL "glycoprotein detection system". Brièvement, la membrane est incubée 20 min à l'obscurité dans une solution contenant 10 mM de métapériodate de sodium dissout dans



100 mM de tampon acétate, pH 5,5, de façon à exposer les groupements glycosylés. La membrane est ensuite incubée dans 25 nM de biotine hydrazide diluée dans 100 mM de tampon acétate pH 5,5. Puis, les sites libres de la membrane sont saturés par 5 % d'agent bloquant (1 g de lait déshydraté dans 20 mL de PBS) pendant 1 h. La membrane est incubée dans une solution de streptavidine couplée à la peroxydase et diluée 6000 fois dans du PBS, pendant 30 min. Toutes les étapes sont réalisées à température ambiante et sont suivies par trois rinçages successifs au PBS pendant 5 min. La présence des protéines glycosylées est révélée par chemiluminescence catalysée par la peroxydase (Supersignal West Pico chemiluminescent substrate, Thermo scientific) et détectée par un imageur Fujifilm life science LAS3000 pour évaluer le temps d'exposition nécessaire pour visualiser les bandes, puis par impression sur un film radiographique (chemiluminescence biomax, Kodak).

#### **.VI.4 ELISA**

Dans cette étude, le dosage ELISA est utilisé pour quantifier de façon relative la variation de la quantité des aquaporines en réponse à un traitement. Il est réalisé avec les protéines microsomales (paragraphe V.1.). Il est effectué en plaque 96 puits (Maxi-Sorp Immuno Plate, Nunc, Danemark). Une quantité initiale de 2 µg de protéines est diluée dans du tampon carbonate-bicarbonate 0,1 M (0,33 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,66 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,5) à hauteur de 0,01 µg/µl. Des dilutions successives d'un facteur 2 de 100 µl sont déposées en triplicats sur la plaque. Après fixation des protéines pendant 2 h à 37°C ou sur la nuit 4°C, les sites libres sont saturés par du PBS-TB (voir paragraphe VI.3.) pendant 30 min à 37°C. L'anticorps primaire dilué dans du PBS-TB est ensuite incubé pendant 1 h à 37°C. Trois anticorps primaires produits dans le lapin sont utilisés au cours de cette étude : un anticorps dirigé contre la GFP, reconnaissant également la YFP, utilisé à la dilution 1000 (A6455 Invitrogen); un anticorps dirigé les aquaporines *AtPIP1;1*, *AtPIP1;2*, *AtPIP1;3* et *AtPIP1;4*, utilisé à la dilution 2000; et un anticorps dirigé contre les aquaporines *AtPIP2;1*, *AtPIP2;2* et *AtPIP2;3*, utilisé à la dilution 2000. Après trois rinçages successifs des puits au PBS-T, l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (A6154 Sigma), dilué 2500 fois dans du PBS-TB, est incubé pendant 1 h à 37°C. Après trois rinçages successifs au PBS 1X, la quantité d'anticorps fixés aux protéines est révélée par la réaction de la peroxydase avec l'ABTS (2,2'-Azino-bis-3-ethylBenzThiazoline-6-Sulphonic acid) dans un milieu adéquat (1 mM ABTS, 9 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,1 M acide citrique, pH 4,35) par lecture d'absorbance à 405 nm dans un lecteur de microplaques (Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel counter, Perkin Elmer life sciences).



Pour chaque série de dilutions, la relation entre la quantité de protéines et l'absorbance est établie. La quantité relative des protéines présentes est déterminée par comparaison des pentes des droites de régression dans la partie non saturante de la relation.

## **.VII ETUDE DE SPECTROMETRIE DE MASSE**

Les analyses de MS ont été réalisées en collaboration avec le Laboratoire de Protéomique Fonctionnelle (LPF, direction Michel Rossignol), par J. Vialaret. Les étapes que j'ai pris en charge ont été réalisées avec l'aide de Valérie Rofidal (LPF). Concernant l'analyse des données de (phospho)-protéomique, j'ai pris en charge les données concernant les aquaporines et J. Vialaret l'ensemble des autres protéines.

### **.VII.1 Digestion des protéines en gel (M. di Pietro et V. Rofidal, ou J. Vialaret)**

Dans le but de séquencer les protéines présentes dans un gel d'acrylamide, les protéines sont fixées dans le gel avec une solution contenant 30 % d'éthanol et 10 % d'acide acétique, pendant 1 h sous agitation. Le gel est ensuite coloré avec du bleu colloïdal (20 % d'éthanol et 80 % de bleu colloïdal). Enfin, les zones d'acrylamide contenant des protéines sont découpées bande par bande. Les morceaux sont ensuite lavés en présence de 25 mM de tampon carbonate et contractés en présence d'acétonitrile (ACN) pur selon Santoni *et al.*, 2003. Brièvement, les ponts di-sulfures sont réduits par 10 mM de DTT puis les cystéines sont alkylées par 55 mM d'iodoacétamine (IAA). Les protéines sont digérées en gel par 12,5 ng de trypsine (Promega) par bande de protéines microsomales, à 37°C toute la nuit. Le surnageant tryptique est conservé et les peptides restant dans le gel sont extraits par 2 % d'acide formique sous sonication pendant 15 min.

### **.VII.2 Digestion des protéines en solution (J. Vialaret)**

La technologie FASP (Filter Aided Proteome Preparation, [209]) a été utilisée pour éliminer le SDS présents dans les extraits microsomaux et conditionner les échantillons pour une digestion enzymatique. Pour cela, des filtres (Amicon Ultracel<sup>®</sup>-30K membrane, Millipore UFC503096) sont rincés par 500 µl d'eau ultra pure et conditionnés par 200 µl de tampon urée (8 M urée, 10 % acétonitrile (v/v), 100 mM Tris HCl, pH 8,5). Les protéines solubilisées sont incubées en présence de 200 µl de tampon urée pendant 10 min, chargées sur un filtre puis centrifugées pendant 3 min à 14000 g. Le SDS est éliminé progressivement par deux rinçages successifs avec du tampon urée puis par centrifugation pendant 3 min à 14000 g. Contrairement au SDS, l'urée est compatible avec la digestion enzymatique. Ensuite



les échantillons sont réduits par 250 µl d'une solution de DTT à 10 mM dans du tampon urée pendant 1 h à 37°C puis centrifugés 3 min à 14000 g. L'excès de DTT est éliminé avec 250 µl de tampon urée centrifugés 3 min à 14000 g, et ce, deux fois de suite. Les échantillons sont ensuite alkylés par 250 µl d'IAA 50 mM dans du tampon urée et incubés 30 min à 37°C avant d'être centrifugés 3 min à 14000 g. Cette étape permet de bloquer les protéines dans un état déstructuré. De même qu'après la réduction au DTT, l'excès d'IAA est éliminé avec 250 µl de tampon urée centrifugés 3 min à 14000 g. Cette étape est répétée deux fois.

Le tampon urée est ensuite échangé avec un tampon de bicarbonate d'ammonium 50 mM permettant une bonne activité des enzymes de digestion utilisées : la trypsine, l'endolysine-C (LysC), la chymotrypsine et l'AspN. Deux doubles digestions sont menées :

- EndolysineC/Trypsine (LysC/trypsine) : la LysC, dont le site de coupure est la lysine, est utilisée dans 250 µl de tampon de 50 mM de bicarbonate d'ammonium, selon un rapport 1:50 (enzyme:protéine), pendant 4 h à 37°C. Ensuite, la trypsine, dont les sites de coupure sont les lysines et arginines, est ajoutée selon un rapport 1:50 (enzyme:protéine), pendant la nuit à 37°C. La LysC est utilisée pour effectuer une première digestion des protéines et ainsi augmenter l'efficacité de la digestion trypsique.

- Chymotrypsine/AspN (Chymo/AspN) : La chymotrypsine, dont les sites de coupure sont le tryptophane, la phénylalanine, la tyrosine et la leucine, est utilisée dans 250 µl de tampon de 50 mM de bicarbonate d'ammonium, selon un rapport 1:50 (enzyme:protéine), pendant 5 h à 25°C. Ensuite, l'AspN, dont le site de coupure se situe en N-terminal de l'acide aspartique, est ajoutée selon un rapport 1:150 (enzyme:protéine), pendant la nuit à 25°C. Cette digestion a pour but d'améliorer la couverture de séquence de l'ensemble des aquaporines.

### **.VII.3 Dessalage sur colonne C18 (J. Vialaret)**

Les échantillons digérés sont dessalés à l'aide de colonnes Sep-Pak<sup>®</sup> Vac 1cc (100 mg) C18 Cartridges (Waters, WAT036820) qui sont conditionnées par l'addition de 200 µl d'une solution A (70 % ACN (v/v), 30 % acide trifluoroacétique (TFA) 0,1 % (v/v)), puis 300 µl d'une solution B (0,1 % TFA(v/v)). Les échantillons digérés sont resuspendus avec 200 µl de solution A et chargés sur les colonnes. Après deux rinçages par 200 µl de solution B, les peptides sont élués avec 200 µl de solution A et séchés avant d'être conservés à -20°C.

### **.VII.4 Fractionnement selon la charge : Strong Cation Exchange (J. Vialaret)**

Le digestat peptidique est chargé sur une colonne échangeuse de cations (SCX, PL-SCX 1000A; 5µm; 50 x 2,1mm, Varian) (25 mM NH<sub>4</sub>OH, 30 % ACN, pH 2,7). Les peptides sont

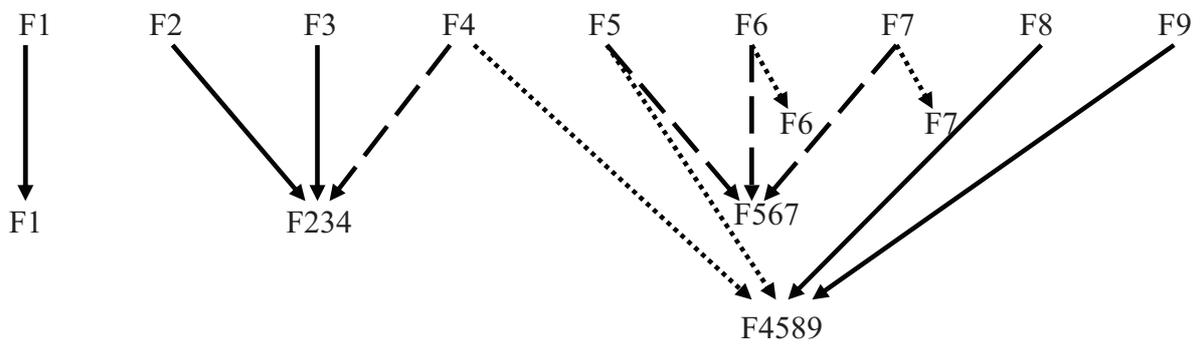


Figure 7 : Regroupement des fractions issues du fractionnement sur colonne SCX.

Le digestat peptidique est chargé sur une colonne SCX et séparé en neuf fractions qui sont ensuite regroupées pour l'analyse en MS selon le schéma décrit. Les flèches pleines indiquent la totalité de la fraction est utilisée. Les flèches en tiret et en pointillés indiquent que respectivement 90 % et 10 % de la fraction ont été utilisés.

élués par un gradient de 25 à 800 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (pH 2,7). La colonne est lavée par 10 mM d'hydrogencarbonate d'ammonium, 800 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 30 % ACN, pH 9. Neuf fractions sont collectées.

### **.VII.5 Enrichissement des phosphopeptides (J. Vialaret)**

Deux colonnes de dioxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ) de tailles différentes sont préparées dans des cônes Gel Loader (Eppendorf) pour chaque échantillon : une de 1 à 2 mm (250  $\mu\text{g}$  de  $\text{TiO}_2$ ) et une de 3 à 4 mm (600  $\mu\text{g}$  de  $\text{TiO}_2$ ). Les colonnes sont lavées par le tampon de lavage (80 % ACN et 1 % TFA) puis conditionnées par le tampon de chargement contenant 75 % de tampon de lavage et 25 % d'acide lactique. Cet acide est un compétiteur des peptides contenant les acides aminés carboxylés (D et E), eux-mêmes compétiteurs des peptides phosphorylés pour l'accrochage sur la colonne. Les échantillons sont dissous dans le tampon de chargement puis chargés sur la petite colonne de titane, elle-même installée dans la grande colonne. Les colonnes sont lavées pour retirer l'acide lactique qui gêne l'analyse en MS. Les peptides phosphorylés sont élués successivement par les tampons d'éluion à 0,5 %  $\text{NH}_4\text{OH}$ , puis à 5 %  $\text{NH}_4\text{OH}$ , et enfin à 5 %  $\text{NH}_4\text{OH}$  et 20 % ACN. Les échantillons sont enfin acidifiés par de l'acide formique pur pour stabiliser les phosphorylations, puis séchés.

### **.VII.6 Regroupement des fractions**

Une étude réalisée préalablement par J. Vialaret a permis de localiser les phosphopeptides dans les neuf fractions issues de la SCX. La première fraction (F1) est enrichie en peptides multiphosphorylés, les fractions suivantes (F2, F3 et F4) en phosphopeptides comprenant un résidu K ou R et qui ont une charge globale de  $z=1$ ; et les fractions F5, F6 et F7 en phosphopeptides comprenant deux ou trois résidus K ou R et qui ont une charge globale de  $z=2$ . Les fractions F8 et F9 ne contiennent pas de phosphopeptides. Les fractions sont regroupées de la façon suivante (figure 7):

- F1 : 100 % F1,
- F234 : 100 % F2 + 100 % F3 + 90 % F4,
- F567 : 90 % F5 + 90 % F6 + 90 % F7,
- F4589 : 10 % F4 + 10 % F5 + 100 % F8 + 100 % F9,
- F6 : 10 % F6,
- F7 : 10 % F7.

Les fractions F1, F234 et F567 sont ensuite enrichies en phosphopeptides alors que les fractions F4589, F6 et F7 sont directement analysées en LC-MS/MS (paragraphe suivant).



## **.VII.7 Spectrométrie de masse**

Les données de MS de ce travail de thèse ont été obtenues à partir de plantes traitées par le NaCl, le NO, la carence en phosphate ou la réalimentation en cet ion.

### **.VII.7.a Identification de protéines (M. di Pietro et V. Rofidal, ou J.Vialaret)**

Les échantillons préparés comme cela est détaillé dans le paragraphe VII.1. sont analysés par LC-MS/MS à l'aide d'un spectromètre de masse de type trappe ionique 3D (HCT, High Capacity Trap, Esquire, Bruker) interfacé avec un système HPLC de type Chip Cube pour la nano LC (Agilent). Les spectres de masses sont annotés par le logiciel Flex-Analysis, puis analysés avec le logiciel Peak Erazor de façon à retirer les peptides artéfactuels tels que ceux issus de la kératine. Les peptides d'aquaporines sont repérés à l'aide du logiciel FindMod, à partir d'une base de données regroupant les 35 aquaporines d'*Arabidopsis* (<http://us.expasy.org/tools/findmod/>). De plus, ce logiciel permet de sélectionner des peptides modifiés par l'incrément de masse induit par une modification (exemple: + 80 Da pour une phosphorylation).

### **.VII.7.b Quantification de protéines (J. Vialaret)**

Les peptides sont analysés par spectrométrie de masse avec un système LC-MS/MS. Le système est composé d'une colonne de chromatographie de type nanoLC (U3000, Dionex) couplée à un spectromètre de masse de type QTOF (MaXis, Bruker).

Les peptides sont chargés sur une pré-colonne qui a pour but de les dessaler et de les concentrer. Cette étape est réalisée à un débit de 20 µL/min de phase A (98 % H<sub>2</sub>O, 2 % ACN et 0,1 % d'acide formique) pendant 3 min. Les peptides sont ensuite séparés sur une colonne en phase inverse. La pré-colonne et la colonne chromatographique sont de la marque Dionex C18 PepMap100 avec comme caractéristiques respectives 300 µm de diamètre x 5 mm de longueur, 5 µm de diamètre pour les billes de silice, 100 Å de porosité entre les billes, et 75 µm de diamètre x 250 mm de longueur, 3 µm de diamètre pour les billes de silice, 100 Å de porosité entre les billes pour la deuxième colonne. Le gradient de 140 min à 0,3 µl/min démarre par 2 % de phase B (10 % H<sub>2</sub>O, 90 % ACN et 0,1 % d'acide formique), monte à 8 % en 5 min puis à 27 % en 99 min. La colonne est ensuite rincée avec 90 % de phase B et ré-équilibrée avec 98 % de phase A pendant 19 min.

Le spectromètre de masse de type QTOF (MaXis, Bruker) fonctionne avec une source *ElectroSpray Ionization* (ESI) opérant en mode positif. Le « ESI nano Sprayer » requiert une



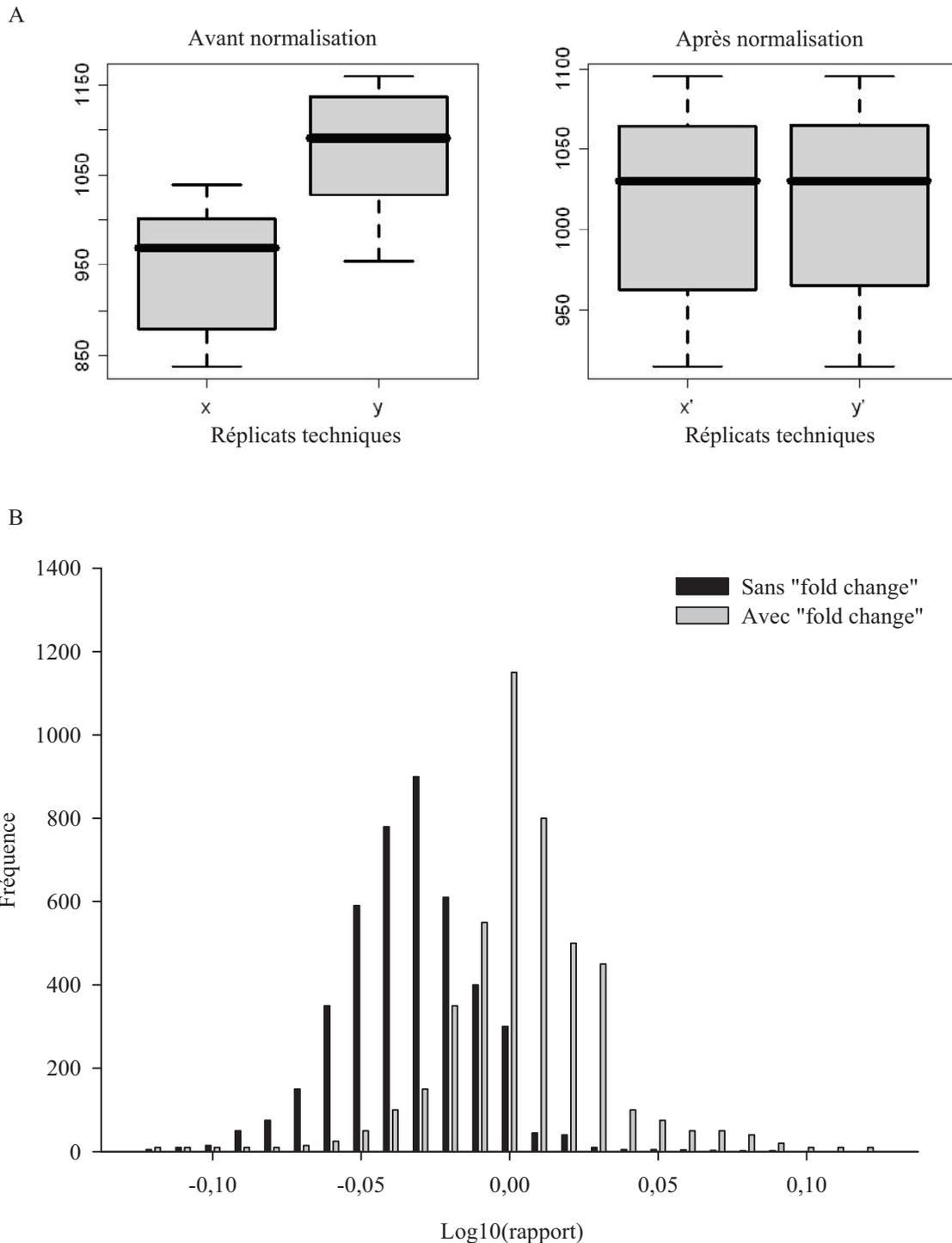
tension de capillaire de 5000 V, une pression en gaz de nébulisation (azote) de 0,4 bar et une température de 140°C. Le type de fragmentation utilisé est le *Collision-Induced Dissociation* (CID).

## **.VII.8 Analyse des données de (phospho)-protéomique**

### **.VII.8.a Identification des protéines et de leur(s) site(s) de phosphorylation**

Les données obtenues par analyse LC-MS/MS sont interrogées par le logiciel Mascot 2.2.04 ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) *via* le logiciel ProteinScape (Bruker Daltonics), d'une part contre une base de données spécifique des aquaporines comprenant les 35 membres et d'autre part contre Tair9 (<http://www.arabidopsis.org>), une base de données concernant l'ensemble des protéines d'Arabidopsis. Les paramètres d'interrogation sont les suivants : digestion par la trypsine avec un clivage manqué admis, une tolérance de 20 ppm sur le peptide parent et de 0,05 Da sur les fragments MS/MS. La carbamidométhylation des cystéines est sélectionnée comme modification fixe. Les modifications variables sélectionnées sont les suivantes : l'acétylation en position N-terminale, la déamidation des asparagines et glutamines, l'oxydation des méthionines, la phosphorylation des sérines, thréonines et tyrosines, l'acétylation, la diméthylation et la formylation des lysines, et enfin la méthylation des acides aspartiques et glutamiques et des sérines. Elles sont ensuite répertoriées dans le logiciel Protein Scape. Les résultats sont organisés par fraction (F1, F234, F567, F4589, F6 et F7), chacune regroupant les protéines et peptides correspondants identifiés dans au moins une situation biologique. Pour chaque peptide, le logiciel ProteinScape répertorie sa séquence, sa position dans la séquence protéique, sa (ses) MPTs, son score d'identification Mascot, son taux de variation entre les deux situations comparées et la p-value correspondante, le rapport  $m/z$  et le temps de rétention de l'ion, la variation entre les rapports  $m/z$  et les temps de rétention obtenus par la MS et la MS/MS. La liste de protéines et peptides identifiés est exportée vers un fichier Excel, dans lequel les données de quantification relative sont reportées.

La position des sites de phosphorylation ne peut pas être systématiquement identifiée sans ambiguïté avec l'instrumentation LC-MS/MS utilisée. Ceci est dû à la fragmentation en mode CID qui induit souvent la perte du groupement phosphate. En confrontant les fragments MS/MS expérimentaux aux fragments MS/MS théoriques obtenus *in silico*, l'algorithme PhosCalc [210] a été utilisé pour calculer la probabilité de position des sites de phosphorylation. Les probabilités de phosphorylation de tous les sites candidats du



**Figure 8 :** Normalisation des données de protéomique quantitative (fournies par Bruker Daltonics).

(A) Les données sont normalisées dans un premier temps par la méthode dite de "quantile" qui s'applique aux données brutes qui sont les aires sous les pics obtenues par MS. Elle permet d'obtenir des médianes de même valeur pour l'ensemble des jeux de données à comparer.

(B) Dans un deuxième temps, les données sont normalisées par la méthode dite de "*fold change*" qui permet de centrer la valeur médiane de l'ensemble des rapports sur 1.

phosphopeptide, calculées sous forme de score par Phoscale, ont été extraites. Les scores de valeurs inférieures de 5 à la valeur du plus fort score sont ignorés [211]. Dans le cas où plusieurs formes présentent la même probabilité (exemple : S<sub>x</sub> et S<sub>y</sub>), le peptide est considéré comme présent dans l'échantillon soit la forme S<sub>x</sub>, soit sous la forme S<sub>y</sub>, soit sous la forme d'un mélange de S<sub>x</sub> et S<sub>y</sub>.

### **.VII.8.b Normalisation des données quantitatives**

La technique de quantification relative sans marquage, basée sur l'intensité des pics de LC-MS, permet de comparer l'abondance relative de peptides entre deux situations. Pour chaque situation, six réplicats ont été analysés : trois réplicats biologiques issus de cultures indépendantes avec deux réplicats techniques chacun (au niveau de l'injection dans le spectromètre de masse).

La normalisation des données est effectuée par le logiciel Profile Analysis (Bruker Daltonics) à deux niveaux. La première méthode de normalisation appliquée est la méthode dite "quantile" qui normalise les données brutes (intensité des pics peptidiques obtenus en MS) de l'ensemble des six réplicats des deux conditions à comparer. Il en résulte que les médianes des deux conditions ont la même valeur (figure 8A). Ainsi, la variabilité technique est minimisée. La deuxième méthode de normalisation est celle dite "*fold change*". Elle est effectuée sur les rapports quantitatifs calculés à partir de l'intensité des pics et permet de centrer la médiane de l'ensemble des rapports quantitatifs sur 1 (figure 8B).

Ces deux étapes de normalisation permettent de prendre en compte la variabilité et d'augmenter la qualité de l'analyse statistique afin de mettre en évidence des variations quantitatives spécifiquement induites par les traitements.

### **.VII.8.c Calcul des rapports quantitatifs**

Pour chaque peptide quantifié dans au moins trois réplicats sur six par condition, le logiciel ProfileAnalysis calcule un rapport quantitatif à partir des aires sous les pics. Les points aberrants sont retirés manuellement et le logiciel ProfileAnalysis calcule le nouveau rapport quantitatif et la p-value associée.



## **.VIII ANALYSE STATISTIQUE**

### **.VIII.1 Tests statistiques**

Des tests de Student ont été réalisés avec le logiciel SigmaPlot (Systat software) pour comparer des données deux à deux et évaluer la significativité de la différence mesurée.

### **.VIII.2 Représentation des données de (phospho)-protéomique quantitative**

Les classifications hiérarchiques permettent de regrouper les traitements en fonction de leur effet sur les peptides, et les peptides en fonction de leur réponse aux traitements. Elles ont été réalisées avec le logiciel PermutMatrix [212]. Pour cela, les rapports quantitatifs sont tous rapportés au contrôle général (C) arbitrairement de valeur 1. Par exemple, la valeur du traitement  $\text{NaCl}_{1/2}$  correspond à la valeur du rapport  $\text{NaCl}_{1/2}/\text{C}$ .

Dans le cas du traitement par le DEA-NO, le contrôle est le standard DEA-NO, et dans le cas de la réalimentation en phosphate, le contrôle est la carence en phosphate. Dans ces deux cas, le rapport quantitatif considéré est multiplié par le rapport quantitatif du contrôle correspondant pour que l'ensemble des traitements soit rapporté au même contrôle. Ensuite, les données sont centrées et réduites pour chaque peptide selon l'équation suivante :  $\text{Valeur} = [(\text{Valeur}) - \text{Moyenne}(\text{Ligne})]/[\text{Déviation Standard}(\text{Ligne})]$ . Les distances euclidiennes sont ensuite calculées:  $(\sum |x-y|^2)^{1/2}$ . Les classifications hiérarchiques sont calculées selon la méthode de McQuitty [la distance d'un regroupement de deux classes A et B à une troisième C est égale à la moyenne, non pondérée, des deux distances séparant chacune des classes regroupées à la troisième  $d(\text{AUB}) = 1/2(d(\text{A,C}) + d(\text{B,C}))$ ] et de Ward's [A chaque étape de l'agrégation des classes, on cherche à faire varier le moins possible l'inertie intra-classe résultant de l'agrégation de deux classes].



**REGULATION DE LA CONDUCTIVITE HYDRAULIQUE  
RACINAIRE PAR DES TRAITEMENTS BIOTIQUES,  
ABIOTIQUES ET NUTRITIONNELS**

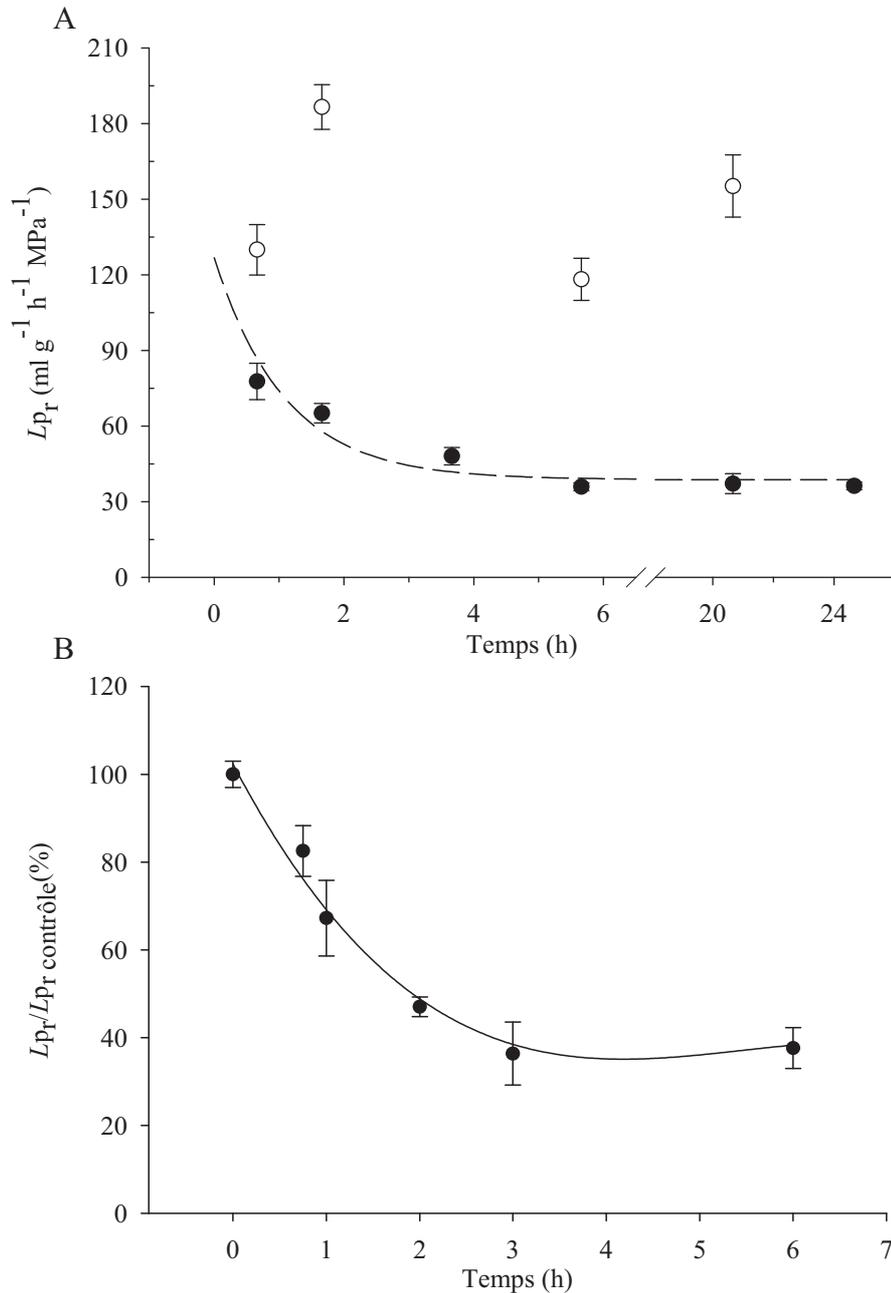


L'absorption de l'eau du sol par les racines est un processus central du maintien du statut hydrique des plantes. La conductance hydraulique racinaire ( $L_0$ ) traduit la capacité globale de la racine à transporter l'eau. En rapportant cette conductance à la surface racinaire, on obtient la  $L_{p_r}$  qui traduit la facilité du passage de l'eau à travers un segment élémentaire de racine. Des travaux effectués sur diverses espèces végétales ont montré que ce paramètre est modulable en fonction de l'état de développement de la plante, de son état nutritionnel, en réponse à des hormones ou à des contraintes environnementales. Cette variation de la  $L_{p_r}$  par des stimuli peut être corrélée à une altération de l'expression des gènes d'aquaporines ainsi qu'à l'abondance et l'état de MPT de ces protéines. Ainsi, des études menées au laboratoire ont montré que divers contextes environnementaux tels que le traitement par le NaCl (figure 9) [115], l' $H_2O_2$  (figure 10) [98] et une anoxie [111] inhibent la  $L_{p_r}$  d'*Arabidopsis*.

Dans ce chapitre, il s'agit d'étendre cette étude à un panel plus large de traitements pour identifier de nouveaux contextes représentatifs des différentes contraintes environnementales susceptibles de moduler la  $L_{p_r}$  et donc de réguler les aquaporines. Ces contextes seront ensuite utilisés pour étudier les bases moléculaires de ces régulations.

## **I MESURE DU TRANSPORT D'EAU RACINAIRE**

Les mesures du transport d'eau racinaire sont effectuées par la technique de la chambre à pression (figure 6). Il s'agit de mesurer le flux d'eau au travers d'un appareil racinaire excisé placé dans une chambre étanche mise sous pression. Deux types de mesures sont réalisés. L'un permet de mesurer les variations de la  $L_{p_r}$  à partir de la relation entre le flux de sève exudée ( $J_v$ ) et le gradient de pression imposé ( $\Delta P$ ). Il s'effectue selon un protocole de mesure de flux à trois pressions : 320 kPa, 160 kPa puis 240 kPa. En appliquant ces trois pressions successivement, une relation linéaire doit être obtenue entre  $J_v$  et  $\Delta P$ . Cependant, la pente est faussée si l'appareil racinaire est abîmé. Dans le cas des traitements par du NaCl et du mannitol, qui affectent le potentiel osmotique de la solution de mesure, les trois pressions utilisées sont 720 kPa, 560 kPa puis 640 kPa dans le but de compenser la pression osmotique imposée par la solution de traitement. Les mesures considérées permettent en premier lieu de mesurer  $L_0$ . La  $L_{p_r}$  est obtenue en rapportant la conductance à la masse racinaire (Matériel et méthodes II). Toutefois, ce type de protocole à trois pressions ne peut pas être utilisé lors de traitements provoquant une variation de  $L_{p_r}$  plus rapide que le temps requis par le protocole, qui donnerait alors une relation non linéaire entre  $J_v$  et  $\Delta P$ . Dans ces conditions, un autre type de mesure est effectué. Il consiste à mesurer les variations de  $J_v$  au cours du temps à la



**Figure 9 :** Cinétiques de variation de la  $L_{pr}$  en réponse à des traitements osmotiques.

**(A) Effet du sel.**

Les plantes ont été transférées au temps 0 dans une solution hydroponique standard (points blancs) ou contenant 100 mM de NaCl (points noirs). Le temps de traitement inclut les 30 à 40 min nécessaires à la préparation de la racine excisée pour la mesure en chambre à pression. La courbe en pointillés représente un lissage exponentiel des valeurs de  $L_{pr}$  au cours du traitement salin [98].

**(B) Effet du mannitol.**

Les plantes ont été transférées au temps 0 dans une solution hydroponique standard (points blancs) ou contenant 200 mM mannitol (points noirs). La courbe représente un lissage polynomial des valeurs de  $L_{pr}$  au cours du traitement. Les données représentent les valeurs moyennes  $\pm$  ES du pourcentage de la  $L_{pr}$  initiale précédant le traitement ( $191,4 \pm 18,9 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}.\text{MPa}^{-1}$ ). Les données sont obtenues à partir de trois cultures indépendantes, avec  $n=2$  à 16 plantes.

pression constante de 340 kPa. On peut alors observer des variations de  $J_v$ , et donc de  $Lp_r$ , dès les premières secondes suivant l'application d'un traitement.

Les plantes utilisées sont cultivées en conditions de jours longs, en utilisant jusqu'à trois cultures de façon à analyser des réplicats biologiques indépendants. Les temps de traitement annoncés dans les paragraphes suivants ne prennent pas en compte les 20 minutes de préparation de l'appareil racinaire pour la mesure en chambre à pression.

## **.II STRESS OSMOTIQUES**

Un stress salin provoque en premier lieu une diminution du potentiel hydrique de la solution du sol, menaçant ainsi l'approvisionnement en eau des plantes. Par ailleurs, du fait de la toxicité des ions  $Na^+$ , la pénétration du NaCl dans les tissus peut perturber le fonctionnement physiologique des cellules.

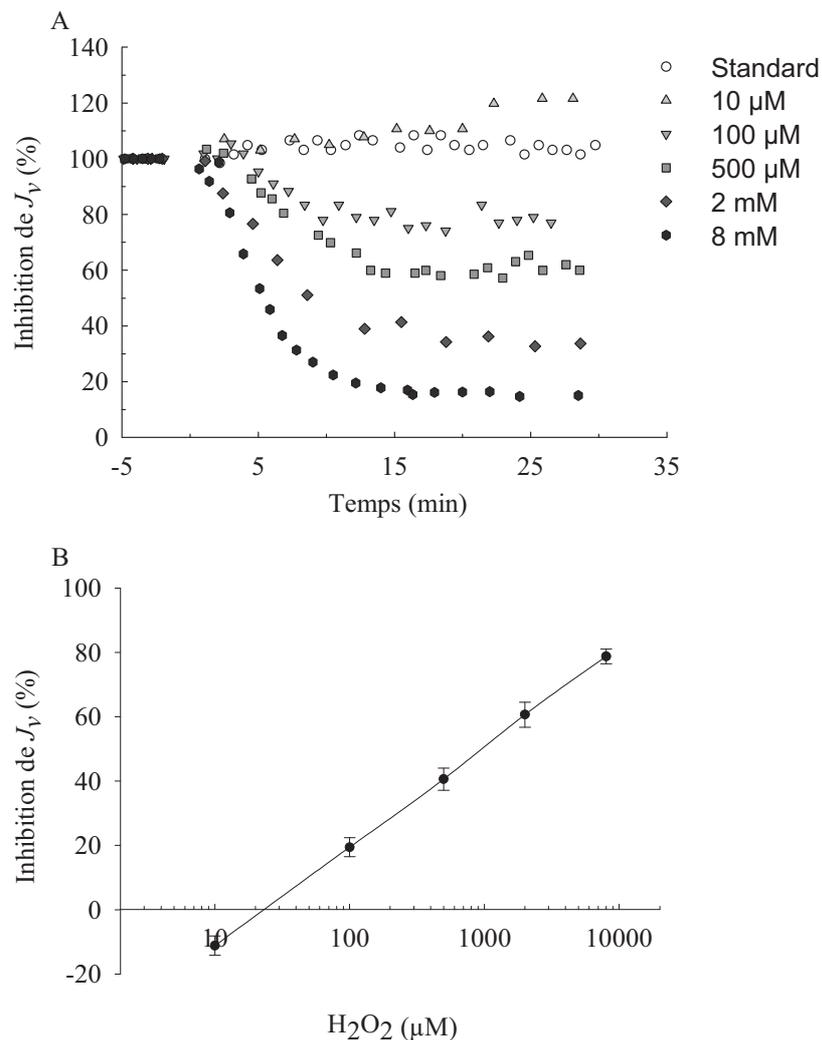
### **.II.1 NaCl**

Un travail précédent du laboratoire a montré qu'un traitement par 100 mM de NaCl diminue la  $Lp_r$  de 70 %, avec un temps de demi-effet de 45 min (figure 9A) [115]. L'inhibition provoquée par ce traitement est marquée mais non maximale. En effet, un traitement par 150 mM de NaCl provoque une inhibition encore plus forte de la  $Lp_r$  [115]. Alors que de fortes concentrations de sel (200 mM) bloquent totalement la croissance racinaire, celle-ci n'est inhibée que de 50 % à une concentration de 100 mM [213]. Ainsi, un traitement par 100 mM de NaCl correspond à un contexte physiologique viable pour la plante et représente une situation physiologique cohérente pour étudier la régulation des aquaporines (thèse de Yann Boursiac, 2005).

### **.II.2 Mannitol**

Dans le but de différencier les effets sur la  $Lp_r$  de la toxicité ionique et de l'hyperosmolarité du traitement par 100 mM NaCl, la réponse à un traitement hyperosmotique équivalent a été étudiée en traitant les plantes par 200 mM de mannitol. Les plantes maintenues dans une solution hydroponique standard ont une  $Lp_r$  moyenne de  $191,4 \pm 18,9 \text{ ml.g}^{-1}.\text{h}^{-1}.\text{MPa}^{-1}$ . Le traitement des plantes par une même solution hydroponique standard additionnée de 200 mM de mannitol induit après 45 min, 1 h, 2 h, 3 h et 6 h une diminution de la  $Lp_r$ , de respectivement, 17,5 %, 32,7 %, 53 %, 63,6 % et 62 % (figure 9B).

Les traitements par 100 mM de NaCl et 200 mM de mannitol induisent une diminution de la  $Lp_r$  du même ordre de grandeur, respectivement 70 % [115] et 63 % (ce travail). Cette



**Figure 10 :** Variations de  $J_v$  induites par un traitement par  $\text{H}_2\text{O}_2$  (d'après [115]).

(A) Variation de  $J_v$  en fonction du temps et de la dose du traitement par  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Le graphique présente un enregistrement représentatif de la variation de  $J_v$  en condition contrôle (cercles vides) ou en présence de 10  $\mu\text{M}$  (triangles orientés vers le haut), 100  $\mu\text{M}$  (triangles orientés vers le bas), 500  $\mu\text{M}$  (carrés), 2 mM (losanges noirs) ou 8 mM (points noirs) d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , exprimée en pourcentage du flux initial précédant le traitement.

(B) Pourcentage final d'inhibition de  $J_v$ . Pour chaque plante,  $J_v$  a été déterminé avant et après un traitement de 20 à 30 min par la concentration indiquée en  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Les données représentent la valeur moyenne  $\pm$  ES de  $n = 5$  plantes au minimum, provenant d'au moins deux cultures indépendantes. La valeur moyenne de  $L_{p_r}$  en conditions contrôles est de  $151,4 \pm 8,8 \text{ ml g}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ Mpa}^{-1}$ .

similarité suggère que l'hyperosmolarité est responsable du taux d'inhibition de la  $Lp_r$ . Le temps de demi-inhibition, de respectivement, 45 min et 1 h sont également comparables. Toutefois, le temps de préparation de la racine a été pris en compte dans l'étude menée par Boursiac *et al.* (2005) mais pas dans ce travail, suggérant que la cinétique est retardée dans le cas du traitement par le mannitol, ce qui suggère que la toxicité du traitement NaCl rendrait l'inhibition de la  $Lp_r$  plus précoce [115].

### **.III STRESS OXYDANTS**

Les ROS telles que l' $H_2O_2$  et les RNOS telles que le NO sont reconnues comme jouant un rôle de signalisation cellulaire et comme étant impliquées dans la réponse des plantes à l'environnement. Ainsi, l' $H_2O_2$  est produite en réponse au NaCl et à l'AS [98] et on sait que cette molécule inhibe la  $Lp_r$  [98]. Les RNOS jouent aussi un rôle de signalisation au niveau de la cellule et dans la réponse des plantes à l'environnement, justifiant l'étude des effets du NO sur la  $Lp_r$ .

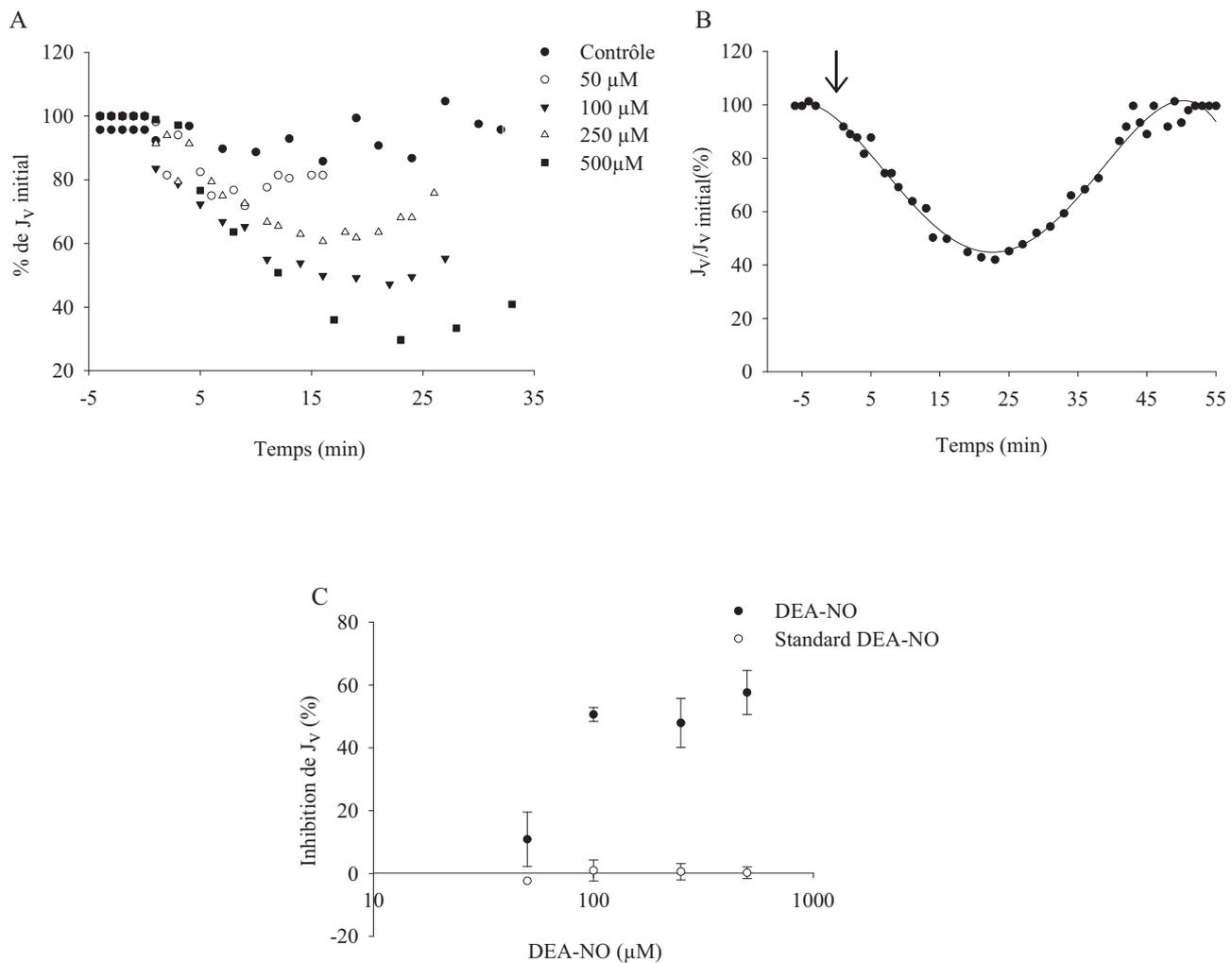
#### **.III.1 $H_2O_2$**

Un travail précédent du laboratoire a montré que le temps de demi-inhibition de la  $Lp_r$  par l' $H_2O_2$  varie en fonction de la concentration appliquée de  $8,8 \pm 0,9$  min (0,1 mM  $H_2O_2$ ) à  $6,3 \pm 0,3$  min (8 mM  $H_2O_2$ , figure 10A) [98]. De plus, l'amplitude d'inhibition par l' $H_2O_2$  est dépendante de sa concentration (figure 10B) [98]. Par exemple, un traitement de 25 min par 0,1 ou 8 mM d' $H_2O_2$  provoque une inhibition de  $Lp_r$  de respectivement 19 % et 79 %. De façon surprenante, l'application de 10  $\mu$ M d' $H_2O_2$  stimule la  $Lp_r$  de 11 % avec un temps de demi-effet de 14,5 min.

Par la suite, une concentration de 500  $\mu$ M d' $H_2O_2$  qui inhibe le flux hydrique racinaire de 41 % avec un temps de demi-inhibition de 8 min, sera utilisé pour l'étude protéomique.

#### **.III.2 Oxyde nitrique (NO)**

Le diéthylamine NONOate (DEA-NO) est une molécule donneuse de NO qui se transforme en 1 à 3,5 min à pH 7,4 et à 30°C [203]. Ce mode de production de NO s'avère donc pertinent pour étudier la réponse rapide de la plante au NO. L'effet de cette molécule est évalué en suivant la variation cinétique de  $J_v$  à la suite de l'application de concentrations croissantes de DEA-NO. Il faut noter que la concentration de NO libérée est différente de la concentration de DEA-NO appliquée : ainsi, 100  $\mu$ M de DEA-NO libèrent 13,1  $\mu$ M de NO en 1,34 min à 30°C dans une solution de tampon phosphate pH 7,4. De plus, la relation entre les



**Figure 11 :** Variations de  $J_v$  induites par un traitement par le DEA-NO

(A) Variations de  $J_v$  en fonction du temps et de la dose du traitement par le DEA-NO. Le graphique présente un enregistrement représentatif de variations cinétiques de  $J_v$  en condition contrôle ( $n=9$ ) ou en présence de 50  $\mu$ M ( $n=3$ ), 100  $\mu$ M ( $n=4$ ), 250  $\mu$ M ( $n=4$ ) ou 500  $\mu$ M ( $n=3$ ) de DEA-NO. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du flux initial précédant le traitement. La valeur moyenne de flux en condition contrôle est de  $7,1 \cdot 10^{-2} \pm 1,5 \cdot 10^{-2} \mu\text{L} \cdot \text{sec}^{-1}$ .

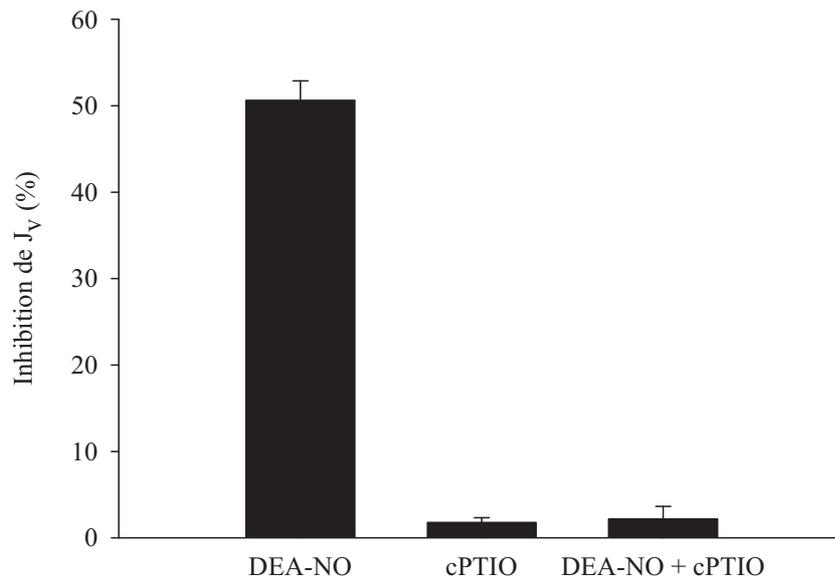
(B) Enregistrement représentatif de la cinétique d'évolution de  $J_v$  suite à l'addition de 100  $\mu$ M de DEA-NO dans la solution baignant la racine (flèche noire).  $J_v$  est exprimé en pourcentage de la valeur moyenne du flux précédant l'application du traitement, qui est de  $9,2 \cdot 10^{-2} \mu\text{L} \cdot \text{sec}^{-1}$ .

(C) Les données représentent le pourcentage maximal d'inhibition de  $J_v \pm \text{ES}$  après traitement par les concentrations indiquées de DEA-NO. Les données sont obtenues à partir de 1 à 3 cultures indépendantes,  $n=3$  à 4 plantes.

concentrations de DEA-NO appliquées et de NO produit est de nature croissante mais saturante [203]. Comme la concentration de NO dans la solution de mesure n'a pas été mesurée expérimentalement au cours de mon travail, les concentrations indiquées dans la suite du manuscrit correspondent à des concentrations en DEA-NO.

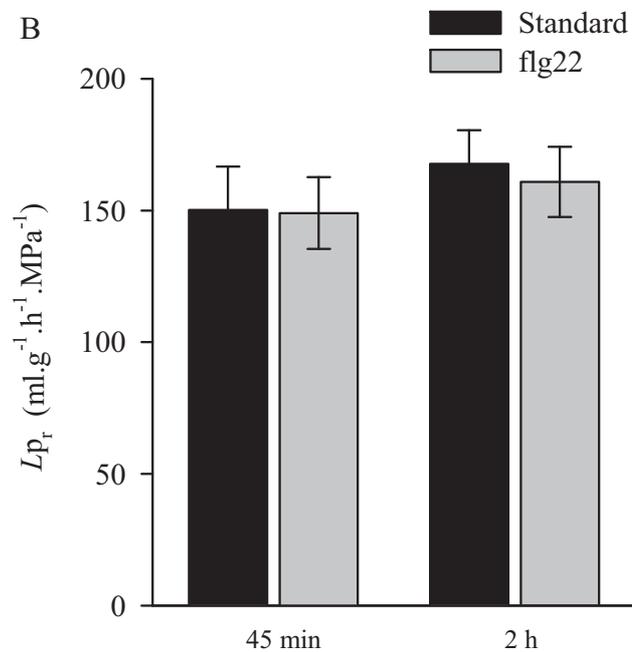
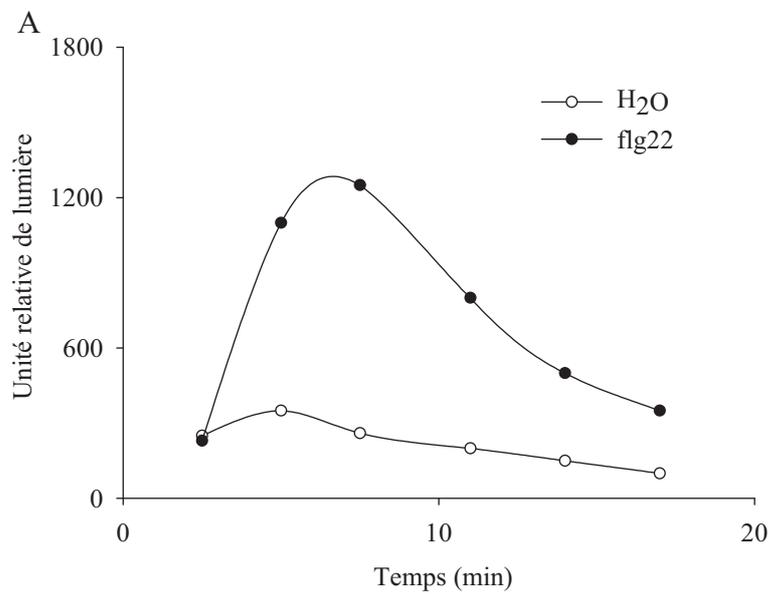
Des concentrations croissantes de DEA-NO allant de 50  $\mu\text{M}$  à 500  $\mu\text{M}$  induisent une inhibition progressive de  $J_v$  au cours du temps (figure 11A). Le temps de demi-inhibition du flux varie en fonction de la concentration en DEA-NO appliquée. Nous avons observé que plus la concentration en DEA-NO appliquée est forte, plus le temps de demi-effet est long :  $9,5 \pm 1,3$  min à 100  $\mu\text{M}$  et  $11,4 \pm 1$  min à 500  $\mu\text{M}$  (figure 11A). Ce résultat est surprenant car plus la concentration en DEA-NO est forte, plus le temps de relargage de la charge en NO est court [203]. Aucune donnée bibliographique ne permet de proposer une hypothèse pour expliquer ces résultats. Dans le cas du traitement par 100  $\mu\text{M}$  de DEA-NO, des cinétiques plus longues ont été réalisées (figure 11B). Lorsque le maximum d'inhibition est atteint,  $J_v$  augmente spontanément jusqu'à atteindre son niveau initial (figure 11B). Cette réversion peut également être provoquée à tout moment en remplaçant le système racinaire dans un milieu dépourvu de DEA-NO (données non montrées). L'application de NO à un appareil racinaire excisé provoque donc une inhibition transitoire du flux hydrique racinaire. L'effet du NO sur les plantes dépend de la balance entre sa production et sa dégradation (pour revue [214]). Il est donc possible que le flux hydrique racinaire soit restauré une fois que les 100  $\mu\text{M}$  de DEA-NO ont été dégradés ou détoxiqués. L'amplitude de l'inhibition du flux varie aussi en fonction de la concentration de DEA-NO appliquée. Ainsi, l'inhibition maximale est de 10,9 % et 57,6 % pour respectivement 50  $\mu\text{M}$  et 500  $\mu\text{M}$  de DEA-NO (figure 11B). Cependant, le traitement par 50  $\mu\text{M}$  de DEA-NO induit une forte variabilité de réponse : le flux d'eau n'est pas systématiquement inhibé. Ceci pourrait être lié à la variabilité de sensibilité des racines, rendant cette concentration trop faible pour assurer systématiquement un effet du DEA-NO (figure 11C). D'autre part, il faut noter que l'enregistrement sélectionné pour le traitement par 250  $\mu\text{M}$  de DEA-NO dans la figure 11A pourrait suggérer que ce traitement provoque une inhibition plus faible du flux hydrique racinaire que le traitement par 100  $\mu\text{M}$ . Cependant, les résultats présentés dans la figure 11C montrent que des traitements par 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  et 500  $\mu\text{M}$  induisent des taux d'inhibition similaires.

La spécificité d'effet du NO a été évaluée en pré-traitant le système racinaire par 100  $\mu\text{M}$  de cPTIO [204, 205]. Le cPTIO, qui libère un atome d'oxygène en faveur du NO :  $\text{cPTIO} + \cdot\text{NO} \rightarrow \text{cPTI} + \cdot\text{NO}_2$ , est utilisé ici comme un piègeur de NO [205]. L'addition de



**Figure 12:** Spécificité de l'effet du DEA-NO sur  $J_v$

Inhibition de  $J_v$  suite à un traitement de 20 min par 100  $\mu\text{M}$  de DEA-NO, d'un traitement de 10 min par 100  $\mu\text{M}$  de cPTIO, ou d'un pré-traitement de 10 min par 100  $\mu\text{M}$  de cPTIO suivi d'un traitement par 100  $\mu\text{M}$  de DEA-NO. L'inhibition du flux est exprimée en pourcentage de  $J_v$  initial précédant le traitement. Les données sont obtenues à partir de trois cultures indépendantes,  $n=2$  à 4 plantes. Les histogrammes montrent les valeurs moyennes  $\pm$  ES.



**Figure 13 :** Production de ROS en réponse à la flagelline (flg22) et effets de l'application de flg22 sur la  $L_{p_r}$ .

(A) Induction par le peptide flg22 d'une production de ROS dans les racines d'Arabidopsis. La figure présente la production de ROS au cours du temps en réponse à l'application de 400 nM de flg22 (Marie Boudsoq, communication personnelle). L'incubation de racines en présence d'un volume équivalent d'eau (H<sub>2</sub>O) a été prise comme contrôle.

(B) Valeurs moyennes de  $L_{p_r} \pm ES$  en conditions standards ou après traitement par 1  $\mu$ M de flg22 pendant 45 min ou 2 h. Les données sont obtenues à partir d'une culture, avec  $n=4$  à 5 plantes. Les histogrammes montrent les valeurs moyennes  $\pm ES$ .



cPTIO dans la solution hydroponie en absence de DEA-NO n'affecte pas  $J_v$  (figure 12). Par contre, l'application de 100  $\mu\text{M}$  de cPTIO contrecarre entièrement l'inhibition provoquée par 100  $\mu\text{M}$  de DEA-NO (figure 12).

Cette étude montre ainsi que le NO inhibe spécifiquement la  $L_{p_r}$  d'Arabidopsis.

Les traitements par 500  $\mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et 125  $\mu\text{M}$  de DEA-NO, qui provoquent une inhibition du flux hydrique racinaire de respectivement environ 40 % et 50 %, avec des temps de demi-inhibition identiques de 8 min, ont été choisis pour la suite de cette étude.

#### .IV STRESS BIOTIQUE

Peu d'études ont exploré le statut hydrique de plantes soumises à des attaques pathogènes. Toutefois, nous pouvons citer deux études qui ont montré que les aquaporines peuvent être régulées dans de telles situations. L'une, menée sur le tabac en interaction avec un nématode parasite, a mis en évidence la stimulation de l'expression d'un gène *TIP* [166]. L'autre, menée sur la tomate en interaction avec le parasite *Cuscuta reflexa*, a montré une induction de l'expression d'une protéine homologue de PIP1 [167]. A ce jour, aucune étude n'est disponible sur la régulation de la  $L_{p_r}$  en réponse à une interaction de la plante avec un pathogène. Cependant, une étude a montré une réponse organisée et spécifique des tissus racinaires d'Arabidopsis en réponse à des molécules microbiennes qui possèdent des épitopes conservés [215] appelés MAMPs pour Microbe-Associated Molecular Patterns, tels que la flagelline bactérienne, des peptidoglycanes, et la chitine [216]. Il nous a donc semblé pertinent d'étudier la régulation de la  $L_{p_r}$  chez Arabidopsis et dans des conditions similaires.

La flagelline est une protéine majoritaire du flagelle bactérien. Une séquence conservée de 22 acides aminés de son extrémité N-terminale (flg22) est décrite pour activer les mécanismes de défense des plantes. Son application permet ainsi de mimer une interaction avec un microorganisme pathogène. Une application de 400 nM de flg22 sur des racines de plantes cultivées en hydroponie induit une production de ROS maximale après 9 min (figure 13A - Marie Boudsocq, communication personnelle). Toutefois, des concentrations de 200 nM et 400 nM de flg22 appliquées pendant 1 h à des appareils racinaires excisés n'altèrent pas  $J_v$  (données non montrées). Pour augmenter la probabilité d'observer un effet sur la  $L_{p_r}$ , 1  $\mu\text{M}$  de flg22 est appliqué à des plantes entières dans leur milieu de culture hydroponique pendant 45 min ou 2 h. Quelque soit le temps d'incubation, aucune variation de la  $L_{p_r}$  n'est observée (figure 13B).

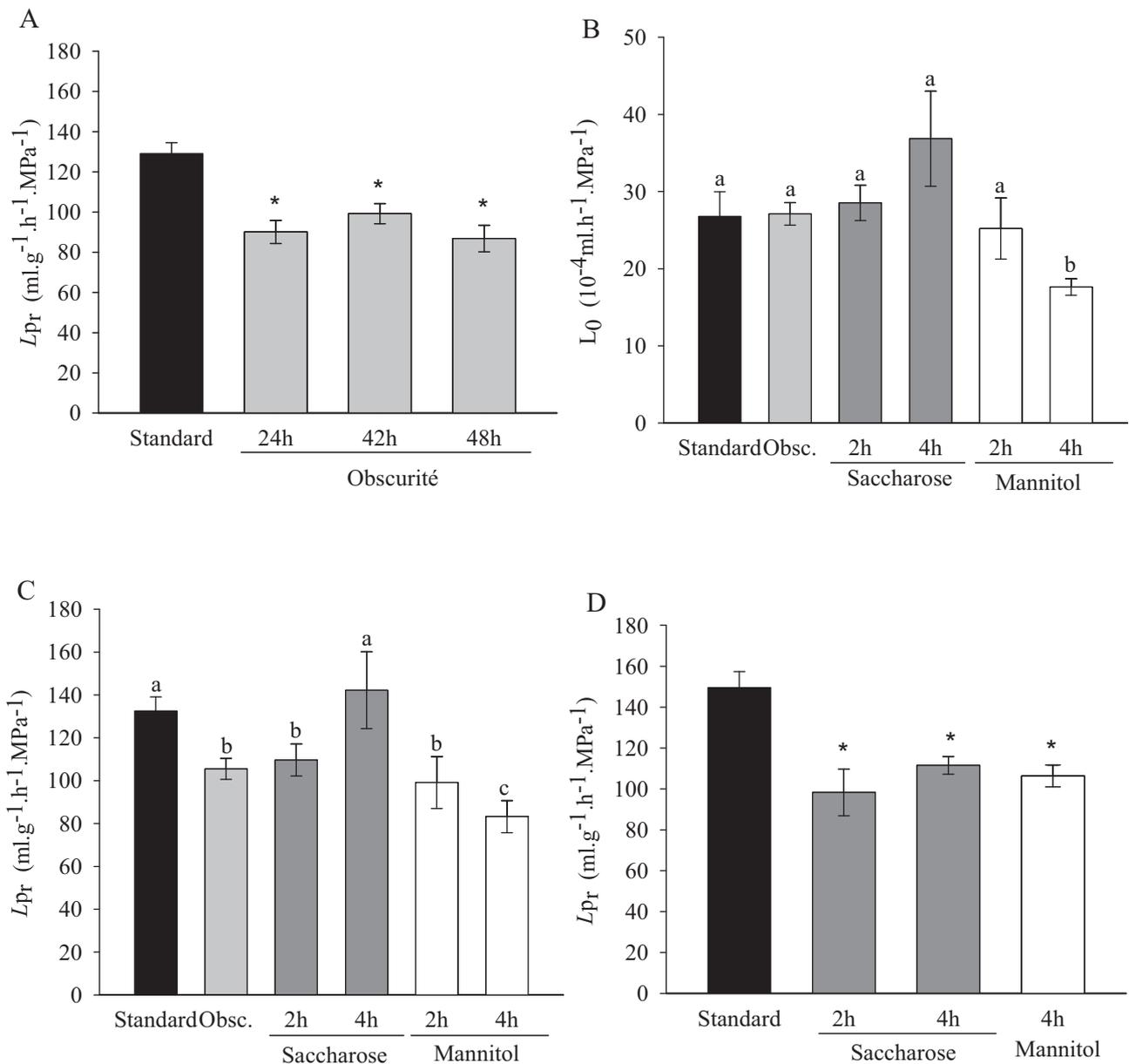


Figure 14 : Réponse de la  $L_0$  et de la  $L_{pr}$  à une alimentation en saccharose.

(A) Variations de  $L_{pr}$  en réponse à 24 h, 42 h et 48 h d'obscurité.

(B et C) Variations de  $L_0$  (B) et de la  $L_{pr}$  (C) en réponse à 24 h d'obscurité, suivi de traitements de 2 h et 4 h par 30 mM de saccharose ou de mannitol.

(D) Variations de  $L_{pr}$  en réponse à 2 h et 4 h de traitement par 30 mM de saccharose et 4 h de traitement par 30 mM de mannitol en condition de lumière.

Les données sont obtenues à partir de trois cultures indépendantes, avec  $n=3$  à 20 plantes. L'erreur standard est présentée. L'effet est considéré significatif lorsque la p-value obtenue par un test de Student est inférieure à 0,05.

Des doses supérieures à 1  $\mu\text{M}$  n'ayant pas de justification physiologique, l'étude de la réponse du transport d'eau racinaire au traitement par flg22 n'a pas été poursuivie.

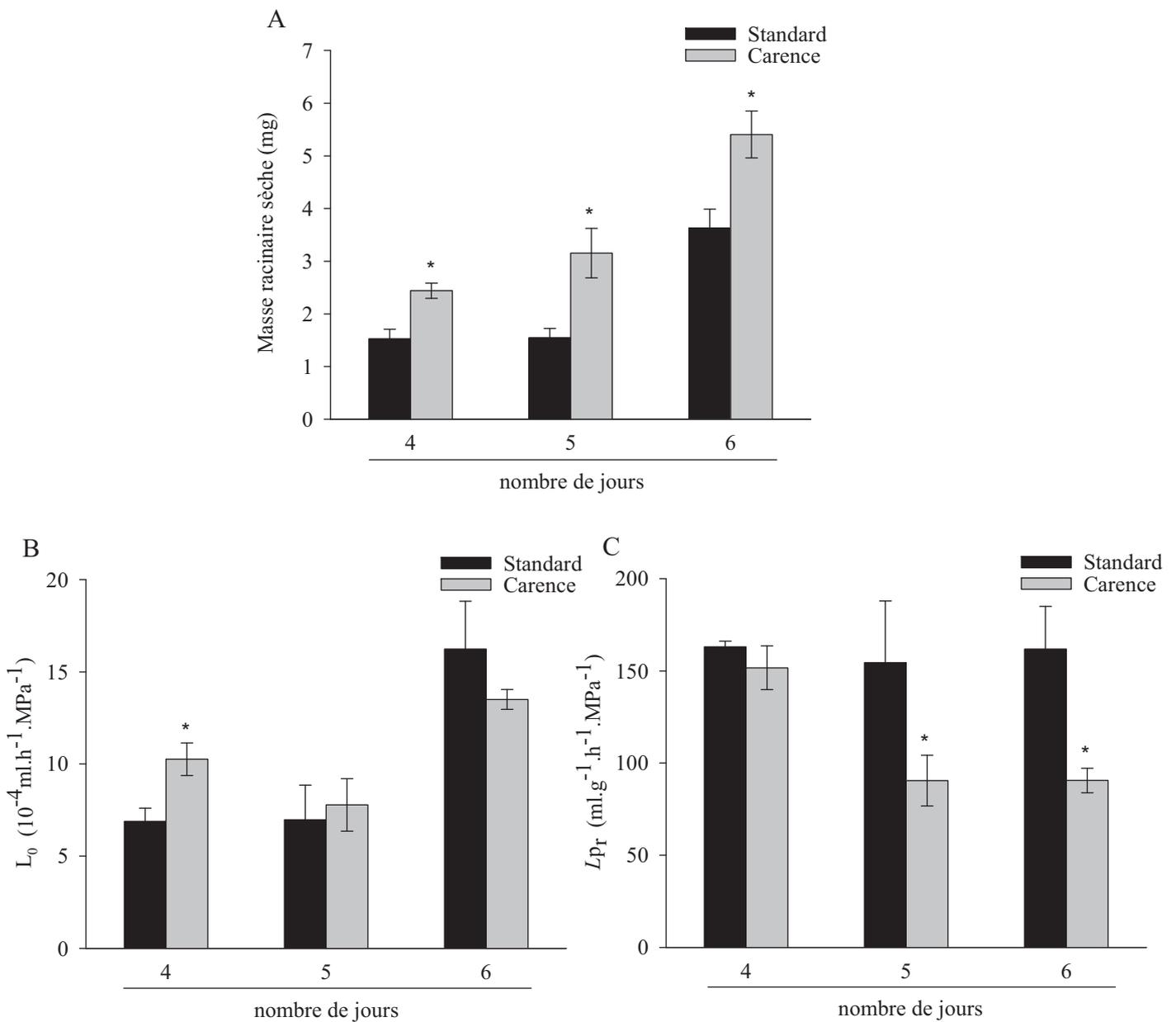
## .V STRESS NUTRITIONNELS

La transpiration fournit la force motrice pour le transport d'eau et de nutriments depuis les racines jusqu'aux parties aériennes. De ce fait, la disponibilité en nutriments régule les flux racinaires d'eau en modulant  $L_0$ , *via* une régulation des aquaporines. On sait par ailleurs que le régime d'éclairage des plantes, et donc potentiellement leur statut énergétique, peut influencer l'hydraulique de la plante [88]. Le travail suivant a donc cherché à évaluer l'impact du statut nutritionnel de la plante, tant du point de vue des molécules carbonées que des nutriments minéraux, sur le transport d'eau racinaire.

### .V.1 Le saccharose

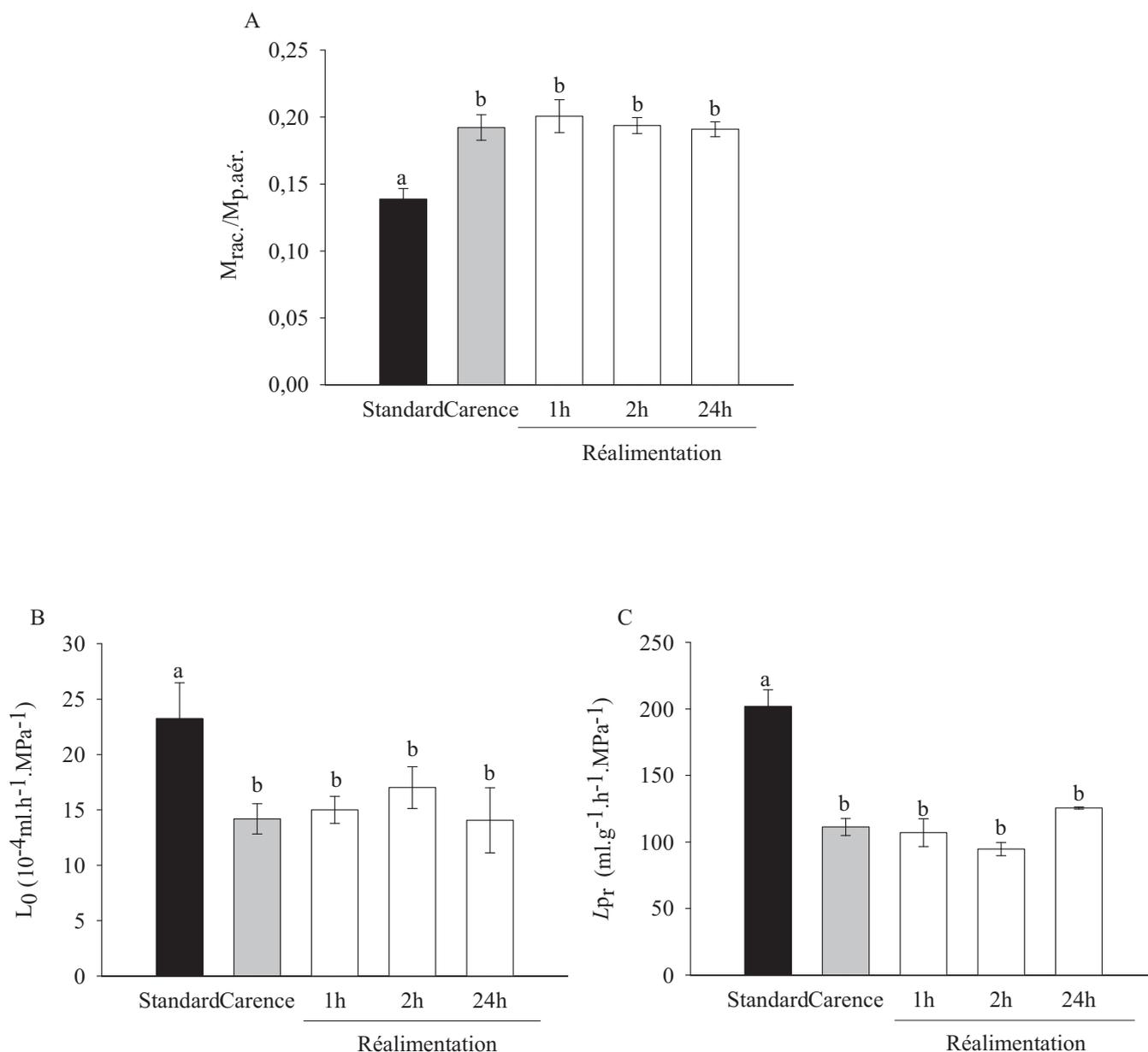
Cette étude a été menée par GuoWei Li, post-doctorant de l'équipe.

Dans un premier temps, des conditions environnementales déplaçant la plante en carbone et induisant un effet sur la  $L_{p_r}$  ont été recherchées. Pour cela, les plantes ont été transférées dans une chambre de culture à l'obscurité pendant différentes périodes. La  $L_{p_r}$  est significativement inhibée de 30,2 %, 23,1 % et 32,7 % par respectivement 24 h, 42 h et 48 h d'obscurité (figure 14A). Ces valeurs d'inhibition n'étant pas significativement différentes, les plantes ont été traitées à l'obscurité pendant 24 h pour étudier par la suite l'effet de l'addition de saccharose sur la  $L_{p_r}$ . Après transfert à l'obscurité pendant 24 h, les plantes ont été alimentées, toujours à l'obscurité, pendant 2 h et 4 h par 30 mM de saccharose ou 30 mM de mannitol utilisé comme un contrôle d'effet osmotique. Afin d'évaluer un effet possible sur l'ensemble de la racine, nous avons dans un premier temps considéré  $L_0$ . A l'exception de l'inhibition observée à 4 h d'alimentation par 30 mM de mannitol (-28,6%), aucun de ces traitements n'affecte ce paramètre (figure 14B). Par contre, la  $L_{p_r}$  est augmentée de 40 % après 4 h de réalimentation en saccharose, la ramenant à sa valeur mesurée en conditions standards (figure 14C). Dans ces mêmes conditions, le traitement par 30 mM de mannitol inhibe la  $L_{p_r}$  de 20 % par rapport à la condition d'obscurité (figure 14C). Par ailleurs en conditions de lumière, un traitement par 30 mM de saccharose pendant 2 h et 4 h inhibe significativement la  $L_{p_r}$  de respectivement 34,2 % et 25,4 %. Cette inhibition est similaire à celle obtenue par l'incubation en présence de 30 mM de mannitol pendant 4 h, suggérant qu'en conditions de lumière l'effet du saccharose est de type osmotique (figure 14D).



**Figure 15 :** Réponse de la masse et de l'hydraulique racinaires à une carence en nitrate.

Les variations moyennes de la masse racinaire sèche (A), de  $L_0$  (B) et de la  $L_{pr}$  (C) en réponse à une carence en nitrate (0,1 mM) de 4, 5 ou 6 jours sont présentées. Les données sont obtenues à partir de deux cultures indépendantes, avec  $n=4$  plantes au minimum. L'erreur standard est présentée. L'effet est considéré significatif lorsque la p-value obtenue par un test de Student est inférieure à 0,05.



**Figure 16 :** Réponse de la masse et de l’hydraulique racinaires de plantes carencées en nitrate, à une réalimentation en nitrate.

Les histogrammes présentent la variation moyenne du rapport entre la masse sèche de la partie racinaire ( $M_{rac.}$ ) et de la partie aérienne ( $M_{p.aér.}$ ) (A), de  $L_0$  (B) et de la  $L_{pr}$  (C) en réponse à une carence de 6 jours (0,1 mM) et puis à une réalimentation de 1 h, 2 h ou 24 h par 4,25 mM de nitrate. Les données sont obtenues à partir de trois cultures indépendantes, avec  $n=2$  à 12 plantes. L’erreur standard est présentée. L’effet est considéré significatif lorsque la p-value obtenue par un test de Student est inférieure à 0,05.



L'ensemble de ces résultats suggère que l'addition de 30 mM de saccharose dans le milieu hydroponique induit différents types d'effet. Sur des plantes cultivées en conditions de lumière, le saccharose a un effet osmotique et inhibe la  $L_{p_r}$ . Par contre, lorsque les plantes sont cultivées à l'obscurité pendant 24 h, le saccharose stimule spécifiquement la  $L_{p_r}$  après 4 h d'incubation. La stimulation est forte puisqu'elle compense l'effet osmotique mesuré en conditions lumineuses et observé pour le mannitol en conditions d'obscurité.

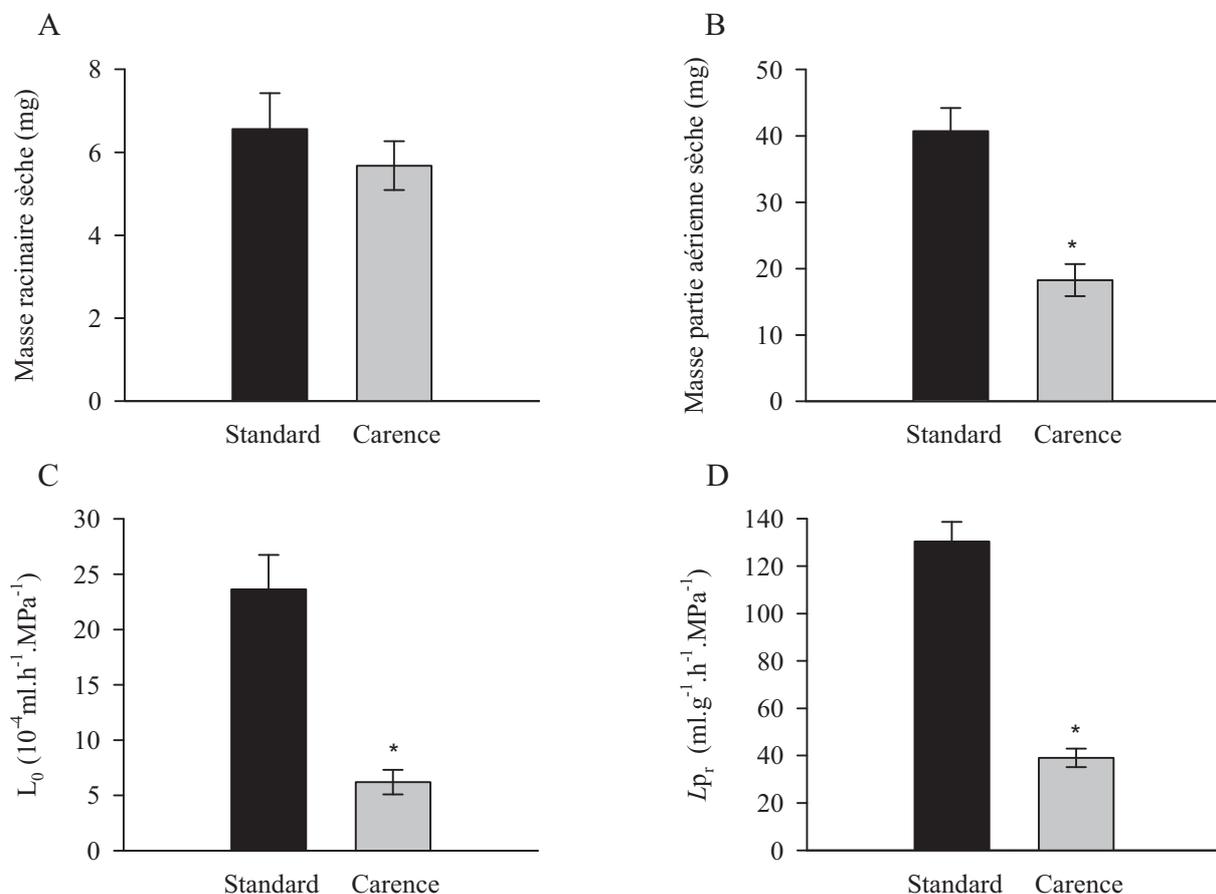
## **.V.2 Le nitrate**

Le nitrate est un ion très mobile dans le sol et donc lessivable et sa disponibilité peut être irrégulière. Pour y répondre, les plantes ont développé des stratégies physiologiques d'adaptation (prolifération racinaire, modification de la longueur racinaire) et moléculaires (régulation des transporteurs de nitrate et des enzymes d'assimilation de cet ion) [5]. Chez le maïs, la  $L_{p_r}$  peut être modulée en fonction de la disponibilité du sol en nitrate, en impliquant les aquaporines [141]. Toutefois, les mécanismes moléculaires responsables de cette réponse hydraulique ne sont pas élucidés. Nous avons évalué la réponse hydraulique de la  $L_{p_r}$  d'Arabidopsis à une carence et à une réalimentation en nitrate pour constituer les bases physiologiques d'études moléculaires ultérieures.

Dans un premier temps, j'ai recherché le temps de carence en nitrate nécessaire pour obtenir une inhibition maximale de la  $L_{p_r}$ . Notre but étant de perturber la signalisation en réponse au nitrate sans déclencher une réponse métabolique profonde liée à une carence azotée, les plantes âgées de 16 jours ont été transférées dans un milieu appauvri en nitrate contenant 0,1 mM de nitrate au lieu de 4,25 mM (tableau 2). Elles ont été comparées à des plantes de même âge, mais cultivées de manière permanente en conditions standard.

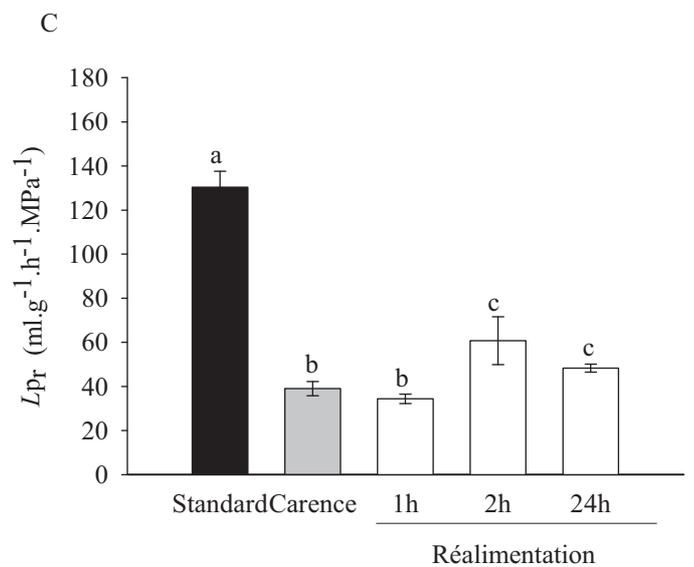
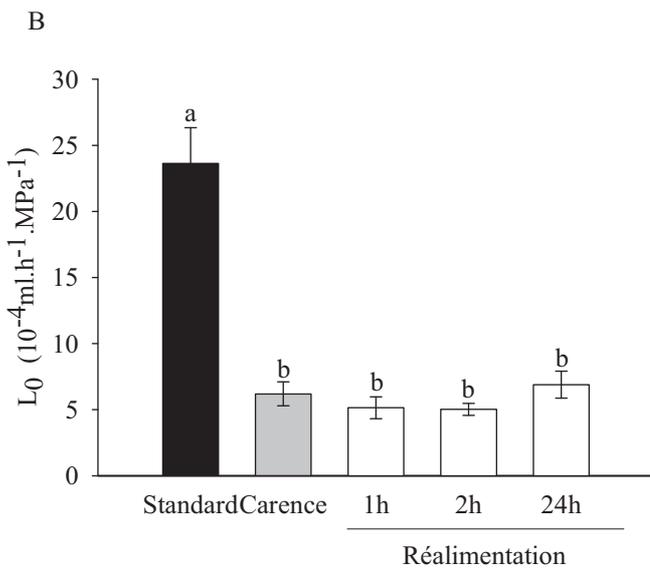
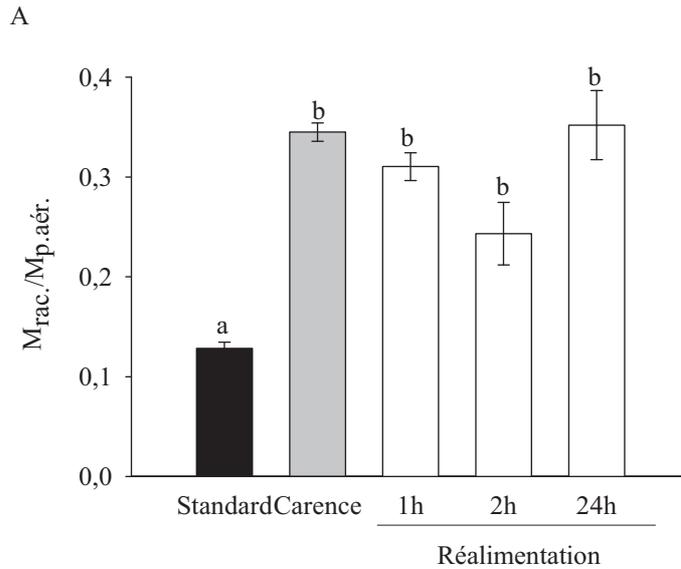
Après 4 jours de carence, la masse racinaire sèche est augmentée de 60 % et  $L_0$  de 48 %, alors que la  $L_{p_r}$  n'est pas modifiée (figure 15). Après 5 et 6 jours de carence, la masse racinaire sèche est augmentée de respectivement 100 % et 50 % (figure 15A). La  $L_0$  n'est pas significativement altérée (figure 15B), alors que la  $L_{p_r}$  est significativement inhibée d'environ 50 % (figure 15C). La masse sèche de la partie aérienne n'est pas affectée quelque soit le temps de carence (données non montrées).

La réponse des plantes à une réalimentation en nitrate a donc été mesurée après 6 jours de carence. Pour cela, les plantes sont replacées dans un milieu hydroponique standard contenant 4,25 mM de nitrate. Les mesures sont effectuées après 1 h, 2 h et 24 h de réalimentation. Le rapport entre les valeurs de masses sèches des parties racinaire et aérienne, augmenté de 38 % après 6 jours de carence, n'est pas affecté par la réalimentation en nitrate



**Figure 17 :** Réponse de la masse des parties racinaires et aériennes ainsi que de l'hydraulique racinaire à une carence en phosphate.

Les variations moyennes de la masse racinaire sèche (A), de la masse de la partie aérienne sèche (B), de  $L_0$  (C) et de la  $L_{p_r}$  (D) en réponse à une carence en phosphate de 6 jours sont présentées. Les données sont obtenues à partir de trois cultures indépendantes, avec  $n=11$  plantes au minimum. L'erreur standard est présentée. L'effet est considéré significatif lorsque la p-value obtenue par un test de Student est inférieure à 0,05.



**Figure 18:** Réponse de la masse et de l'hydraulique racinaire de plantes carencées en phosphate, à une réalimentation en phosphate.

Les histogrammes présentent la variation moyenne du rapport entre la masse sèche de la partie racinaire et de la partie aérienne (A), de  $L_0$  (B) et de la  $L_{pr}$  (C) en réponse à une carence de 6 jours et puis à une réalimentation de 1 h, 2 h ou 24 h par 0,5 mM de phosphate. Les données sont obtenues à partir de trois cultures indépendantes, avec  $n=3$  à 13 plantes. L'erreur standard est présentée. L'effet est considéré significatif lorsque la p-value obtenue par un test de Student est inférieure à 0,05.



(figure 16A).  $L_0$  n'est pas altérée (figure 16B). Enfin, une réalimentation en nitrate de 1 h, 2 h ou 24 h n'a pas d'effet sur la  $L_{p_r}$  (figure 16C).

En conclusion, une carence de 6 jours en nitrate augmente la masse racinaire et inhibe la  $L_{p_r}$ , sans affecter la masse des parties aériennes ni inhiber la  $L_0$ . La réalimentation en nitrate n'affecte ni le rapport entre les masses sèches des parties racinaires et aériennes, ni la  $L_{p_r}$ , ni  $L_0$ .

### **.V.3 Le phosphate**

La disponibilité en phosphate peut être un élément limitant de la croissance, du développement et de la productivité des plantes. Celles-ci répondent à la carence en phosphate par des adaptations métaboliques et développementales dans le but d'augmenter son acquisition. Des études menées sur d'autres plantes qu'*Arabidopsis* ont montré une inhibition de la  $L_{p_r}$  en réponse à une carence en phosphate [76, 116, 143].

Dans ce travail, la carence en phosphate est appliquée pendant 6 jours en transférant les plantes dans un milieu hydroponique totalement dépourvu de phosphate (tableau 2). Après 6 jours de carence, aucune modification de la masse racinaire n'est relevée (figure 17A). En revanche, la masse de la partie aérienne est significativement diminuée de 55 % (figure 17B). De plus, la  $L_0$  et la  $L_{p_r}$  sont fortement altérées de respectivement 80 % et 77 % (figure 17C et D). Les résultats suggèrent une altération forte du fonctionnement hydraulique de la plante, liée à une diminution de la partie aérienne.

Les plantes carencées pendant 6 jours sont réalimentées en phosphate pendant 1 h, 2 h et 24 h par transfert dans un milieu hydroponique standard (0,5 mM  $PO_4$  - tableau 2). Dans la mesure où seule la masse de la partie aérienne diminue en réponse à la carence, j'ai considéré comme indicateur morphologique lors de la réalimentation la valeur du rapport entre les masses sèches des parties racinaires et aériennes. Après 6 jours de carence, ce rapport a été augmenté de 168 % mais n'est pas affecté par la réalimentation en phosphate (figure 18A).  $L_0$  n'est pas significativement affectée par la réalimentation en phosphate (figure 18B). Par contre, la  $L_{p_r}$  augmente significativement de 95 % par rapport au contrôle carencé dès 2 h de réalimentation et se maintient après 24 h de réalimentation (Figure 18C).

En conclusion, sept des huit traitements testés ont montré un effet sur l'hydraulique racinaire d'*Arabidopsis*. Il s'agit de la première espèce végétale pour laquelle ces régulations ont été montrées au cours d'une même étude. Certaines réponses, comme par exemple la réponse des plantes carencées en nitrate à une réalimentation, restent incomprises et seront discutées



ultérieurement. L'observation de réponses rapides suppose une implication des aquaporines dans la modulation de l'hydraulique racinaire. Une approche protéomique a été menée dans le but de suivre la régulation des aquaporines en fonction de la cinétique de régulation de la  $L_{pr}$ .

## .VI DISCUSSION

### .VI.1 Stress biotique

D'après la littérature, flg22 induit une production d' $H_2O_2$  et probablement de NO [216]. Dans ce travail, nous avons vu que  $J_v$  est inhibé par l' $H_2O_2$  et le NO, et que l'application de flg22 induit une production de ROS dans la racine (M. Boudsoq). Pourtant, aucune inhibition de  $J_v$  n'est observée en réponse à l'application de flg22. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat :

- Les mesures de production de ROS ont été réalisées sur des morceaux de la pointe racinaire en ne gardant que la moitié la plus jeune, alors que les mesures de transport d'eau racinaire ont été réalisées sur un appareil racinaire entier. Il est possible que dans le système utilisé pour mesurer le transport d'eau racinaire, les plantes n'aient pas ressenti la flagelline appliquée.

- Les quantités de ROS produites suite à l'application de flg22 sont trop faibles pour induire une inhibition du transport hydrique racinaire.

Pour étayer ces hypothèses, des expériences complémentaires sont nécessaires :

- Il faudrait mesurer la production de ROS suite à l'application de flg22 dans les racines utilisées pour les mesures de chambre à pression, de façon à travailler dans un système similaire pour les mesures de  $L_{pr}$  et de détection de ROS.

- Boursiac *et al.* ont montré que le traitement par NaCl, qui inhibe la  $L_{pr}$ , induit une production d' $H_2O_2$  [98]. Il serait donc intéressant de comparer les productions d' $H_2O_2$  induites par les traitements par NaCl et flg22.

Finalement, dans la mesure où l'AS induit une inhibition de la  $L_{pr}$  via une production d' $H_2O_2$  et qu'il s'agit d'une molécule mimant un effet pathogène, il serait pertinent d'évaluer l'effet sur la  $L_{pr}$  d'autres molécules de type PAMPs (Pathogens-Associated Molecular Patterns) que flg22, tels que la chitine.



## **.VI.2 Carence en éléments minéraux**

### **.VI.2.a Le nitrate**

Des données de la littérature montrent une augmentation de la  $L_{pr}$  de 20 % à 50 % dès 20 min de réalimentation en nitrate chez la tomate et le concombre [140], ou dans des pas de temps un peu plus longs de 50 à 60 min chez le tournesol [138] et le maïs [141]. Ces résultats suggèrent donc que la réponse d'*Arabidopsis* à la réalimentation est faible ou pourrait intervenir après une durée de réalimentation plus longue, supérieure à 24 h. Toutefois, des temps de réalimentation supérieurs à 24 h n'ont pas été explorés car ce projet vise à étudier la réponse des plantes au travers d'évènements de phosphorylation qui constituent généralement des réponses précoces à un processus physiologique.

### **.VI.2.b Le phosphate**

Dans nos conditions, la morphologie des plantes en début de carence est très différente des plantes en début de réalimentation : leur partie aérienne est fortement réduite. Etant données ces modifications morphologiques, on ne peut pas s'attendre à une restauration totale de la  $L_{pr}$ . Ce résultat est différent de celui obtenu dans le cas de l'étude de Shangguan *et al.* dans laquelle aucune modification morphologique des plantes de sorgho n'est commentée [116]. En revanche, nos données sont comparables à celles de Radin *et al.* qui montrent, chez le coton, une altération de la partie aérienne (diminution de la masse sèche et de la surface), une diminution de la longueur racinaire sans effet notable sur la masse racinaire sèche et enfin une inhibition de la  $L_{pr}$  [143]. Cependant, ces effets sont mesurés sur des pas de temps allant jusqu'à 20 jours de carence, donc plus longs que ceux de notre étude.

Les carences en nitrate et en phosphate conduisent à une augmentation du rapport entre les masses des parties racinaire et aérienne. Cependant, dans le cas de la carence en nitrate, elle est due à une augmentation de la masse racinaire alors que la carence en phosphate induit une diminution de la partie aérienne. Ceci suggère que ces carences induisent des mécanismes de réponse différents à l'échelle de la plante entière, ce qui a déjà été décrit (pour revue [5]). Lors de la carence en nitrate, l'augmentation de la masse racinaire n'induit cependant pas d'augmentation de  $L_0$ , ce qui se traduit finalement par une inhibition de la  $L_{pr}$ . Ceci suggère une dérégulation locale du transport d'eau racinaire et donc de la fonction des aquaporines pouvant se décliner selon deux hypothèses : soit l'augmentation de la taille de l'appareil



racinaire n'induit pas une augmentation de la quantité d'aquaporines, soit elle induit une augmentation de la quantité d'aquaporines non actives.

Contrairement aux résultats décrits dans d'autres études (pour revue [5]), la carence en phosphate n'induit pas d'augmentation de la masse racinaire dans nos conditions. Cependant, les conditions de cultures sont différentes puisque nous travaillons sur des plantes cultivées en hydroponie et non *in vitro*. Le maintien de la masse racinaire ne permet de maintenir ni  $L_0$ , ni la  $L_{pr}$  (figure 16). Par contre, la diminution de la masse des parties aériennes, en diminuant la transpiration, pourrait induire une diminution d'une partie du transport d'eau racinaire. Ceci suggère qu'il existerait une dérégulation locale du transport d'eau racinaire. Cette activité étant étroitement liée aux aquaporines, ces résultats suggèrent que les aquaporines de l'appareil racinaire seraient dégradées ou inactivées, lors d'une carence en phosphate.

### .VI.3 Carence en éléments carbonés

L'ensemble des résultats suggère que l'addition de 30 mM de saccharose dans le milieu hydroponique induit différents types d'effets. Sur des plantes cultivées en conditions de lumière, le saccharose a un effet osmotique et inhibe la  $L_{pr}$ . Par contre, lorsque les plantes sont cultivées à l'obscurité pendant 24 h, le saccharose stimule spécifiquement la  $L_{pr}$  après 4 h d'incubation. La stimulation est forte puisqu'elle compense l'effet osmotique mesuré suite à l'addition de mannitol (figure 14). Ainsi, malgré l'effet osmotique observé à la lumière, la  $L_{pr}$  est stimulée à l'obscurité. Une étude menée sur *Arabidopsis* a montré que le contenu en amidon varie au fil de la journée : il est consommé presque totalement au cours de la nuit et est à nouveau accumulé au cours de la journée [217]. Dans nos conditions de culture, la totalité du stock d'amidon est donc probablement consommée, plaçant les plantes dans une situation de carence en éléments carbonés. Une autre étude également menée sur *Arabidopsis* a montré qu'en condition de carence en saccharose, l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme est stimulée, tels que l'acétyl-CoA oxydase 4. Cette enzyme est impliquée dans la bêta-oxydation des chaînes d'acide gras et conduit à une production d' $H_2O_2$  [218]. Une hypothèse est donc que d'une part en condition de nuit prolongée, la production d' $H_2O_2$  par cette voie conduirait à une inhibition de la  $L_{pr}$ , et que d'autre part, l'addition de saccharose inhiberait l'expression de cette enzyme ou induirait un système dégradant l' $H_2O_2$ . Par exemple, il a été démontré que la catalase 3 impliquée dans la dégradation de l' $H_2O_2$  produit en nuit prolongée [218] serait activée par l'addition de saccharose, conduisant ainsi à une restauration de la  $L_{pr}$ .



**REGULATION DES AQUAPORINES PAR DES  
TRAITEMENTS ABIOTIQUES ET NUTRITIONNELS**

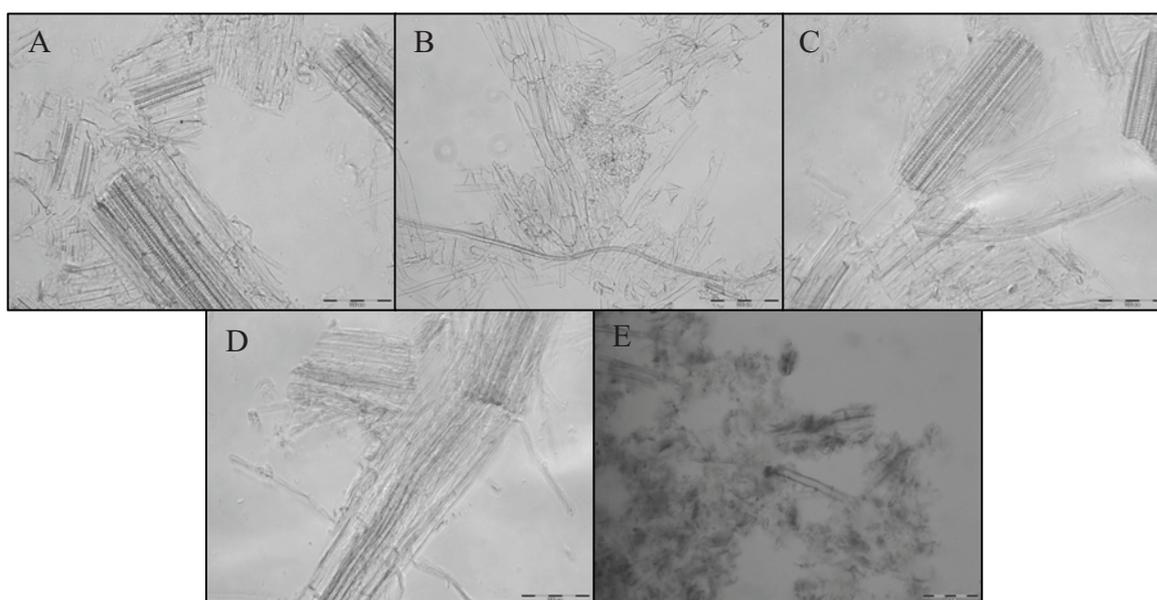


Le chapitre précédent a mis en évidence que la  $Lp_r$  d'Arabidopsis peut être régulée en réponse à différentes contraintes abiotiques et nutritionnelles. Par ailleurs, de nombreuses études ont montré que les aquaporines sont régulées en condition de stress environnementaux (pour revue [16]), au niveau de l'expression des gènes, de l'abondance des aquaporines et de leur état de phosphorylation. Par exemple, une étude menée par l'équipe sur des racines d'Arabidopsis a montré qu'un traitement par 100 mM de NaCl diminue l'expression de gènes d'aquaporines après 2 h, ainsi que l'abondance des PIP1s après 30 min et des PIP2s et TIP1s après 24 h de traitement [115]. Leur relocalisation sub-cellulaire en réponse à ce même traitement a également été montrée [115]. Plusieurs études ont également montré que les aquaporines végétales peuvent être phosphorylées sur leurs extrémités N- et C-terminales [36, 37, 39, 48-52, 54, 55, 58]. Un rôle de ces phosphorylations dans la réponse des plantes aux stress environnementaux, plus particulièrement aux stress salins et osmotiques [36, 48, 54], oxydants [54] et au froid [133, 219] a été proposé. Les avancées en MS quantitative réalisées au cours des dernières années ont permis d'identifier et de mieux décrire des contextes physiologiques menant à une altération du niveau de phosphorylation des aquaporines. Ainsi, il a été montré que l'état de phosphorylation des aquaporines de la famille PIP est altéré en réponse au saccharose [51], au NaCl [54, 56], à l' $H_2O_2$  [54] ou encore à l'ABA [59].

Dans ce chapitre, nous avons mené une approche protéomique pour mesurer les variations quantitatives de l'abondance des aquaporines PIP racinaires dans l'ensemble des traitements. Une approche (phospho)-protéomique quantitative a été menée sur certains des traitements décrits dans le chapitre précédent : NaCl, DEA-NO, carence et réalimentation en phosphate de plantes carencées en cet ion. Par rapport aux travaux de l'équipe et de la littérature, cette étude a permis d'appréhender, dans leur ensemble, des situations représentatives de diverses contraintes environnementales, l'ensemble familles d'aquaporines (PIPs, TIPs, NIPs et SIPs) et ce, dans un même organisme. Les analyses protéomiques ont été menées sur une durée permettant d'obtenir une demi-inhibition et une inhibition maximale de la  $Lp_r$  décrits dans le premier chapitre, dans le but de suivre la régulation des aquaporines en fonction de la cinétique de variation de la  $Lp_r$ .

## **.I BROYAGE DE RACINES**

D'après les données transcriptomiques disponibles, des aquaporines sont exprimées dans toutes les couches cellulaires de l'appareil racinaire (source eFP Browser). La quantification de l'ensemble des aquaporines racinaires nécessite donc de disposer d'une bonne



F

		Potter	Broyeur à rouleaux
µg de protéines microsomaux / g MF		141	136
Nombre de protéines identifiées		73	68
Répartition cellulaire (eFP Browser)	Spécifique de l'épiderme	35%	10%
	Spécifique de la stèle	33%	45%
	Epiderme et autres tissus	75%	54%
Nombre d'aquaporines identifiées		5 PIPs et 1 TIP	5 PIPs et 2 TIPs

Figure 19 : Comparaison de méthodes de broyage de racines

(A à E) Les photographies présentent des observations au microscope optique (Gx10) de broyats racinaires obtenus par broyage au mortier (A), au potter (B), par la combinaison de ces deux méthodes (C), au broyeur à billes (D) et au broyeur à rouleaux (E).

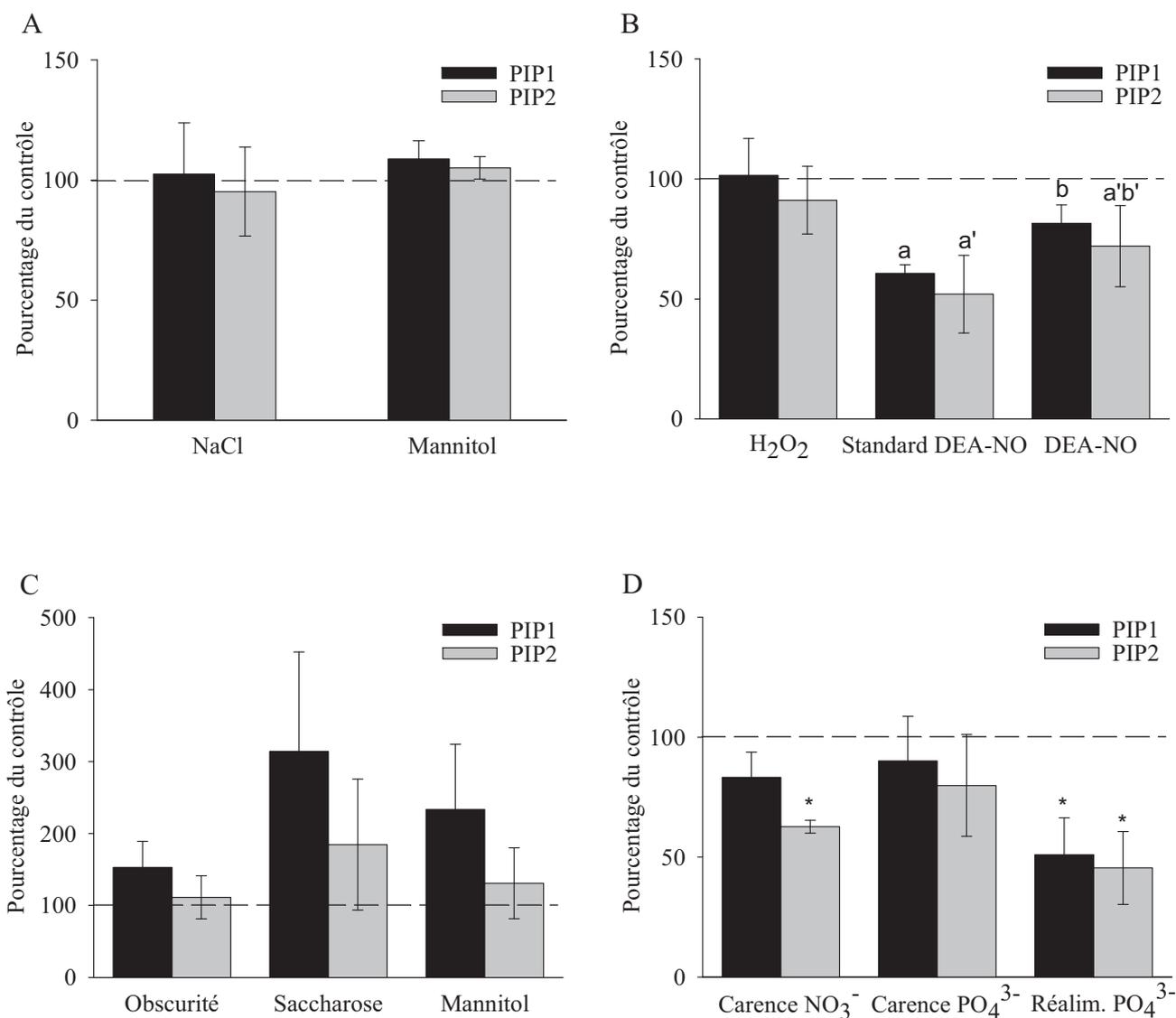
(F) Le tableau présente pour les broyages au potter (colonne 2) et au broyeur à rouleaux (colonne 3), le rendement d'extraction de protéines microsomaux mesuré par dosage Bradford (ligne 2), le nombre de protéines identifiées par MS (ligne 3), la répartition cellulaire des protéines selon eFP Browser (lignes 4 à 6) et le nombre d'aquaporines identifiées (ligne 7).

représentativité des différents tissus. Le broyage des racines représente donc une étape critique.

Cinq méthodes de broyage ont été utilisées et leurs efficacités respectives à déstructurer les différentes couches cellulaires de la racine ont été testées (figure 19). Il s'agit (A) du broyage au mortier et pilon de racines congelées dans l'azote liquide, (B) de la pottérisation en rotation à 4°C de racines fraîchement prélevées, (C) d'un broyage au mortier suivi d'un broyage au potter, (D) d'un broyage à billes de racines congelées dans l'azote liquide et (E) d'un broyage aux rouleaux à 4°C de racines fraîchement prélevées (figure 19). Dans chaque cas, 1 g de matériel racinaire est broyé dans 4 mL de tampon de broyage (matériel et méthode V.1.).

L'efficacité physique de broyage a été évaluée en observant les broyats au microscope optique (grossissement x 10 – matériel et méthode IV.1.) pour s'assurer de la déstructuration de chaque type cellulaire (épiderme, cortex, stèle). Un total de dix clichés a été pris de manière aléatoire pour chaque broyat. Un cliché représentatif est présenté pour chaque méthode dans la figure 19. Le broyage au mortier brise les racines en morceaux mais ne les déstructure pas (figure 19A). En revanche, le broyage au potter permet de mieux déstructurer les racines, sauf le cylindre central qui apparaît dans la partie basse du cliché (figure 19B). Les clichés A et C sont similaires, ce qui montre qu'une étape supplémentaire au potter n'améliore pas l'efficacité du broyage au mortier. Contrairement aux quatre autres méthodes, des connexions entre les racines de différents ordres sont maintenues avec le broyeur à billes (figure 19D). Le broyat obtenu avec le broyeur à rouleaux présente exclusivement des cellules isolées et des racines totalement déstructurées (figure 19E). Ainsi, selon le critère de l'efficacité physique de broyage, le potter et le broyeur à rouleaux sont les plus efficaces (figures 19B et 19E).

Ces deux dernières méthodes ont été comparées quant à la représentativité des aquaporines qu'elles permettent de détecter. Pour cela, les protéines microsomales ont été extraites à partir des broyats obtenus au potter et au broyeur à rouleaux (matériel et méthode V.1.). Les rendements d'extraction ont été évalués par dosage des protéines par la méthode de Bradford (matériel et méthode VI.1.) et s'avèrent équivalents avec 141 µg de protéines microsomales/100 g de matière fraîche (MF) au potter et 136 µg/100 g MF au broyeur à rouleaux (figure 19F). Enfin, les protéines solubles ont été décapées, puis les protéines microsomales ont été concentrées par électrophorèse dans un gel d'acrylamide à 4 % (matériel et méthode VI.2.). Après digestion en gel par la trypsine (matériel et méthode VII.1.), les protéines ont été identifiées par LC-MS/MS à l'aide d'un spectromètre de masse de type trappe



**Figure 20 :** Variation relative de la quantité des aquaporines PIP en réponse à des traitements osmotiques, oxydants ou nutritionnels.

Les valeurs obtenues pour chaque traitement sont rapportées à la valeur obtenue en condition standard (valeur de 100 % représentée par une ligne en pointillés).

Les variations relatives mesurées par ELISA de la quantité des aquaporines PIP1s (PIP1;1 à PIP1;4) et PIP2s (PIP2;1 à PIP2;3) en réponse aux traitements suivants sont présentées :

A : traitements par 100 mM de NaCl pendant 2 h et 200 mM de mannitol pendant 4 h,

B : traitements par 500  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 20 min et 125  $\mu$ M de DEA-NO pendant 18 min ainsi que son contrôle standard DEA-NO,

C : traitement par 24 h d'obscurité suivie de l'addition de 30 mM de saccharose ou de mannitol pendant 4 h,

D : traitements nutritionnels par 6 jours de carence en nitrate ou phosphate ainsi que la réalimentation en phosphate pendant 2 h.

Les données sont obtenues à partir de trois cultures indépendantes avec cinq plantes par culture. Les erreurs standards sont présentées. L'effet est considéré significatif lorsque la p-value obtenue par un test de Student est inférieure à 0,05.

ionique 3D (HCT, High Capacity Trap) interfacé avec un système HPLC de type Chip Cube (matériel et méthode VII.7.). Le nombre de protéines identifiées est équivalent, avec 73 protéines au potter et 68 protéines au broyeur à rouleaux (figure 19F). L'application eFP Browser a été utilisée pour analyser, dans chaque type de broyage, la répartition des protéines identifiées dans les différentes couches cellulaires de la racine. Les protéines identifiées avec la pottérisation sont à 35 % spécifiques de l'épiderme, à 33 % spécifiques de la stèle et 75 % d'entre elles sont localisées au niveau de l'épiderme et d'autres tissus. Les protéines de l'épiderme sont donc majoritairement extraites. Les protéines identifiées avec le broyeur à rouleaux sont à 10 % spécifiques de l'épiderme, à 45 % spécifiques de la stèle et 54 % d'entre elles sont localisées au niveau de l'épiderme et d'autres tissus. Ces résultats n'ont été obtenus qu'à partir d'une seule expérience. Cependant, ils suggèrent que le broyeur à rouleaux permet d'obtenir une meilleure représentativité des différents tissus racinaires. Concernant les aquaporines, le broyage au potter permet d'identifier 6 isoformes d'aquaporines (5 PIPs et 1 TIP) contre 7 isoformes avec le broyeur à rouleaux (5 PIPs et 2 TIPs).

L'ensemble de ces résultats nous a conduit à choisir le broyeur à rouleaux pour la préparation des échantillons destinés à l'analyse biochimique et par MS.

## **.II QUANTIFICATION DES AQUAPORINES PIPs**

La modulation de la  $L_{p_r}$  pourrait être attribuée à une altération de la teneur en aquaporines dans la membrane plasmique par dégradation ou relocalisation à une autre membrane, ou à une altération de leurs propriétés intrinsèques de transport d'eau. Nous avons cherché à savoir si les variations de  $L_{p_r}$  observées pouvaient en partie s'expliquer par une altération de l'abondance des PIPs. Celle-ci a été mesurée par un dosage ELISA. Des plantes cultivées en hydroponie ont été soumises aux traitements décrits dans le premier chapitre, sur une durée permettant d'obtenir une inhibition maximale de la  $L_{p_r}$  (figure 20). Les protéines microsomales non décapées ont été extraites puis dosées par la méthode de Bradford.

Un dosage ELISA a été effectué pour quantifier les variations relatives de la quantité d'aquaporines PIPs en réponse à ces traitements. Un anticorps appelé anti-PIP1, dirigé contre quatre aquaporines de la famille PIP1 (PIP1;1 à PIP1;4) et un anticorps appelé anti-PIP2, dirigé contre trois aquaporines de la famille PIP2 (PIP2;1 à PIP2;3) ont été utilisés. Ces anticorps ont été démontrés par western blot comme réagissant spécifiquement avec les aquaporines PIP1s et PIP2s [37] et peuvent donc être utilisés lors de tests ELISA pour quantifier spécifiquement ces aquaporines. Le dosage ELISA étant utilisé comme méthode de quantification relative, les histogrammes de la figure 20 présentent l'abondance des PIP1s et



des PIP2s en pourcentage du contrôle, qui correspond à des plantes cultivées en conditions standard.

### **.II.1 Stress osmotique**

Des études menées sur différentes plantes ont montré que des traitements osmotiques altèrent l'expression et la fonction des aquaporines (introduction IV.2b et IV.2.c). Dans nos conditions, le traitement d'Arabidopsis par 100 mM de NaCl pendant 2 h ou par 200 mM de mannitol pendant 4 h ne modifie pas significativement la quantité des PIP1s et PIP2s (Figure 20A). Ces résultats sont cohérents avec ceux de Boursiac *et al.* (2005) concernant les aquaporines PIP2s. Par contre, une légère diminution de l'abondance des PIP1s a été mesurée par ces auteurs [115]. Cette légère différence entre ces travaux et les nôtres pourrait être attribuée à la différence de type d'échantillon dosé qui correspond à des protéines totales dans le cas de Boursiac *et al.* (2005) [115].

### **.II.2 Stress oxydants**

A ce jour, seules trois études traitent de la régulation des aquaporines au niveau protéique en réponse à un stress oxydant [54, 98, 133].

Dans nos conditions, le traitement par 500  $\mu$ M d' $H_2O_2$  pendant 20 min ne modifie pas l'abondance des aquaporines PIP1s et PIP2s (Figure 20B). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Aroca *et al.* (2005) sur le maïs [133].

Concernant le traitement par le DEA-NO, rappelons que dans le but de limiter la formation de complexes métal/NO, ce traitement a été appliqué dans une solution dite "standard DEA-NO", dépourvue de métaux. Le milieu standard DEA-NO induit une diminution significative de l'abondance des aquaporines PIP1s et des PIP2s, de respectivement 40 % et 50 % (figure 20B). Le rendement d'extraction des protéines microsomales n'est pas modifié, suggérant que l'abondance de ces aquaporines est effectivement diminuée. La différence entre ce milieu et le milieu standard est l'absence de 50  $\mu$ M de Fe-EDTA et la présence de 2,5  $\mu$ M de NaOH et 29 mM de NaCl. A ce jour chez les plantes, aucune étude n'a montré de relation entre l'abondance des aquaporines et le fer. Les effets observés sur l'abondance des aquaporines PIPs reste à élucider. Enfin, le traitement par 125  $\mu$ M de DEA-NO pendant 20 min augmente significativement l'abondance des PIP1s et des PIP2s de respectivement 34 % et 38 % par rapport au standard DEA-NO (figure 20B).



Ces résultats montrent que les traitements H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et NO ont des effets différents sur l'abondance des aquaporines PIPs ce qui suggère des mécanismes distincts de régulation des aquaporines, conduisant dans les deux cas à une inhibition de la Lp.

### **.II.3 Statut nutritionnel**

#### **.II.3.a Molécules carbonées**

A ce jour, il n'existe pas d'étude traitant de l'influence du statut carboné sur l'abondance des aquaporines. Seule une étude de protéomique quantitative menée sur des plantules d'*Arabidopsis* montre que la phosphorylation des aquaporines PIP<sub>2;1/2;2/2;3</sub> et PIP<sub>2;6</sub> est altérée en réponse à un ajout de saccharose appliqué après une privation en carbone (milieu appauvri en saccharose et plantes placées à l'obscurité) [51].

Dans les conditions d'analyses utilisées, c'est-à-dire trois réplicats biologiques avec trois réplicats techniques chacun, aucune variation significative de l'abondance des aquaporines en réponse à 24 h d'obscurité ainsi qu'à l'addition de 30 mM de saccharose ou de mannitol dans le milieu n'est détectable (Figure 20C). Cependant, malgré la forte variabilité biologique observée, une tendance à l'augmentation de la quantité des aquaporines PIP1s dans les trois conditions et des aquaporines PIP2s dans les conditions d'addition de saccharose et de mannitol peut être suspectée.

#### **.II.3.b Nutriments minéraux**

Des études précédentes ont montré que divers types de carences nutritionnelles (nitrate, phosphate) altèrent l'expression des aquaporines de plantes [76, 116, 136, 138]. Dans notre étude et en réponse à 6 jours de carence en nitrate, seule l'abondance des PIP2s est significativement diminuée de 17 % (Figure 20D). Dans le cas d'une carence de 6 jours en phosphate, ni la quantité des PIP1s ni celle des PIP2s ne sont significativement diminuées (Figure 20D). Par contre, la réalimentation en phosphate de plantes carencées en cet ion provoque une diminution significative de l'abondance des PIP1s de 49 % et des PIP2s de 55 % par rapport à la situation de carence initiale (Figure 20D).

En résumé, ces résultats montrent que le statut nutritionnel de la plante, selon qu'il concerne des molécules carbonées ou des nutriments minéraux, module différemment l'abondance des aquaporines.



Devant tant de diversité de réponses, il apparaît que les modulations de  $Lp_r$  décrites dans le premier chapitre ne peuvent pas être simplement associées à des variations de l'abondance des aquaporines PIPs. Ceci suggère l'implication de régulations post-traductionnelles pour ces protéines. Différents types de modifications co- et post-traductionnelles ont été décrites chez les aquaporines : acétylation, méthylation, glycosylation, ubiquitinylation ou phosphorylation (pour revue [16]). Une approche fine de phospho-protéomique quantitative a été engagée sur des extraits de protéines microsomaux enrichis en phosphopeptides pour quantifier les phosphorylations ainsi que toute autre MPT détectable.

### **.III ETUDE DE PHOSPHOPROTEOMIQUE QUANTITATIVE**

Cette étude a été menée sur trois situations caractéristiques d'un stress osmotique (NaCl), oxydant (DEA-NO) et nutritionnel (carence et réalimentation en phosphate).

#### **.III.1 Préparation des échantillons**

Des plantes cultivées en hydroponie âgées de 21 jours ont été soumises à des traitements induisant une demi-inhibition ou une inhibition maximale de la  $Lp_r$ , décrits dans le premier chapitre. En résumé, les plantes ont été traitées par 100 mM de NaCl pendant 45 min et 2 h, 125  $\mu$ M de DEA-NO pendant 8 et 18 min ainsi que par une solution correspondant au contrôle spécifique du DEA-NO (standard DEA-NO). Des plantes ont également été soumises à 6 jours de carence en phosphate et 2 h de réalimentation en phosphate suite à cette carence. Une étude menée dans notre groupe a montré l'efficacité d'un traitement alcalin et chaotrope pour enrichir un extrait membranaire en aquaporines [37]. Des fractions microsomaux ont donc été purifiées puis enrichies en protéines hydrophobes par ce même protocole de décapage. Même si ce protocole ne permet pas de purifier exclusivement les aquaporines, les étapes de digestion, de fractionnement et d'enrichissement des échantillons décrites dans les paragraphes suivants ont été conçues dans le but de maximiser leur identification et leur quantification. Dans le but d'optimiser l'inventaire des aquaporines et leur couverture de séquence, les protéines ont été digérées par deux types de double digestion : LysC/trypsine et Chymo/aspN (matériel et méthode VII.1.b). Pour la double digestion LysC/trypsine, 600  $\mu$ g de protéines microsomaux ont été utilisés et 150  $\mu$ g pour la double digestion Chymo/AspN. Pour chaque situation, nous avons réalisé trois réplicats biologiques comprenant chacun deux réplicats techniques de MS, soit un total de six réplicats. Les étapes de préparation des échantillons pour la MS ont été prises en charge par J. Vialaret (LPF Montpellier).

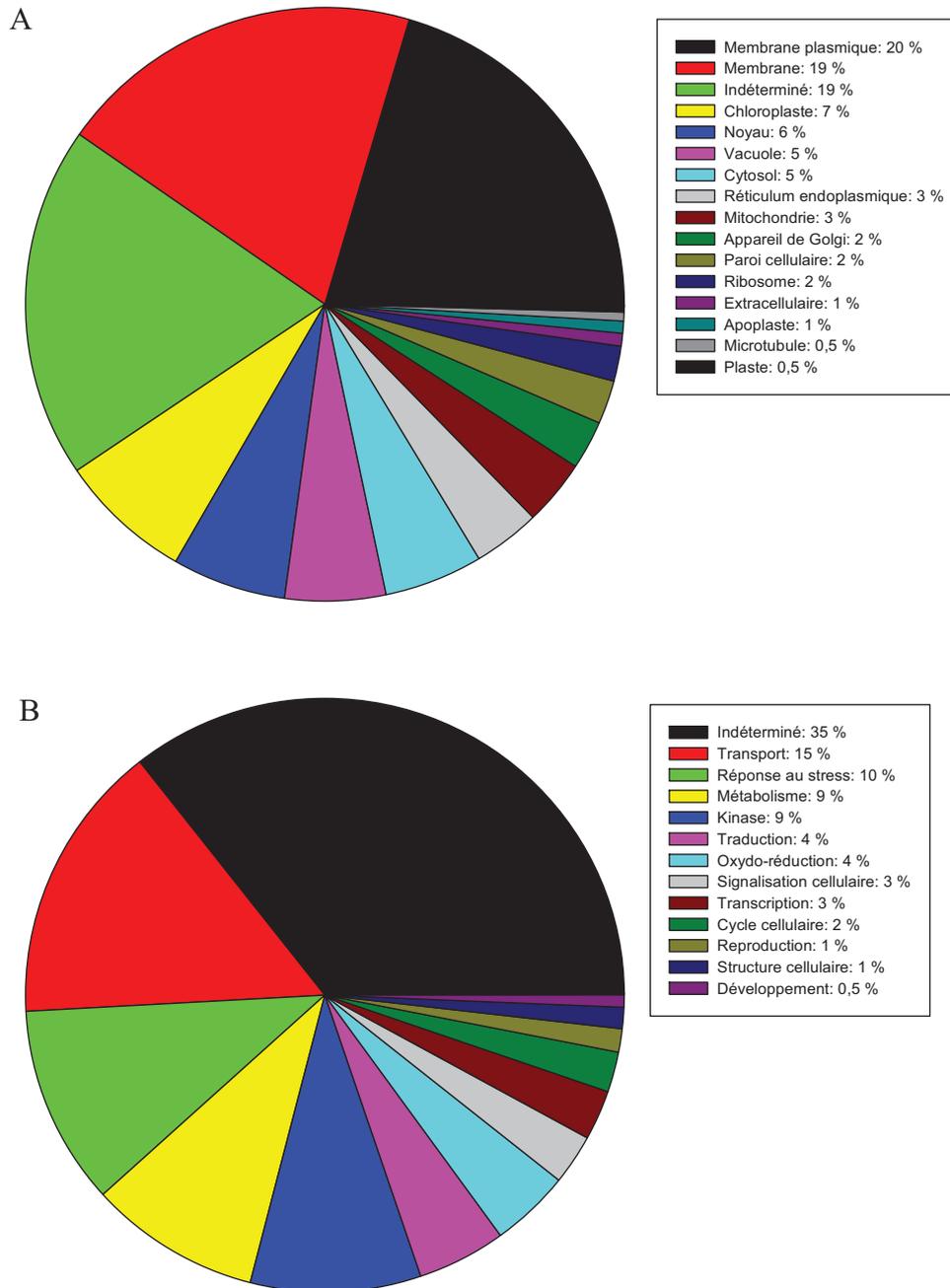


Figure 21 : Description globale des protéines identifiées par MS après la double digestion par la LysC/trypsine.

Les graphiques présentent la répartition des protéines selon leur localisation sub-cellulaire prédite par Aramemnon (A) et selon leur fonction moléculaire prédite par Agrigo (B).

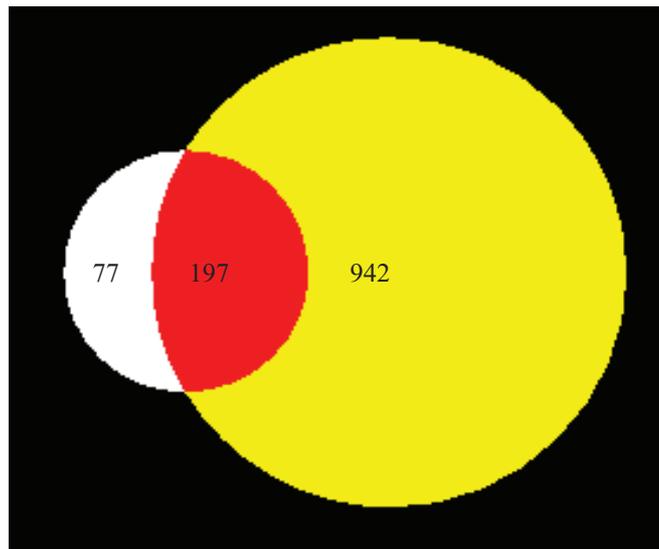


Figure 22 : Complémentarité des deux doubles digestions.

La figure présente le nombre de protéines identifiées après digestion par LysC/trypsin (cercle jaune), après digestion par Chymo/AspN (cercle blanc) ainsi que les protéines identifiées par les deux doubles digestions (portion rouge).



Un extrait de protéines microsomales hydrophobes de plantes est forcément complexe. Dans le but d'éviter que les signaux de peptides minoritaires soient masqués par ceux de peptides majoritaires, un fractionnement des échantillons sur colonne échangeuse de cations (SCX) a été effectué. Une étude préalablement réalisée par J. Vialaret a montré que les fractions F1 à F7 sont enrichies en phosphopeptides alors que les fractions F8 et F9 ne contiennent pas de phosphopeptides. Ensuite, les fractions ont été regroupées de la façon suivante (figure 7):

- F1 : 100 % F1,
- F234 : 100 % F2 + 100 % F3 + 90 % F4,
- F567 : 90 % F5 + 90 % F6 + 90 % F7,
- F4589 : 10 % F4 + 10 % F5 + 100 % F8 + 100 % F9,
- F6 : 10 % F6,
- F7 : 10 % F7.

Les fractions F1, F234 et F567 ont ensuite été enrichies en phosphopeptides à l'aide de colonnes de titane (matériel et méthode VII.5.) alors que les fractions F4589, F6 et F7 ont été directement analysées en LC-MS/MS (matériel et méthode VII.7.b).

### **.III.2 Inventaire des protéines et des MPTs**

Pour cette analyse, j'ai pris en charge les données relatives aux aquaporines et J. Vialaret les données relatives aux autres protéines.

La liste de toutes les protéines identifiées a été établie en combinant l'analyse de chacune des doubles digestions, pour l'ensemble des traitements. La double digestion LysC/trypsine permet d'identifier 1139 protéines et environ 1270 phosphopeptides. Selon les prédictions obtenues à partir du site Aramemnon (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/index.ep>), 65 % des protéines sont membranaires dont 20 % sont prédites pour être localisées à la membrane plasmique (figure 21A). De plus, 53 % d'entre elles présentent au moins un domaine transmembranaire (Aramemnon). Ces résultats établissent l'efficacité du décapage des protéines solubles de l'extrait microsomal. Selon les prédictions obtenues à partir du site Agrigo [170], trois groupes majeurs de fonction se dégagent : 15 % des protéines identifiées ont une activité de transport et 9 % une activité kinase (figure 21B). La double digestion Chymo/AspN permet quant à elle d'identifier 274 protéines dont 65 % présentent au moins un domaine transmembranaire. Finalement, l'utilisation des deux doubles digestions a permis d'identifier 1216 protéines dont 197 communes aux deux digestions (figure 22).

Tableau 5: Correspondance entre différentes isoformes d'aquaporines et l'ensemble des peptides d'aquaporines identifiés après une double digestion par LysC/trypsin

Isoforme	Région		Séquence	Modification post-traductionnelle
PIP1;1-1;2-1;3-1;4	1 - 9		-..MEGKEEDVR.V	Acétylation: M1
PIP1;1-1;2-1;3-1;4	1 - 9		-..MEGKEEDVR.V	Acétylation: M1; Oxydation: M1
PIP1;1-1;2-1;3-1;4	2 - 9		M.EGKKEEDVR.V	Acétylation: M1
PIP1;1-1;2-1;3-1;4	1 - 14		-..MEGKEEDVRVGANK.F	Acétylation: M1; Oxydation: M1
PIP1;1-1;2-1;3-1;4	1 - 14		-..MEGKEEDVRVGANK.F	
PIP1;1-1;2-1;3-1;4	5 - 14		K.EEDVRVGANK.F	
PIP1;1-1;2	15 - 29		K.FPERQPIGTSAQSDK.D	
PIP1;1-1;2	15 - 29		K.FPERQPIGTSAQSDK.D	Phosphorylation: T23/S24/S27
PIP1;1-1;2	15 - 29		K.FPERQPIGTSAQSDK.D	Phosphorylation: T23/S24/S27 ; Déamidation: Q19
PIP1;1-1;2	19 - 29	Extrémité	R.QPIGTSAQSDK.D	
PIP1;1-1;2	19 - 29	N-terminale	R.QPIGTSAQSDK.D	Déamidation: Q19
PIP1;1-1;2	19 - 29		R.QPIGTSAQSDK.D	Méthylation: S27/D28/K29
PIP1;3	15 - 30		K.FPERQPIGTSAQTDK.D	
PIP1;3	19 - 29		R.QPIGTSAQTDK.D	
PIP1;4	15-30		K.FPERQPIGTSAQSTDK.D	
PIP1;5	5 - 14		K.EEDVNVGANK.F	
PIP1;5	15 - 30		K.FPERQPIGTAATESK.D	
PIP1;5	15 - 30		K.FPERQPIGTAATESK.D	Déamidation: Q19
PIP1;5	19 - 30		R.QPIGTAATESK.D	
PIP1;5	34 - 47		K.EPPPAPFFEPGELK.S	
PIP1;1-1;2	152 - 156		K.GFQPK.Q	
PIP1;1	157 - 174		K.QYQALGGGANTVAHGTYK.G	Méthylation: K174
PIP1;1	157 - 174		K.QYQALGGGANTVAHGTYK.G	Formylation: K174
PIP1;1	157 - 174		K.QYQALGGGANTVAHGTYK.G	
PIP1;1	157 - 174		K.QYQALGGGANTVAHGTYK.G	
PIP1;2	157 - 174		K.QYQALGGGANTVAHGTYK.G	Déamidation: Q159/N166
PIP1;2	152 - 174	Boucle C	K.GFQPNPYQTLGGGANTVAHGTYK.G	
PIP1;3	153 - 175		K.GFQPTYQTLGGGANTVAHGTYK.G	Déamidation: Q155/Q160
PIP1;4	153 - 175		K.GFQPTYQTLGGGANTVAHGTYK.G	Didéamidation: Q155 et Q160
PIP1;4	153 - 175		K.GFQPTYQTLGGGANTVAHGTYK.G	
PIP1;5	153 - 175		K.GFQPLYQTNGGGANVV AHGYTK.G	Déamidation: N162
PIP1;5	153 - 175		K.GFQPLYQTNGGGANVV AHGYTK.G	
PIP1;1-1;3-1;4-1;5-2;5	239 - 248	Boucle E	R.SLGAAIYNK.D	
PIP1;2	239 - 248		R.SLGAAIIFNK.D	

PIP2;1	4 - 16		K.DVEA VPGEFQTR.D	Déamidation: Q13
PIP2;1	4 - 16		K.DVEA VPGEFQTR.D	
PIP2;1	17 - 33		R.DYQDPPAPFIDGAELK.K	
PIP2;1	4 - 33		K.DVEA VPGEFQTRDYQDPPAPFIDGAELK.K	Déamidation: Q14/Q19
PIP2;1	4 - 33		K.DVEA VPGEFQTRDYQDPPAPFIDGAELK.K	Déamidation: Q19
PIP2;1	17 - 33		R.DYQDPPAPFIDGAELK.K	
PIP2;2	4 - 14		K.DVEGPEGFQTR.D	Déamidation: Q11
PIP2;2	4 - 14		K.DVEGPEGFQTR.D	
PIP2;2	15 - 32		R.DYEDPPPTFFDADELTK.W	Phosphorylation: T22
PIP2;2	15 - 32		R.DYEDPPPTFFDADELTK.W	Formylation: K32
PIP2;2	15 - 32		R.DYEDPPPTFFDADELTK.W	Méthylation: D28
PIP2;2	15 - 32		R.DYEDPPPTFFDADELTK.W	Diméthylation: K32 / Diméthylation: E29 et K32
PIP2;2	4 - 32	Extrémité	K.DVEGPEGFQTRDYEDPPPTFFDADELTK.W	
PIP2;2	4 - 32	N-terminale	K.DVEGPEGFQTRDYEDPPPTFFDADELTK.W	Déamidation: Q12
PIP2;3	15 - 32		R.DYEDPPPTFFDAEELTK.W	
PIP2;4	4 - 16		K.DLDVNESGPPAAR.D	Déamidation: N8
PIP2;4	4 - 16		K.DLDVNESGPPAAR.D	Diméthylation: E9 et S10
PIP2;4	4 - 16		K.DLDVNESGPPAAR.D	Phosphorylation: S10
PIP2;4	4 - 19		K.DLDVNESGPPAARDYK.D	
PIP2;4	20 - 33		K.DPPAPFFDMEELR.K	
PIP2;4	20 - 34		K.DPPAPFFDMEELR.K.W	
PIP2;5	16 - 33		K.DYQDPPPEPLFDATLKG.W	Phosphorylation: T6/S10/S12
PIP2;6	3 - 14		K.DELTEEESLSGK.D	Oxydation: M27
PIP2;7	16 - 32		K.DYVDPPAPLLDMGELK.S	Oxydation: M26
PIP2;7	16 - 32		K.DYVDPPAPLLDMGELK.S	
PIP2;8	14 - 30		K.DYVDPPAPLLDMAELK.L	
PIP2;8	14 - 30		K.DYVDPPAPLLDMAELK.L	
PIP2;1 & 2;4	145 - 153		K.AFQSSYYTR.Y	Déamidation: Q145
PIP2;2	143 - 151		K.AFQSSYYDR.Y	Diméthylation: S146 et S147
PIP2;2	143 - 151		K.AFQSSYYDR.Y	
PIP2;2	143 - 151		K.AFQSSYYDR.Y	Déamidation: N158
PIP2;4	154 - 167	Boucle C	R.YGGGANELADGYNK.G	
PIP2;4	154 - 167		R.YGGGANELADGYNK.G	
PIP2;7	142 - 160		K.TPYNTLGGGANTVADGYSK.G	Déamidation: N152
PIP2;7	142 - 160		K.TPYNTLGGGANTVADGYSK.G	Formylation: K160
PIP2;7	142 - 160		K.TPYNTLGGGANTVADGYSK.G	Diméthylation: S159 et K160
PIP2;7	142 - 160		K.TPYNTLGGGANTVADGYSK.G	

PIP2;1-2;2	230 - 239	Boucle E	R.SFGAAVYVYNK.S	Déamidation: N239/N240
PIP2;4-2;7-2;8	232 - 243		R.SFGAAVYVYVYNNNEK.A	Phosphorylation: S280
PIP2;4-2;7-2;8	232 - 243		R.SFGAAVYVYVYNNNEK.A	Phosphorylation: S280; Formylation: K276
PIP2;1-2;2-2;3	272-282		R.ASGSKSLGSFR.S	Phosphorylation: S277
PIP2;1-2;2-2;3	272-282		R.ASGSKSLGSFR.S	Phosphorylation: S280/S283
PIP2;1-2;2-2;3	277 - 282		K.SLGSFR.S	Diphosphorylation: S280 et S283
PIP2;1-2;2-2;3	277 - 287		K.SLGSFRSAANV.-	Phosphorylation: S280/S283; Déamidation: N285
PIP2;1-2;2-2;3	277 - 287		K.SLGSFRSAANV.-	Diphosphorylation: S279/S282/S285
PIP2;1-2;2-2;3	277 - 287		K.SLGSFRSAANV.-	Phosphorylation: S286
PIP2;1-2;2-2;3	277 - 287		K.SLGSFRSAANV.-	Phosphorylation: S279
PIP2;1-2;2-2;3	277 - 287		K.SLGSFRSAANV.-	Phosphorylation: S279/S282
PIP2;4	277 - 288		K.ALGSFGSFGSFR.S	Phosphorylation: S279/S282; Déamidation: N283
PIP2;5 & 2;7	276 - 281	Extrémité C-terminale	K.ALGSFGSFGSFRSFA.-	Phosphorylation: S273 et S276
PIP2;5	276 - 286		K.ALGSFRSQPHV.-	Diphosphorylation: S273/S276
PIP2;5	276 - 286		K.ALGSFRSQPHV.-	Diphosphorylation: S273 et S276; Déamidation N277
PIP2;7	265 - 275		R.ASAIKALGSFR.S	Phosphorylation: S273/S276; Déamidation: N277
PIP2;7	270 - 280		K.ALGSFRSNATN.-	Phosphorylation: S273/S276; Didéamidation N277 et N280
PIP2;7	270 - 280		K.ALGSFRSNATN.-	Phosphorylation: S271/S274
PIP2;7	270 - 280		K.ALGSFRSNATN.-	Diphosphorylation: S271 et S274
PIP2;7	270 - 280		K.ALGSFRSNATN.-	Diméthylation: D11 et S12
PIP2;7	270 - 280		K.ALGSFRSNATN.-	Diméthylation: K19 ou Diméthylation: S17 et K19
PIP2;7	270 - 280		K.ALGSFRSNATN.-	Phosphorylation: S45/S48
PIP2;8	268 - 278		K.ALASFNSPTN.-	Phosphorylation: S5 ; Acétylation: M1; Oxydation: M1
PIP2;8	268 - 278		K.ALASFNSPTN.-	Phosphorylation: S9
TIP2;2	4 - 19		K.IEIGSVGDSFSVASLK.A	
TIP2;2	4 - 19	Extrémité N-terminale	K.IEIGSVGDSFSVASLK.A	
TIP2;3	4 - 19		K.IEIGSVGDSFSVSSLK.A	
TIP2;3	4 - 19		K.IEIGSVGDSFSVSSLK.A	
NIP1;1	42 - 56	Extrémité N-terminale	K.KQDSSLVSVVFLQK.L	
NIP2;1	1 - 8		-.MDDISVSK.S	
NIP2;1	9 - 20		K.SNHGNNVVVVLNIK.A	

Ce tableau présente la correspondance entre divers peptides (colonne 4) et la ou les protéine(s) qu'ils caractérisent (colonne 1), la région protéique correspondante (colonnes 2 et 3) et l'état de MPT du peptide (colonne 5). L'indication Sx/Sy signifie l'impossibilité de discriminer entre les deux sites potentiels de phosphorylation x et y. Ce peptide est considéré comme étant modifié sur Sx ou Sy ou sous la forme d'un mélange de ces 2 peptides monophosphorylés. La même convention est appliquée pour la position des déamidations et méthylations. Lorsqu'aucune MPT n'est spécifiée, le peptide n'est pas modifié.

Tableau 6 : Correspondance entre différentes isoformes d'aquaporines et l'ensemble des peptides d'aquaporines identifiés après une double digestion par Chymo/AspN

Isoforme	Région		Séquence peptidique	Modification post-traductionnelle
PIP1;1/1;2/1;4	7 - 27		E.DVRVGANKFPERQPIGTSAQSD	Phosphorylation: S24
PIP1;1/1;2	7 - 29		E.DVRVGANKFPERQPIGTSAQSDK.D	
PIP1;1/1;2	7 - 29		E.DVRVGANKFPERQPIGTSAQSDK.D	
PIP1;1/1;3/1;5	30 - 39		K.DYKEPPAPF.F	Oxydation: M97
PIP1;2/1;4	30 - 39		K.DYKEPPAPL.F	
PIPs	93 - 99		W.AFGGMIF.A	Déamidation: Q159/N166 Didéamidation: Q159 et N166
PIPs	93 - 99		W.AFGGMIF.A	
PIP1;3/1;4	159 - 172		Y.QTLGGGANTVAHGY.T	Déamidation: N9/N13/Q19/Q26 Didéamidation: N13+Q19/N13+Q29/Q19+Q26 Tridéamidation: N9+Q19+Q26/N13+Q19+Q26/N9+N13+Q26 Quadridéamidation: N9+N13+Q19+Q26
PIP1;3/1;4	159 - 172		Y.QTLGGGANTVAHGY.T	
PIP1;3/1;4	159 - 172		Y.QTLGGGANTVAHGY.T	
PIP1;1/1;2/1;3/1;4	173 - 186		Y.TKSSGLGAEIIGTF.V	
PIP1;1/1;2/1;3/1;4/2;4/2;6/2;7/2;8	179 - 186		L.GAEIIGTF.V	
PIPs T5;1	187 - 193		F.VLVYTVF.S	
PIPs	204 - 217		R.DSHVPILAPLPIGF.A	
PIPs & PIP2;5	225 - 240		L.ATIPITGTGINPARSL.G	
PIP1;1/1;3/1;4/1;5/2;5	241 - 246		L.GAAIY.N	
PIPs sauf PIP2;4, TIP1;3/3;1/3;2	259 - 263		F.WVGF.I	
PIPs	260 - 268		W.VGPFIGAAL.A	
PIPs	264 - 268		F.IGAAL.A	
PIPs	264 - 272		F.IGAALAAALY.H	
PIP1;3	7 - 27		E.DVRVGANKFPERQPIGTSAQ.T.D	Déamidation: N9/N13/Q19/Q26 Didéamidation: N13+Q19/N13+Q29/Q19+Q26 Tridéamidation: N9+Q19+Q26/N13+Q19+Q26/N9+N13+Q26 Quadridéamidation: N9+N13+Q19+Q26
PIP1;3	7 - 29		E.DVRVGANKFPERQPIGTSAQ.T.D	
PIP1;4	7 - 28		E.DVRVGANKFPERQPIGTSAQST.D	
PIP1;4	7 - 30		E.DVRVGANKFPERQPIGTSAQSTDK.D	
PIP1;5	7 - 30	Extrémité N -terminale	E.DVNVGANKFPERQPIGTAQAQTESK.D	
PIP1;5	7 - 30		E.DVNVGANKFPERQPIGTAQAQTESK.D	
PIP1;5	7 - 30		E.DVNVGANKFPERQPIGTAQAQTESK.D	
PIP1;5	7 - 30		E.DVNVGANKFPERQPIGTAQAQTESK.D	
PIP1;5	7 - 30		E.DVNVGANKFPERQPIGTAQAQTESK.D	
PIP1;5	7 - 30		E.DVNVGANKFPERQPIGTAQAQTESK.D	
PIP1;1	159 - 172		Y.QALGGGANTVAHGY.T	Déamidation: Q159/Q166 Didéamidation: Q159 et Q166 Tridéamidation: Q154 et Q159 et N166
PIP1;2	159 - 172		Y.QALGGGANTIAHGY.T	
PIP1;2	159 - 172	Boucle C	Y.QALGGGANTIAHGY.T	
PIP1;2	159 - 172		Y.QALGGGANTIAHGY.T	
PIP1;3	154 - 172		F.QPNPYQTLGGGANTVAHGY.T	
PIP1;5	174 - 187	Boucle C-Hélice 4	Y.TKSSGLGAEIVGTF.V	
PIP1;2	241 - 246	Boucle E	L.GAAIIF.N	
P2;2;2;3	14 - 23		R.DYEDPPPTPF.F	
P2;2;2;3	17 - 26		E.DPPPTPFDA.D	
P2;2;2;3	17 - 24		E.DPPPTPF.F.D	

PIP2;7 2;8	15 - 24	K.DYVDPPPAPL.L			
PIP2;7 2;8	17 - 25	Y.VDPPPAPLL.D			
PIP2;7 2;8	18 - 25	V.DPPPAPLL.D			
PIP2;5 2;6 2;7 2;8 TIP2;2 T2.3	44 - 49	F.IATLLF.L			
PIP2;1 2;2 2;3 2;4 2;5	58 - 62	L.TVIGY.K			
PIP2;2 2;3 2;7	163 - 176	Y.NTGTGLAAEIIIGTF.V			
PIP2;1 2;2 2;3 2;5	172 - 179	L.AAEIIGTF.V			
PIP2s sauf 2;5	218 - 233	L.ATIPITGTGINPARSF.G			
P2;1 2;2 2;4 2;6 2;7 2;8	234 - 239	F.GAAVIY.N			
PIP2;1 2;2	257 - 264	F.IGAAIAAF.Y			
PIP2;1 2;2	257 - 265	F.IGAAIAAFY.H			
PIP2;1 2;2 2;3	271 - 287	L.RASGSKSLGSRSAANV.-			Phosphorylation: S280
PIP2;1 2;2 2;3	271 - 287	L.RASGSKSLGSRSAANV.-			Diphosphorylation: S280 et S283
PIP2;1	4 - 13	K.DVEAVPGEGF.Q			
PIP2;1	6 - 16	V.EAVPGEGFQTR.D			
PIP2;1	17 - 26	R.DYQDPPPAPF.I			
PIP2;1	17 - 26	R.DYQDPPPAPF.I			Déamidation: Q19
PIP2;1	20 - 27	Q.DPPPAPFL.D			
PIP2;1	20 - 30	Q.DPPPAPFIDG.A.E			
PIP2;4	16 - 25	R.DYKDPPPAPF.F			
PIP2;4	19 - 26	K.DPPPAPFF.D			
PIP2;7	139 - 154	F.MKTPYNTLGGGANTVA.D			
PIP2;7	144 - 157	Y.NTLGGGANTVADGY.S			
PIP2;7	158 - 171	Y.SKGTALGAEIIGTF.V			
PIP2;8	156 - 169	Y.STGTALGAEIIGTF.V			
PIP2;4	165 - 178	Y.NKGTGLGAEIIGTF.V			
PIP2;4	251 - 263	F.WVGPMIIGAAAAAF.Y			
PIP2;4	252 - 263	W.VGPMIIGAAAAAF.Y			Oxydation: M255
PIP2;4	252 - 263	W.VGPMIIGAAAAAF.Y			
PIP2;4	252 - 264	W.VGPMIIGAAAAAFY.H			Oxydation: M255
PIP2;4	252 - 264	W.VGPMIIGAAAAAFY.H			
PIP2;7	245 - 252	W.VGPFLGAL.A			
PIP2;7	249 - 257	F.LGALAAAAAY.H			
PIP2;8	243 - 255	W.VGPFV GALAAAAAY.H			
PIP2;4	278 - 286	L.GSFGSFGSF.R			Diphosphorylation: S282 et S285
PIP2;5	255 - 263	F.AGAAIAAFY.H			
PIP2;7	261 - 273	Y.ILRASAIKALGSF.R			Phosphorylation: S272
PIP2;7	263 - 273	L.RASAIKALGSF.R			Phosphorylation: S272
TIP1;1 1;2	28 - 33	F.ISTLIF.V			
TIP1;1 1;2	71 - 90	F.VAVSVGANISGGHVNPAVTF.G			
TIP1;1 1;2 1;3	146 - 153	F.VFEIVMTF.G			Oxydation: M151
TIP1;1 1;2	165 - 181	I.DPKNGSLGTIPIAIGF.I			
TIP1;1 1;2	165 - 181	I.DPKNGSLGTIPIAIGF.I			Déamidation: N168

TIP1;1 1;2 2;2 2;3	172 - 181		L.GTIAPIAIGF.I		
TIP1s TIP2s TIP3s	182 - 188		F.IVGANIL.A		
TIP1;1 1;2	182 - 193		F.IVGANILAGGAF.S		Déamidation: N186
TIP1;1 1;2	182 - 193		F.IVGANILAGGAF.S		
TIP1;1 1;2	189 - 204		L.AGGAFSGASMNPAVAF.G		
TIP1;1 1;2	194 - 204		F.SGASMNPAVAF.G		
TIP1;1 1;2	194 - 204		F.SGASMNPAVAF.G		Oxydation: M198
TIP1;1 1;2	194 - 204		F.SGASMNPAVAF.G		Déamidation: N199
TIP1;1 1;2	205 - 213		F.GPAVVSWTW.T		
TIP1;1 1;2	244 - 249		H.EQLPTT.D		
TIP1;2	1 - 15		-.PTRNIAIGGVQEEVY.H		
TIP1;2	2 - 16	Extrémité N-terminale	M.PTRNIAIGGVQEEVY.H		
TIP1;2	2 - 16		M.PTRNIAIGGVQEEVY.H		Déamidation: Q12
TIP1;1	32 - 44		L.IFVAGSGGMAF.N		
TIP1;1	32 - 44		L.IFVAGSGGMAF.N		Oxydation: M42
TIP1;2	35 - 45	Hélice 1	F.VFAGSGGIAF.N		
TIP1;2	37 - 45		F.AGSGGIAF.N		
TIP1;1	45 - 58		F.NKLTENGATTPSGL.V		Déamidation: N45/N50
TIP1;1	45 - 58		F.NKLTENGATTPSGL.V		Déamidation: N45 et N50
TIP1;2	45 - 63	Boucle A	F.NKITDNGATTPSGLVAAAL.A		
TIP1;2	46 - 59		F.NKITDNGATTPSGL.V		Déamidation: N46
TIP1;2	46 - 59		F.NKITDNGATTPSGL.V		Didéamidation: N46 et N51
TIP1;2	50 - 64		T.DNGATTPSGLVAAAL.A		
TIP1;2	50 - 64	Boucle A-Hélice 2	T.DNGATTPSGLVAAAL.A		Déamidation: N51
TIP1;1	59 - 70		L.VAAVAHAHAFGLF.V		
TIP1;2	60 - 64	Hélice 2	L.VAAAL.A		
TIP1;2	123 - 134		L.SFATGGEPAPAF.G		
TIP1;2	125 - 134	Hélice 3-Boucle C	F.ATGGEPAPAF.G		
TIP1;2	125 - 136		F.ATGGEPAPAFGL.S		
TIP1;1	122 - 133		L.KFATGGLAVPAF.G		
TIP1;1	124 - 133	Boucle C-Hélice 4	F.ATGGLAVPAF.G		
TIP1;1	124 - 135		F.ATGGLAVPAFGL.S		
TIP1;1	129 - 135	Hélice 4	L.AVPAFGL.S		
TIP1;1	136 - 145		L.SAGVGVLNAF.V		
TIP1;2	161 - 181	Hélice 4-Boucle D	Y.A.TA.VDPKNGSLGTIAPAIAGF.I		
TIP1;2	162 - 182	-Hélice 5	Y.A.TA.VDPKNGSLGTIAPAIAGF.I		Déamidation: N169
TIP1;1	161 - 171	Boucle D	Y.A.TAIDPKNGSL.G		Phosphorylation: S170
TIP1;1	161 - 181	Boucle D-Hélice 5	Y.A.TAIDPKNGSLGTIAPAIAGF.I		
TIP1;1	220 - 232		Y.WAGPLVGGGIAGL.I		
TIP1;1	221 - 232		W.AGPLVGGGIAGL.I		
TIP1;1	221 - 234		W.AGPLVGGGIAGLIY.E		
TIP1;2	220 - 229		Y.WAGPLIGGGL.A		
TIP1;2	221 - 234	Hélice 6	W.AGPLIGGGLAGIYY.D		

TIP1;2	222 - 230		W.AGPLIGGGL.A	
TIP1;2	226 - 235		L.IGGGLAGIYY.D	
TIP1;1	238 - 249	Hélice 6-C-ter	F.FINTTHEQLPTT.D	
TIP1;1	238 - 249		F.FINTTHEQLPTT.D	Deamidation: N240/S245
TIP1;1	239 - 251		F.INTTHEQLPTT.DY.-	
TIP1;2	235 - 239	Extrémité C-terminale	Y.DFVFI.D	
TIP1;2	241 - 251		I.DENAHEQLPTT.D	
TIP2;1 2;2 2;3	179 - 190		L.IVGANILAAAGPF.S	
TIP2;2 2;3	140 - 150		I.EGVVMEIVVTF.A	
TIP2;2 2;3	162 - 178		A.DPKKGSGLGTIPIAIGF.I	
TIP2;2 2;3	191 - 208		F.SGGSMPARSPGPAVVSG.D	
TIP2;2 2;3	215 - 221		W.IYWVGPL.V	
TIP2;2 2;3	218 - 229		W.VGPLVGGALAGL.I	
TIP2;2 2;3	222 - 231		L.VGGALAGLIY.G	
TIP2;2	10 - 17	Extrémité N-terminale	G.DSFSVASL.K	
TIP2;1	25 - 30		F.ISTLLF.V	
TIP2;1	31 - 41	Hélice 1	F.VFAGVGSAIAY.A	
TIP2;2	31 - 39		F.VFAGVGSAL.A	
TIP2;3	31 - 41		F.VFAGVGSAAVAF.A	
TIP2;2	47 - 55	Boucle A	S.DAALDPAGL.V	
TIP2;3	45 - 55		L.TSDGALDPAGL.V	
TIP2;1	121 - 136	Boucle C	Y.VTGGGLAVPTHSVAAGL.G	
TIP2;2	121 - 136		F.VTNGESVPTHGVAAGL.G	
TIP2;2	121 - 136	Hélice 3-Boucle C	F.VTNGESVPTHGVAAGL.G	Déamidation: N123
TIP2;1	218 - 229		W.VGPLIGGGLAGL.I	
TIP2;1	222 - 231	Hélice 6	L.IGGGLAGLIY.G	
TIP2;2	202 - 214		F.GPAVVSGDFSQIW.I	
TIP2;2	209 - 214	Boucle E	G.DFSQIW.I	
TIP2;3	202 - 214		F.GPAVVSGDLSQIW.I	
TIP2;3	209 - 214		G.DLSQIW.I	
TIP2;2	233 - 245	Hélice 6-C-ter	G.DVFIGSYAPAPT.E	
TIP2;2	236 - 249	Extrémité C-terminale	F.IGSYAPAPTTESYP.-	
TIP4;1	175 - 186	Hélice 5	F.VVGANILAGGAF.S	
TIP4;1	214 - 225	Hélice 6	W.VGPLIGGGLAGF.I	
NIP1;1 1;2	133 - 142	Hélice 3	Y.VISQVIGSTL.A	
NIP4;2	113 - 118	Boucle B	F.RRFPWY.Q	
NIP4;2	141 - 149	Boucle C	L.MFNVTPKAF.F	Oxydation: M141

Ce tableau présente la correspondance entre divers peptides (colonne 4) et la ou les protéine(s) qu'ils caractérisent (colonne 1), la région protéique correspondante (colonnes 2 et 3) et l'état de MPT du peptide (colonne 5). L'indication Sx/Sy signifie l'impossibilité de discriminer entre les deux sites potentiels de phosphorylation x et y. Ce peptide est considéré comme étant modifié sur Sx ou Sy ou sous la forme d'un mélange de ces 2 peptides monophosphorylés. La même convention est appliquée pour la position des déamidations et méthylations. Lorsqu'aucune MPT n'est spécifiée, le peptide n'est pas modifié. Le manque d'information concernant la région protéique dans la colonne 3 est dû à l'appartenance du peptide à un trop grand nombre de protéines. En fonction de la protéine considérée, ce peptide pourrait appartenir à différentes régions protéiques.



A

Protéines	Couverture de séquence protéotypique (%)			
	LysC/trypsin	Chymo/AspN	Apport Chymo/AspN	Total
PIP1;1	6,29	4,90	0,00	6,29
PIP1;2	9,79	6,99	0,00	9,79
PIP1;3	13,29	14,69	3,50	16,78
PIP1;4	8,01	8,36	8,36	16,38
PIP1;5	18,47	13,24	4,18	22,65
PIP2;1	10,45	8,71	0,00	10,45
PIP2;2	13,33	0,00	0,00	13,33
PIP2;3	6,32	0,00	0,00	6,32
PIP2;4	20,62	16,49	8,93	29,55
PIP2;5	10,14	3,15	3,15	13,29
PIP2;6	4,15	0,00	0,00	4,15
PIP2;7	18,57	22,50	6,07	24,64
PIP2;8	10,07	9,71	9,71	19,78
TIP1;1	0,00	46,22	46,22	46,22
TIP1;2	0,00	43,87	43,87	43,87
TIP2;1	0,00	19,20	19,20	19,20
TIP2;2	6,40	28,40	28,40	34,80
TIP2;3	6,40	21,60	21,60	28,00
TIP4;1	0,00	9,64	9,64	9,64
NIP1;1	5,07	0,00	0,00	5,07
NIP2;1	6,94	0,00	0,00	6,94
NIP4;2	0,00	5,30	5,30	5,30

B

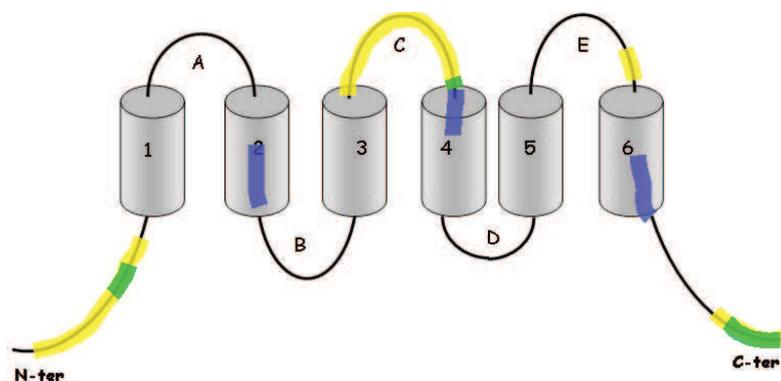


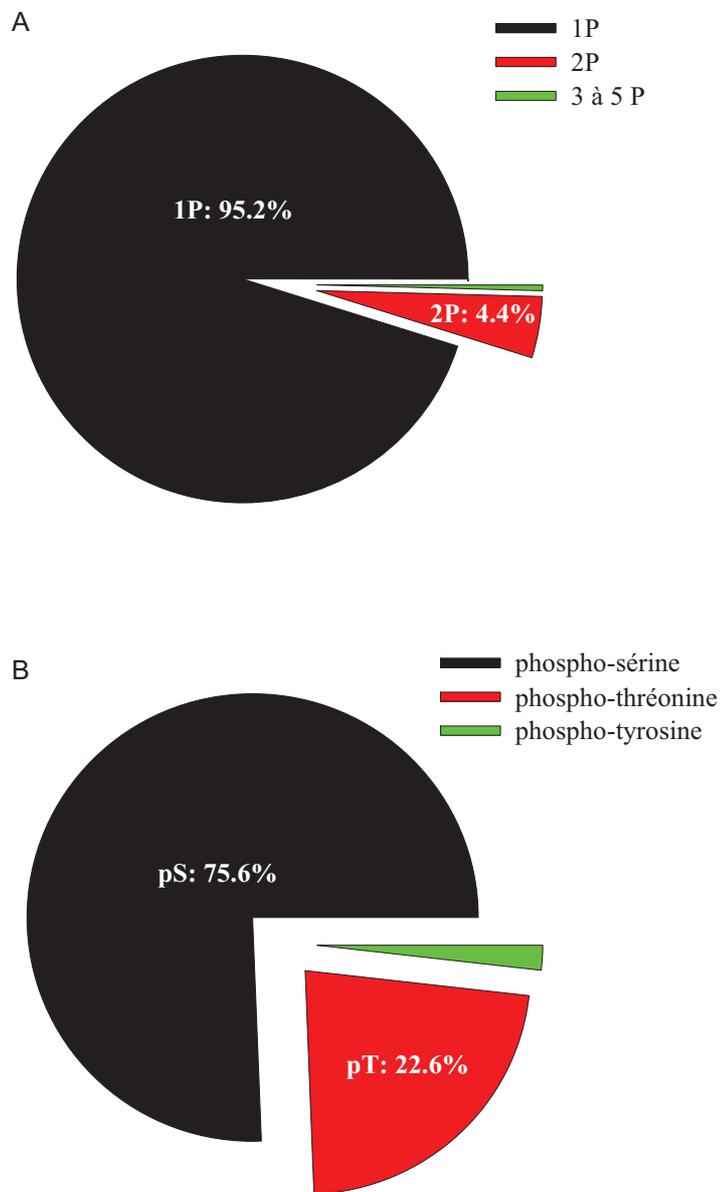
Figure 23 : Couverture de séquence des aquaporines.

Le tableau (A) présente les isoformes d'aquaporines (colonne 1), la couverture de séquence (CS) protéotypique obtenue après la double digestion LysC/trypsin (colonne 2) et après la double Chymo/AspN (colonne 3), le pourcentage de CS supplémentaire apporté par la digestion Chymo/AspN (colonne 4) et la CS protéotypique totale (colonne 5).

Le schéma (B) présente l'exemple de la CS de PIP2;4 (jaune: LysC/trypsin, bleu: Chymo/AspN, vert: LysC/trypsin et Chymo/aspN).

Concernant les aquaporines, la double digestion LysC/trypsine a permis d'identifier les 13 isoformes de la famille PIPs, 2 TIPs (TIP2;2 et TIP2;3) et 2 NIPs (NIP1;1 et NIP2;1) par un total de 99 peptides dont 72 sont protéotypiques (tableau 5). Les peptides protéotypiques générés par cette digestion et décrits dans nos expériences couvrent 4 à 21 % de la séquence totale des aquaporines. La meilleure couverture est obtenue pour les PIPs (figure 23A). C'est ce que nous appelons la couverture de séquence protéotypique. La digestion Chymo/AspN a permis d'identifier 10 PIPs (les 5 PIP1s ainsi que PIP2;1, PIP2;4, PIP2;5, PIP2;7 et PIP2;8), 6 TIPs (TIP1;1, TIP1;2, TIP2;1, TIP2;2, TIP2;3 et TIP4;1) et 2 ou 3 NIPs (NIP1;1 et/ou 1;2 et NIP4;2) par un total de 162 peptides dont 106 sont protéotypiques (tableau 6). Dans ces conditions, leur couverture de séquence protéotypique varie entre environ 3 et 46 %. Cette digestion a une meilleure efficacité que la précédente pour détecter les TIPs et permet d'améliorer la couverture de séquence protéotypique des aquaporines PIPs (figure 23A). Par exemple, la digestion LysC/trypsine dégage des peptides des extrémités N- et C-terminales de PIP2;4 ainsi que des boucles C et E et la digestion Chymo/AspN augmente sa couverture de séquence d'environ 9 % en dégageant des peptides des hélices 2, 4 et 6 (figure 23B). Les boucles A, B, et D et les hélices 1, 3 et 5 des PIPs restent inaccessibles. Finalement, l'utilisation de ces deux digestions permet d'obtenir une couverture de séquence protéotypique des PIPs de 4 à 30 % et des TIPs de 9 à 46 % (figure 23A). L'utilisation des deux doubles digestions a donc permis d'améliorer l'inventaire des aquaporines et leur couverture de séquence.

Au final, les 13 PIPs ont été identifiées. En accord avec l'idée que PIP2;6 montre une spécificité d'expression pour la partie aérienne [71], cette isoforme n'a été identifiée qu'après digestion LysC/trypsine et enrichissement en phosphopeptides et par un seul peptide protéotypique phosphorylé. En l'absence de tout autre peptide protéotypique, il est difficile de conclure que PIP2;6 soit effectivement présente dans l'échantillon microsomal. Les 6 TIPs prédites comme racinaires (eFP Browser) ont été identifiées. Concernant les NIPs, NIP1;1 et NIP2;1 ont été identifiées après la digestion LysC/trypsine. La digestion Chymo/AspN a permis d'identifier un peptide commun à NIP1;1 et NIP1;2. NIP1;2 n'étant pas prédite comme racinaire (eFP Browser), ce peptide devrait correspondre à l'isoforme NIP1;1. D'autre part, deux peptides protéotypiques (l'un non modifié, l'autre oxydé) de NIP4;2 ont été identifiés, alors que cette aquaporine est prédite comme spécifique du tube pollinique. Des analyses complémentaires basées sur l'utilisation d'anticorps spécifiques seront nécessaires pour confirmer l'expression racinaire de NIP4;2.



**Figure 24 :** Types de phosphopeptides (A) et d'acides aminés phosphorylés (B) identifiés par MS après la double digestion des protéines par LysC/ trypsine.

Tableau 7 : Positions des sites de phosphorylation d'aquaporines.

Protéine	Région	Forme	Séquence et position potentielle	Score	p-value	Position	Références
NIP1;1	N-ter	1P	<sup>42</sup> KQDSL <u>LS</u> SVSPFLQK <sup>56</sup>	<b>56,74</b>	<b>2,10E-06</b>	S45 / S48	
			<sup>42</sup> KQD <u>S</u> LLSVSPFLQK <sup>56</sup>	<b>54,78</b>	<b>3,30E-06</b>		
NIP2;1	N-ter	1P	<sup>1</sup> MDDIS <u>V</u> SK <sup>8</sup>	<b>10,99</b>	<b>0,08</b>	S5	
			<sup>1</sup> MDDIS <u>V</u> SK <sup>8</sup>	4,97	0,32		
PIP1;1/ PIP1;2	N-ter	1P	<sup>19</sup> QPIG <u>T</u> SAQSDK <sup>29</sup>	<b>4,7</b>	<b>0,34</b>	T23/S24/S27 Chymo/AspN: S24	
			<sup>19</sup> QPIG <u>T</u> SAQSDK <sup>29</sup>	<b>4,7</b>	<b>0,34</b>		
			<sup>19</sup> QPIG <u>T</u> SAQSDK <sup>29</sup>	<b>4,7</b>	<b>0,34</b>		
PIP2;1/ PIP2;2/ PIP2;3	C-ter	1P	<sup>277</sup> SLG <u>S</u> FR <sup>282</sup>	<b>33,76</b>	<b>0,00042</b>	S277	
			<sup>277</sup> SLG <u>S</u> FR <sup>282</sup>	5,86	0,26		
		1P	<sup>277</sup> SLG <u>S</u> FR <u>S</u> AANV <sup>287</sup>	<b>24,46</b>	<b>0,0036</b>	S280 / S283	[54]
			<sup>277</sup> SLG <u>S</u> FR <u>S</u> AANV <sup>287</sup>	8,95	0,13		
		2P	<sup>277</sup> SLG <u>S</u> FR <u>S</u> AANV <sup>287</sup>	<b>15,48</b>	<b>0,028</b>	S280 + S283	[45, 46, 49, 51, 54, 56, 59, 220]
			<sup>277</sup> SLG <u>S</u> FR <u>S</u> AANV <sup>287</sup>	4,38	0,36		
			<sup>277</sup> SLG <u>S</u> FR <u>S</u> AANV <sup>287</sup>	4,38	0,36		
PIP2;2	N-ter	1P	<sup>15</sup> DYEDPPPTPFDADEL <u>T</u> K <sup>32</sup>	26,52	0,0022	T22	
			<sup>15</sup> DYEDPPPTPFDADEL <u>T</u> K <sup>32</sup>	<b>46,61</b>	<b>2,20E-05</b>		
			<sup>15</sup> DYEDPPPTPFDADEL <u>T</u> K <sup>32</sup>	9,65	0,11		
PIP2;4	C-ter	1P	<sup>277</sup> ALG <u>S</u> FGSFGSFR <sup>287</sup>	51,27	7,50E-06	S282 / S285	[57, 59]
			<sup>277</sup> ALG <u>S</u> FGSFGSFR <sup>287</sup>	<b>62,96</b>	<b>5,10E-07</b>		
			<sup>277</sup> ALG <u>S</u> FGSFGSFR <sup>287</sup>	<b>62,96</b>	<b>5,10E-07</b>		
PIP2;5	C-ter	1P	<sup>276</sup> ALG <u>S</u> FR <u>S</u> QPHV <sup>286</sup>	<b>24,46</b>	<b>0,0036</b>	S279 / S282	PhosphAt
			<sup>276</sup> ALG <u>S</u> FR <u>S</u> QPHV <sup>286</sup>	<b>24,46</b>	<b>0,0036</b>		
PIP2;6	N-ter	1P	<sup>3</sup> DEL <u>T</u> EEESLSGK <sup>14</sup>	<b>4,51</b>	<b>0,35</b>	T6 / S10 / S12	[58]
			<sup>3</sup> DEL <u>T</u> EEESLSGK <sup>14</sup>	<b>4,51</b>	<b>0,35</b>		
			<sup>3</sup> DEL <u>T</u> EEESLSGK <sup>14</sup>	<b>4,51</b>	<b>0,35</b>		
PIP2;7	C-ter	1P	<sup>270</sup> ALG <u>S</u> FR <u>S</u> NATN <sup>280</sup>	15,48	0,028	S273	[45, 54, 58, 220]
			<sup>270</sup> ALG <u>S</u> FR <u>S</u> NATN <sup>280</sup>	32,87	0,00052		
			<sup>270</sup> ALG <u>S</u> FR <u>S</u> NATN <sup>280</sup>	<b>43,32</b>	<b>4,70E-05</b>		
		2P	<sup>270</sup> ALG <u>S</u> FR <u>S</u> NATN <sup>280</sup>	16,1	0,025	S273 + S276	[45, 46, 49, 53, 54, 58, 59, 220]
			<sup>270</sup> ALG <u>S</u> FR <u>S</u> NATN <sup>280</sup>	16,1	0,025		
		1P	<sup>265</sup> ASA <u>I</u> KALG <u>S</u> FR <sup>275</sup>	<b>4,82</b>	<b>0,33</b>	S273	[58]
PIP2;8	C-ter	1P	<sup>268</sup> ALASFR <u>S</u> NPTN <sup>278</sup>	4,7	0,34	S271	
			<sup>268</sup> ALASFR <u>S</u> NPTN <sup>278</sup>	17,49	0,018		
			<sup>268</sup> ALASFR <u>S</u> NPTN <sup>278</sup>	<b>36,89</b>	<b>0,0002</b>		
		2P	<sup>268</sup> ALASFR <u>S</u> NPTN <sup>278</sup>	4,6	0,35	S271 + S274	[58, 59, 220]
			<sup>268</sup> ALASFR <u>S</u> NPTN <sup>278</sup>	4,6	0,35		
			<sup>268</sup> ALASFR <u>S</u> NPTN <sup>278</sup>	<b>16,76</b>	<b>0,021</b>		

Les colonnes 1 et 2 décrivent le nom de l'aquaporine et la région portant le phosphopeptide identifié. La colonne 3 décrit la forme du peptide (1P ou 2P). La colonne 4 décrit la séquence du peptide phosphorylé avec sa position dans la protéine et la ou les position(s) potentielle(s) du ou des site(s) de phosphorylation. Les colonnes 5 et 6 décrivent les scores et p-value calculés par Phoscalc, permettant de définir la ou les positions les plus probables de phosphorylation (caractères gras, colonne 7). L'indication Sx/Sy signifie que la position de la phosphorylation reste ambiguë et qu'il est impossible de discriminer entre les deux sites potentiels de phosphorylation x et y. Ce peptide existe donc sous la forme modifiée sur Sx ou sur Sy ou sous la forme d'un mélange de ces 2 peptides monophosphorylés. La colonne 8 présente les études dans lesquelles les peptides ont déjà été identifiés. La mention "PhosphAt" signifie que le site est répertorié sur PhosphAt mais que la référence bibliographique n'est pas spécifiée. Lorsqu'aucune référence bibliographique n'est spécifiée, le site n'a été identifié phosphorylé dans aucune étude. Chymo/AspN: S24 signifie que la position du site phosphorylé a pu être spécifiée



Finalement, toutes les isoformes d'aquaporines prédites comme racinaires, excepté SIP1;1 ont été identifiées. La méthode de préparation des échantillons semble donc efficace pour l'étude protéomique des aquaporines.

### .III.3 Inventaires des protéines phosphorylées

Dans le but d'identifier les protéines phosphorylées, les protéines microsomaux hydrophobes ont été digérées par la LysC/trypsine, puis enrichies en phosphopeptides par fractionnement sur colonne SCX combiné à l'utilisation de colonnes de titane.

La majorité des peptides phosphorylés (95%) porte une seule phosphorylation et moins de 5% sont diphosphorylés (figure 24A). De façon comparable aux résultats obtenus dans d'autres études [58, 220], la majorité des phosphorylations est portée par les résidus sérines (75,6 %) et thréonines (22,6 %). En revanche, seules 1,8 % sont portées par un résidu tyrosine, ce qui est comparable à la distribution décrite par Reiland *et al.* (2009) mais qui est significativement inférieure à celle décrite par Sugiyama *et al.* (2008) (figure 24B).

Parmi les 17 aquaporines identifiées, 9 à 12 ont été identifiées phosphorylées, avec un total de 20 phosphopeptides (tableau 7). Le nombre d'aquaporines phosphorylées ne peut pas être plus précis car certains peptides ne sont pas protéotypiques. Les aquaporines phosphorylées sont PIP1;1/1;2, PIP2;1/2;2/2;3, PIP2;2, PIP2;4, PIP2;5, PIP2;6, PIP2;7, PIP2;8, NIP1;1 et NIP2;1. Les sites de phosphorylation ont été identifiés à l'aide du logiciel Mascot. En cas d'ambiguïté, la probabilité pour chaque site d'être phosphorylé est calculée à l'aide du logiciel Phoscalc (tableau 7). Phoscalc est un algorithme qui calcule la probabilité pour chaque site d'être phosphorylé en confrontant les fragments MS/MS expérimentaux aux fragments MS/MS théoriques, obtenus *in silico*. L'ambiguïté fréquente du positionnement d'un site phosphorylé est en partie due au mode de fragmentation CID (*Collision Induced dissociation*). En effet, ce mode de fragmentation libère une forte quantité d'énergie qui conduit à une perte des modifications labiles telles que la phosphorylation. La méthode de fragmentation ETD (*Electron Transfer Dissociation*), non utilisée dans cette étude, requiert une quantité d'énergie moins forte que le CID, ce qui lui permet de mieux préserver les phosphorylations (pour revue [221]). Sachant que la méthode CID permet une meilleure identification des peptides car elle génère des ions de plus forte intensité que l'ETD, il faudrait idéalement combiner les deux méthodes de fragmentation.

En résumé, les sites de phosphorylation ont été identifiés sur les extrémités N- et C-terminales des aquaporines. Sept de ces sites n'avaient pas été décrits auparavant dans la littérature. Il s'agit des sites suivants :



- S45 / S48 de NIP1;1,
- S5 de NIP2;1,
- S24 de PIP1;1/1;2,
- S277 de PIP2;1/2;2/2;3,
- T22 de PIP2;2,
- S10 de PIP2;4
- S271 de PIP2;8.

L'identification d'une phosphorylation sur le résidu S24 de PIP1;1/1;2 avec la double digestion Chymo/AspN (tableau 6) permet de lever l'ambiguïté de la position de ce site de phosphorylation obtenue avec la digestion LysC/trypsine (tableau 5). La position d'un seul site de phosphorylation reste donc ambiguë. D'autre part, concernant l'extrémité C-terminale de PIP2;1/2;2/2;3, le peptide <sup>277</sup>SLGSFR<sup>282</sup> est monophosphorylé (1P) sur le résidu S277, le peptide <sup>277</sup>SLGSFRSAANV<sup>287</sup> est 1P sur le résidu S280 et/ou S283 ou diphosphorylé (2P) sur les résidus S280 et S283. Comme la forme 1P sur S283 n'a jamais été identifiée auparavant sur le même type d'échantillon [54], cela suggère que la monophosphorylation concerne le résidu S280 (tableau 7). En revanche, certaines formes multiphosphorylées décrites dans la littérature n'ont pas été identifiées dans cette étude, telles que les formes 2P de l'extrémité C-terminale de PIP2;4, PIP2;5 et PIP2;6 (PhosphAt et [51, 54, 58]) et les formes triphosphorylées de l'extrémité C-terminale de PIP2;4 et PIP2;7 [54, 58, 220]). Ceci peut s'expliquer par l'utilisation de méthodes différentes d'enrichissement en phosphopeptides (IMAC combinée ou non à une colonne de titane), et de différents modes d'ionisation (MALDI ou ESI) [54, 58, 220].

En conclusion, cette étude a permis d'identifier 22 aquaporines ainsi que 7 nouveaux sites de phosphorylation d'aquaporines, justifiant ainsi les choix méthodologiques.

#### **.III.4 Inventaire des autres MPTs**

Cette étude a permis d'identifier 13 à 15 nouveaux sites de méthylation avec la digestion LysC/trypsine (tableau 5) sur des résidus sérines, lysines et acides aspartiques ou glutamiques de l'extrémité N-terminale d'aquaporines PIPs et TIPs ou de la boucle C d'aquaporines PIPs. La méthylation existe sous forme mono et di-méthylée.

Les aquaporines PIPs ont également été identifiées formylées sur l'extrémité N- et C-terminale ainsi que sur la boucle C (4 sites, sur des résidus lysines, tableau 5).

Un total de 25 ou 26 sites de déamidation (la position de l'un d'entre eux est ambiguë) ont été identifiés avec les deux doubles digestions, sur des résidus acides aspartiques ou



asparagines des aquaporines PIPs, sur leurs extrémités N- et C-terminales ainsi que leurs boucles C et E ; concernant les aquaporines TIPs, 11 sites de déamidation ont été identifiés avec la digestion Chymo/AspN (extrémités N- et C-terminales, boucle A, boucle D, hélice 3). La déamidation existe sous trois formes : la mono-, di- et tri-déamidation.

Les deux doubles digestions ont permis de répertorier 10 méthionines oxydées sur des aquaporines PIP (extrémité N-terminale, hélice 6), TIP (hélice 1) et NIP (extrémité N-terminale, boucle C).

Les extrémités N-terminales d'isoformes PIP1s et NIP ont été identifiées acétylées sur leur méthionine initiatrice.

### **.III.5 Analyse quantitative**

Etant données les contraintes de temps liées à l'obtention des données de MS, il n'a pas été possible d'analyser l'ensemble des traitements pendant le temps de ce travail de thèse. Nous avons donc choisi de diviser les analyses en deux séries, chacune étant composée d'un stress de chaque type. La première série a comporté le contrôle général et les traitements par le NaCl, le standard DEA-NO et le traitement DEA-NO, ainsi que la carence et réalimentation en phosphate. Cette première série a visé à évaluer l'impact de trois stimuli différents (osmotique, oxydatif et nutritionnel) et de rechercher les spécificités de chaque traitement ainsi que d'identifier d'éventuelles similitudes de régulations.

#### **.III.5.a Obtention des données**

Lors de la première analyse MS, le spectromètre de masse fournit l'intensité, le rapport masse/charge ( $m/z$ ) et le temps de rétention ( $t_r$ ) des peptides. Ces données sont répertoriées dans le logiciel Profile Analysis (Bruker Daltonics). A ce stade, les intensités des signaux sont comparées entre deux situations (exemple : contrôle général et NaCl  $t_{1/2}$ ). Lorsque les intensités sont différentes, les peptides correspondants sont séquencés par MS/MS. Par conséquent, les peptides dont la quantité ne varie dans aucune condition ne figurent pas dans l'analyse.

Les résultats sont organisés par fraction (F1, F234, F567, F4589, F6 et F7), chacune regroupant les protéines pour lesquelles des données de quantification sont disponibles. Pour chaque protéine, nous disposons d'une liste de peptides. Pour chaque peptide, le logiciel Protein Scape répertorie sa séquence, sa position dans la séquence protéique, sa ou ses MPT, son score d'identification Mascot, le taux de variation de son abondance entre les deux situations comparées et la valeur de probabilité (p-value) associée (matériel et méthode



VII.8.a). La liste de protéines et peptides quantifiés a ensuite été exportée vers un fichier Excel, dans lequel les données de quantification relative ainsi que les p-value associées ont été reportées. Un problème réside dans le fait qu'un peptide peut apparaître plusieurs fois dans une analyse pour les raisons suivantes : (1) il peut être quantifié dans plusieurs fractions issues de colonnes SCX, (2) il n'est pas protéotypique et donc peut être associé à plusieurs protéines, et (3) il peut s'agir d'un peptide modifié dont la modification peut être positionnée sur plusieurs acides aminés différents. Par exemple, le peptide de séquence SLGSFRSAANV appartient aux protéines PIP2;1, PIP2;2 et PIP2;3 et peut être phosphorylé sur la deuxième ou la troisième sérine. Dans ce cas, ce peptide sous forme 1P peut apparaître six fois dans l'analyse et sa quantification peut même varier. Les paramètres suivants ont été utilisés pour discriminer ces peptides :

- Le score d'identification : Les données associées au peptide ayant le meilleur score sont sélectionnées.

- La fraction : Dans le cas d'un peptide phosphorylé, les données obtenues dans une fraction enrichie en phosphopeptides (F1, F234 ou F567) sont privilégiées.

- La valeur du rapport quantitatif obtenue en comparant les conditions  $t_{max}$  et  $t_{1/2}$  ( $t_{max}/t_{1/2}$ ) doit être cohérente avec celles des rapports quantitatifs obtenues pour  $t_{1/2}/Contrôle$  et  $t_{max}/Contrôle$ .

- Le couple rapport/p-value est vérifié avec le logiciel Profile Analysis qui calcule le rapport quantitatif à partir des aires. Les points aberrants sont retirés manuellement puis le logiciel ProfileAnalysis est utilisé pour recalculer le rapport quantitatif et la p-value associée.

Quand aucun de ces quatre paramètres ne permet de conclure, le peptide est ôté de l'analyse.

### **.III.5.b Classification globale**

Une classification hiérarchique a été réalisée avec l'ensemble des peptides d'aquaporines issus des deux doubles digestions, dans le but de comparer simultanément leurs variations d'abondance en réponse aux quatre traitements NaCl, DEA-NO, carence et réalimentation en phosphate. Les peptides sont identifiés par des numéros répertoriés dans l'annexe. Pour cela, pour chaque peptide et chacune des conditions, des rapports quantitatifs en référence au contrôle général ont été calculés. Ces valeurs, ainsi que la valeur de 1 attribuée à la condition de contrôle général, ont été centrées et réduites (matériel et méthode VIII.2.). Certains peptides ne sont pas quantifiés dans toutes les conditions. Les peptides pour lesquels le nombre de données manquantes est supérieur à 5, sur un total de 8, n'ont pas été pris en

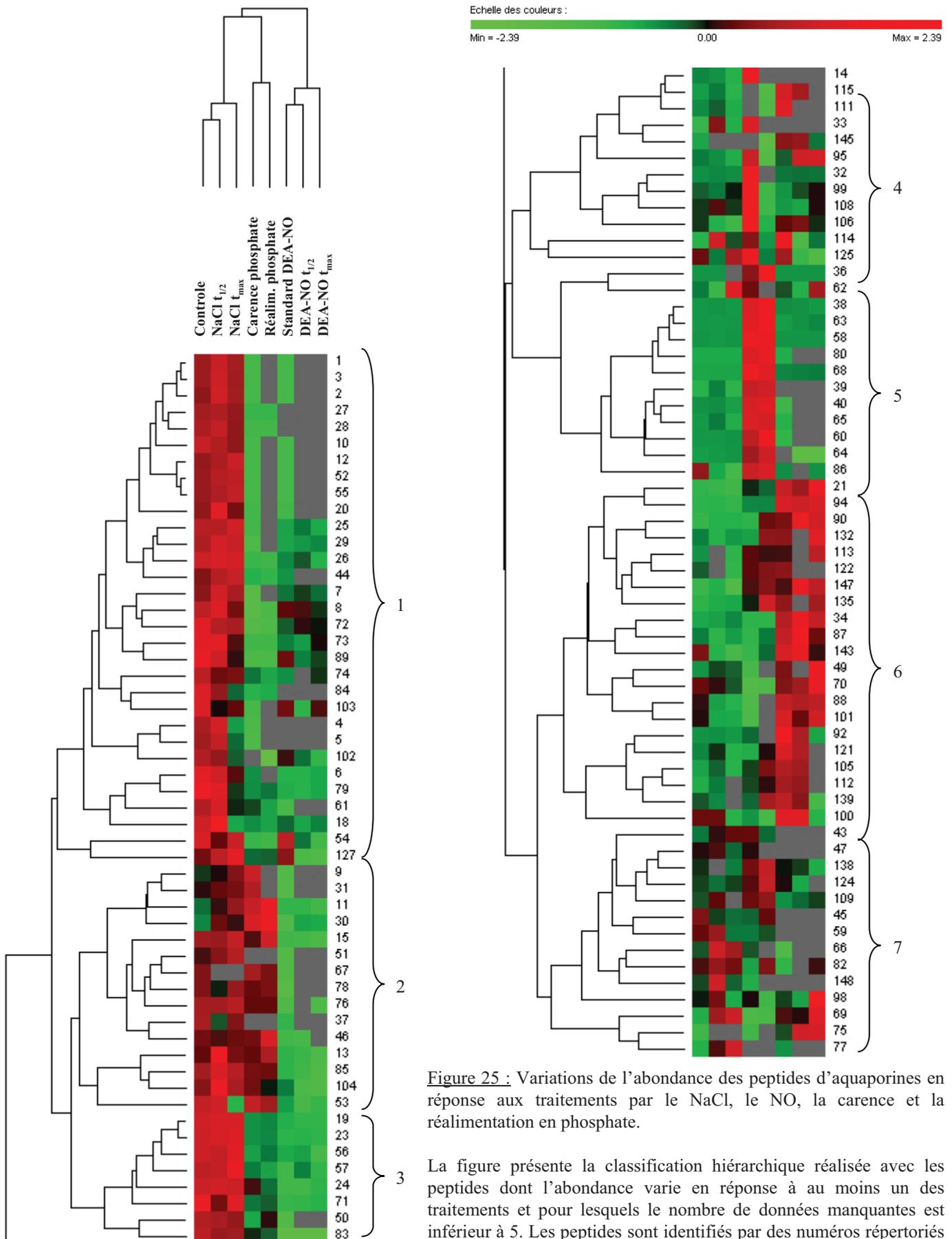


Figure 25 : Variations de l'abondance des peptides d'aquaporines en réponse aux traitements par le NaCl, le NO, la carence et la réalimentation en phosphate.

La figure présente la classification hiérarchique réalisée avec les peptides dont l'abondance varie en réponse à au moins un des traitements et pour lesquels le nombre de données manquantes est inférieur à 5. Les peptides sont identifiés par des numéros répertoriés dans l'annexe. Les annotations de 1 à 7 représentent les groupes de peptides ayant un comportement similaire.

compte dans l'analyse, sans quoi le résultat de la classification hiérarchique aurait été biaisé par le nombre trop important de données manquantes. Les rapports quantitatifs significativement différents de 1 ne représentent que 27 % des données. Aussi, nous avons pris en compte les peptides dont la variation d'abondance est significative dans au moins une condition et gardé les rapports quantitatifs des autres conditions même s'ils ne révèlent pas de différences significatives.

Cette figure (figure 25) classe des données issues de 99 peptides de PIPs dont 50 % ne sont pas modifiés, 20 % sont phosphorylés, 16 % déamidés, 4 % acétylés, 3 % méthylés, 4 % oxydés et 2 % formylés, et 15 peptides de TIPs non modifiés. Cette classification hiérarchique groupe donc majoritairement des peptides non modifiés.

#### **.III.5.b.i Classification des traitements**

Le traitement le plus proche du contrôle est le traitement salin et le plus distant est le traitement DEA-NO. Les résultats précédemment obtenus par test ELISA montrent que le standard DEA-NO provoque une forte diminution de la quantité d'aquaporines PIP1s et PIP2s, de respectivement 40 % et 50 % (figure 20B) alors que la carence phosphate et le traitement NaCl ne modifient pas ou peu la teneur en aquaporines PIP1s et PIP2s (figure 20D). Il semble donc cohérent que le traitement DEA-NO soit globalement davantage éloigné du contrôle que les deux autres traitements (figure 25).

#### **.III.5.b.ii Classification des peptides**

La classification hiérarchique s'organise autour de sept groupes dont les profils de variation quantitative sont différents (figure 25). Le 1<sup>er</sup> et le 3<sup>ème</sup> regroupent les peptides dont la quantité, par rapport au contrôle général, diminue en réponse aux traitements DEA-NO et phosphate. Cependant, le 3<sup>ème</sup> groupe se distingue du 1<sup>er</sup> par la diminution moins forte en réponse à la carence et plus forte en réponse au traitement DEA-NO. Le 2<sup>ème</sup> groupe contient des peptides dont la quantité diminue en réponse au traitement DEA-NO. Le 4<sup>ème</sup> groupe contient des peptides dont la quantité augmente en carence phosphate, diminue en réalimentation phosphate et dont la réponse au traitement DEA-NO est variable. Il s'agit du seul groupe qui contient des peptides pour lesquels la réalimentation en phosphate provoque une diminution par rapport à la carence. Dans les autres groupes, la réalimentation n'a pas d'effet. Cela concerne six peptides appartenant à des PIP1s, PIP2s ou TIP1s, situés sur leur boucle E ou C ou sur leur hélice 1 ou 5 et qui ne sont pas modifiés. Le 5<sup>ème</sup> groupe contient des peptides dont la quantité augmente en réponse au traitement phosphate. Le 6<sup>ème</sup> groupe



contient des peptides dont la quantité augmente en réponse au traitement DEA-NO. Leur réponse au traitement phosphate peut être une diminution ou une augmentation. Enfin, le 7<sup>ème</sup> regroupe les peptides dont le comportement par traitement n'est pas aussi identifiable que ceux des six premiers groupes.

D'un point de vue qualitatif, l'analyse de cette classification hiérarchique montre qu'aucun groupe ne correspond strictement à une sous famille d'aquaporines, une MPT particulière ou même une région particulière de ces protéines. Notons toutefois que le regroupement des régions protéiques reste peu interprétable car la couverture de séquence est inégale entre aquaporines. D'autre part, la fréquence d'apparition d'une région protéique dans la liste d'identification dépend du nombre de fois où la séquence protéique correspondante apparaît. Or, une séquence identifiée avec plusieurs états de MPT augmente la fréquence d'apparition de la région correspondante. De même, le regroupement selon le type de MPT est peu approprié car cette étude a privilégié l'identification des phosphopeptides et non d'autres modifications qui peuvent ainsi être sous-estimées.

### **.III.5.c Classification traitement par traitement**

L'analyse globale restant peu informative, les peptides ont été classés selon chaque traitement. Comme dans l'analyse précédente, seuls les peptides pour lesquels le traitement provoque au moins une variation quantitative significative sont pris en compte.

Lorsque la quantité d'un peptide modifié varie, une variation proportionnelle et opposée de la quantité du peptide non modifié correspondant est attendue. Cependant, le peptide non modifié correspondant n'est pas systématiquement identifié ou les variations mesurées peuvent ne pas être cohérentes entre les deux formes du peptide. Dans ce dernier cas, une hypothèse est qu'une autre MPT pourrait modifier cette région protéique et générer un autre peptide non identifié dans le cadre de cette étude. Dans la mesure où cette situation pourrait être fréquente, nous n'avons pas cherché à établir systématiquement de relation proportionnelle entre la variation quantitative des formes modifiées et non modifiées d'un même peptide. Lorsque seule la quantité d'un ou deux peptides par protéine varie, les données ne sont pas suffisamment informatives pour conclure quant à l'abondance de la protéine. Dans ce cas, une confrontation avec les données de quantification par ELISA peut permettre de conclure. L'interprétation de la quantification de chaque peptide a donc tenu compte des variations d'abondance des aquaporines PIP1s et PIP2s mesurées par ELISA (figure 20). Ainsi, lorsque la quantité d'un peptide varie de façon similaire aux variations protéiques

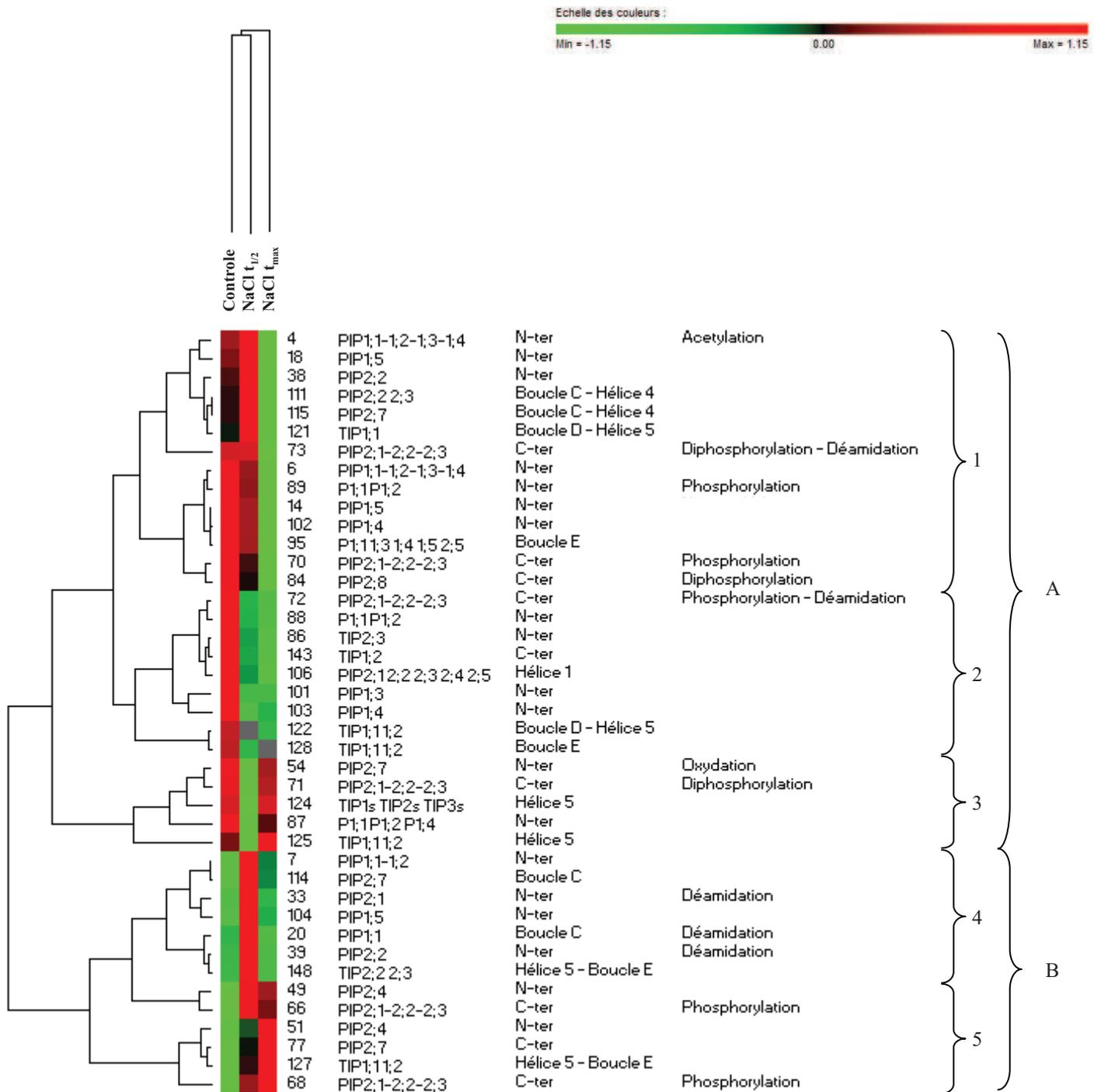


Figure 26 : Variations de l'abondance des peptides d'aquaporines en réponse au traitement NaCl.

La figure présente la classification hiérarchique réalisée avec les peptides pour lesquels le traitement provoque au moins une variation quantitative significative, le numéro d'identification des peptides (annexe), l'isoforme(s) qu'ils caractérisent, la région protéique correspondante et leur état de MPT. Lorsqu'aucune MPT n'est spécifiée, le peptide n'est pas modifié. Les accolades de 1 à 5, ainsi que A et B, représentent les groupes de peptides ayant un comportement similaire.

mesurées par ELISA, ce peptide est considéré comme un marqueur fiable de l'abondance de la protéine. En ce qui concerne les peptides modifiés, le peptide est considéré variant uniquement si son taux de variation est plus fort que celui de l'abondance des aquaporines. D'autre part, deux méthodes d'agrégation (méthodes d'agrégation de Mc Quitty et de Ward's) ont systématiquement été menées pour la réalisation des classifications hiérarchiques de façon à vérifier la validité du regroupement des peptides. Comme les deux méthodes fournissent des résultats similaires, seules les classifications hiérarchiques calculées selon la méthode de Mc Quitty sont présentées.

### **.III.5.c.i NaCl**

Parmi les 122 peptides quantifiés dans le traitement NaCl, 41 ont une abondance qui varie significativement en réponse à au moins un des deux temps de traitement. La classification hiérarchique est divisée en deux grandes parties (A et B). La première (A) est subdivisée en trois sous-parties qui regroupent les peptides dont la quantité diminue de façon (1) monotone et tardive, (2) monotone et précoce ou (3) transitoire. La deuxième partie (B) est divisée en deux sous-parties qui regroupent les peptides dont la quantité augmente de façon (4) transitoire ou (5) monotone et précoce (figure 26).

Ces groupes ne rassemblent pas les peptides selon l'isoforme ni la région protéique qu'ils caractérisent. En revanche, trois peptides déamidés sont regroupés dans la 4<sup>ème</sup> partie (figure 26). Ils caractérisent l'extrémité N-terminale ou la boucle C des aquaporines PIP1s et PIP2s. Huit autres peptides déamidés ont été quantifiés mais leur quantité ne varie pas dans ce contexte. Ils n'apparaissent donc pas dans cette classification.

Les peptides phosphorylés sont majoritairement regroupés dans la première grande partie. Il s'agit des peptides :

- de l'extrémité N-terminale de PIP1;1/1;2 sous la forme 1P dont la quantité diminue tardivement (figure 26), suggérant une réelle diminution de cette phosphorylation puisque l'abondance des aquaporines PIP1s ne varie pas en réponse à ce traitement (figure 20A).

- de l'extrémité C-terminale de PIP2;8 sous la forme 2P dont la quantité diminue tardivement. Cette diminution peut correspondre à une réelle diminution de la phosphorylation ou à une diminution de l'abondance de la protéine elle-même. En l'absence de données de quantification ELISA et de quantification d'autres peptides de PIP2;8, il est difficile de conclure.

- de l'extrémité C-terminale de PIP2;1/2;2/2;3, pour laquelle trois peptides ont été identifiés (<sup>277</sup>SLGSFR<sup>282</sup>, <sup>272</sup>ASGSKSLGSFR<sup>282</sup> et <sup>277</sup>SLGSFRSAANV<sup>287</sup>). Sachant que la

Tableau 8 : Données de variations quantitatives relatives aux peptides de l'extrémité C-terminale des isoformes PIP2;1/2;2/2;3.

Séquence	Modification post-traductionnelle	NaCl		NO			
		45 min p-value	2 h p-value	standard DEA-NO	p-value		
<sup>272</sup> ASGSKSLGSFR <sup>282</sup>	Phosphorylation : S280	<b>2,04</b>	<b>0,0118</b>	1,67	0,1260	0,00	
<sup>277</sup> SLGSFR <sup>282</sup>	Phosphorylation : S277	<b>1,33</b>	<b>0,0207</b>	1,47	0,2328	<b>10,00</b>	<b>0,0034</b>
<sup>277</sup> SLGSFRSAAENV <sup>287</sup>	Non modifié	1,64	0,2389	1,85	0,3782	1,43	0,9367
	Phosphorylation : S280/S283	0,91	0,0901	<b>0,80</b>	<b>0,0201</b>	<b>1,05</b>	<b>1,0E-05</b>
	Diphosphorylation : S280 et S283	<b>0,60</b>	<b>0,0295</b>	<b>0,93</b>	<b>0,0359</b>	<b>0,16</b>	<b>1,0E-05</b>

Ce tableau présente la séquence du peptide (colonne 1) et son état de MPT (colonne 2). Les colonnes 3 à 8 présentent les rapports quantitatifs et les p-values associées (caractère gras = différence significative, test de Student avec p<0,05) obtenus en réponse au traitement NaCl (3 à 6) et standard DEA-NO (7 et 8). Un rapport quantitatif de valeur 0 signifie que le peptide n'a pas été détecté en condition de standard DEA-NO.

forme 1P concerne le résidu S280 plutôt que S283 [54], l'analyse de ces trois peptides montre que l'extrémité C-terminale de PIP2;1/2;2/2;3 existe sous deux formes différentes 1P (sur le résidu S277 et le résidu S280) et sous une forme 2P (sur les résidus S280 + S283). Sachant que l'abondance des aquaporines PIP2;1/2;2/2;3 ne varie pas (figure 20A), les variations d'abondance des peptides phosphorylés reflètent de réelles variations du degré de phosphorylation en réponse à NaCl (tableau 8). L'augmentation transitoire de la phosphorylation de S280 (peptide 1P) s'accompagne d'une baisse de la phosphorylation du peptide 2P (S280 + S283), suggérant une déphosphorylation transitoire de la phosphorylation de S283 et une absence de variation de celle de S280. Parallèlement, la phosphorylation du résidu S277 augmente au moins transitoirement (tableau 8). La phosphorylation du résidu S277 serait donc régulée de manière opposée à celle du résidu S283, au moins transitoirement.

D'autre part, la quantité d'un peptide protéotypique de l'extrémité N-terminale de TIP2;3 est fortement diminuée d'un facteur 6 après 2 h de traitement. Parmi l'ensemble des peptides analysés, il s'agit du peptide dont la quantité diminue le plus fortement en réponse au traitement NaCl. Cette diminution peut être liée soit à une dégradation de la protéine, soit à une variation de l'abondance du peptide méthylé (non quantifié dans cette étude), soit à une MPT non identifiée de l'extrémité N-terminale, en réponse au traitement NaCl. En l'absence d'information sur d'autres peptides protéotypiques, nos données sont insuffisantes pour trancher entre ces trois hypothèses. Des études complémentaires seront donc nécessaires. Sachant qu'aucun anticorps spécifique de TIP2;3 n'est disponible, des approches biochimiques et d'imagerie ont été entreprises sur des plantes exprimant la protéine TIP2;3 fusionnée à la protéine fluorescente YFP. Une caractérisation de lignées mutantes invalidées *tip2;3* a également été menée. Les résultats de cette étude sont développés dans le chapitre 3 intitulé "TIP2;3".

En résumé, ces résultats montrent que le traitement par le NaCl induit différents types d'effets sur différentes aquaporines : une augmentation transitoire de la déamidation des aquaporines PIP1s et PIP2s, une régulation complexe de l'état de phosphorylation de l'extrémité C-terminale de PIP2;1/2;2/2;3 mettant en évidence une relation inverse des phosphorylations sur les résidus S277 et S283, une régulation de la phosphorylation de l'extrémité N-terminale de PIP1;1/1;2 et enfin une forte régulation de l'extrémité N-terminale d'une aquaporine TIP.

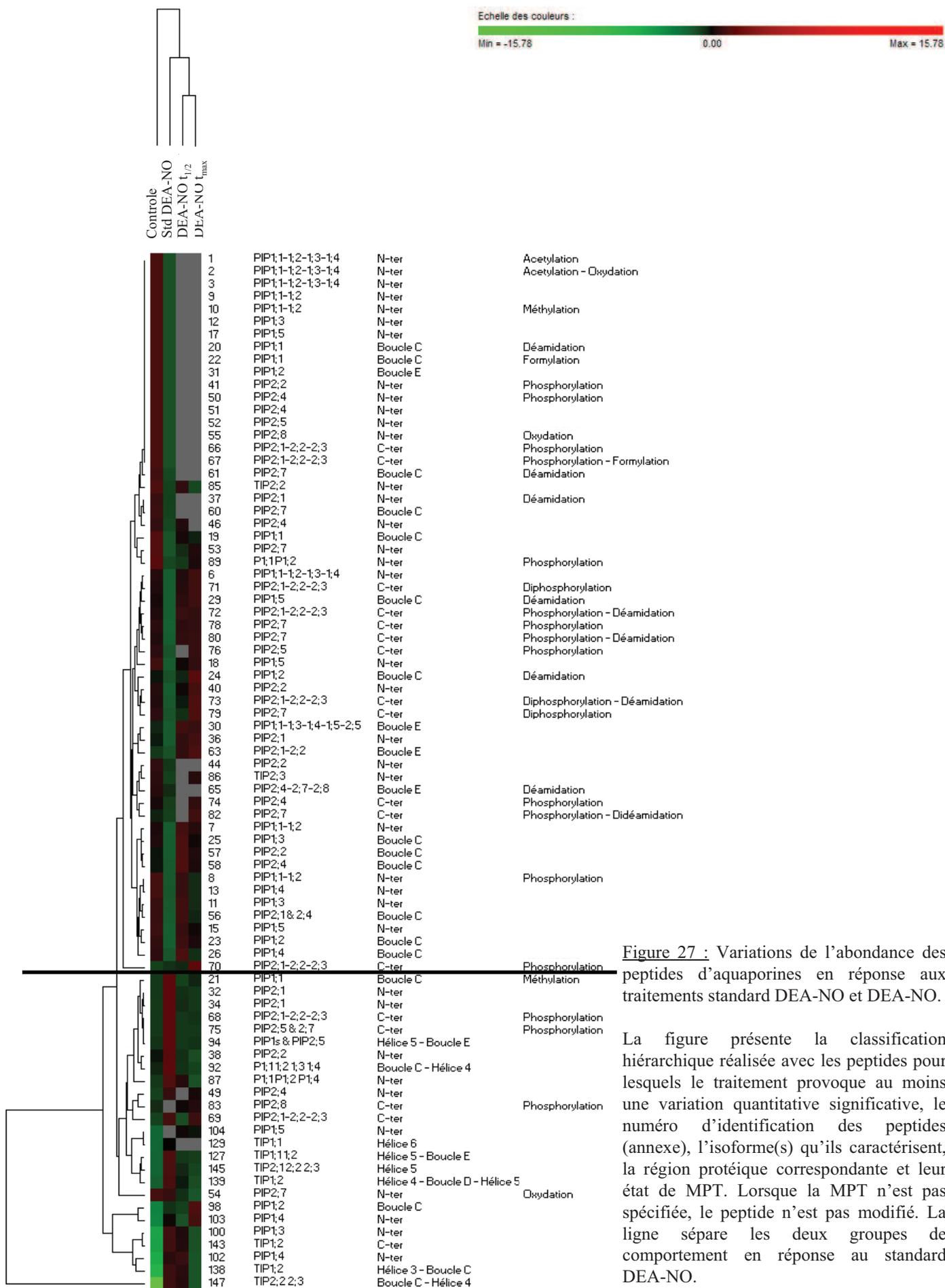


Figure 27 : Variations de l'abondance des peptides d'aquaporines en réponse aux traitements standard DEA-NO et DEA-NO.

La figure présente la classification hiérarchique réalisée avec les peptides pour lesquels le traitement provoque au moins une variation quantitative significative, le numéro d'identification des peptides (annexe), l'isoforme(s) qu'ils caractérisent, la région protéique correspondante et leur état de MPT. Lorsque la MPT n'est pas spécifiée, le peptide n'est pas modifié. La ligne sépare les deux groupes de comportement en réponse au standard DEA-NO.

### **.III.5.c.ii DEA-NO**

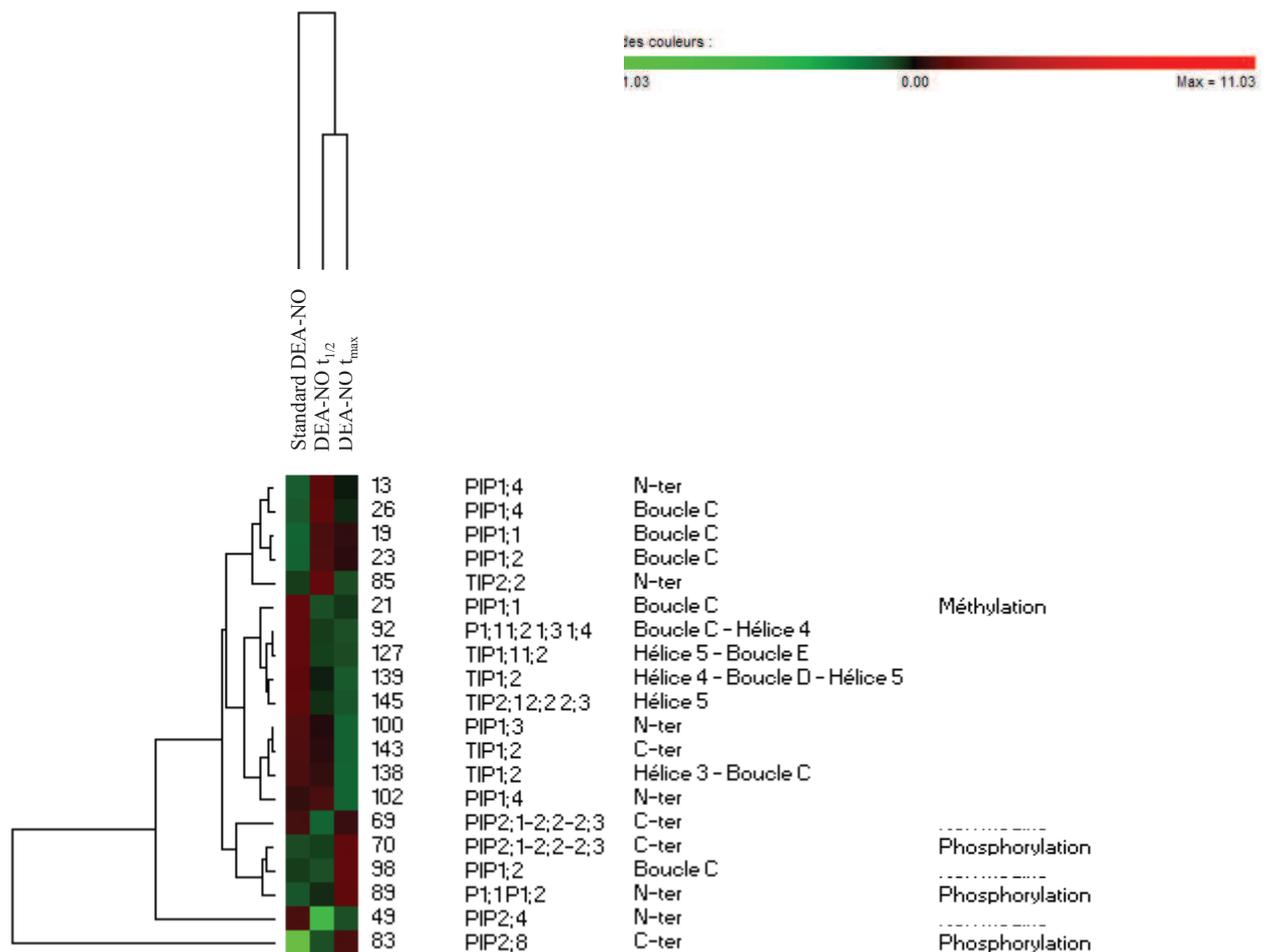
La condition de standard DEA-NO diminue l'abondance des aquaporines PIP1s et PIP2s, et le traitement DEA-NO l'augmente (figure 20B). Selon le contrôle considéré, deux types de présentations sont possibles :

1- Le contrôle est le contrôle général et le standard DEA-NO est considéré comme un traitement (figure 27). Parmi les 126 peptides quantifiés dans le traitement par le DEA-NO, 82 ont une abondance qui varie significativement en réponse à au moins une des conditions. En particulier, la quantité de 60 d'entre eux est régulée uniquement par la condition standard DEA-NO et non pas en réponse au traitement par le DEA-NO lui-même. L'ensemble des 82 peptides se regroupe en deux grandes parties :

- les peptides dont la quantité diminue en réponse au standard DEA-NO (partie supérieure de la classification hiérarchique, figure 27). Concernant les aquaporines PIP1;1 à PIP1;4 et PIP2;1 à PIP2;3, la diminution de 60 % de l'abondance des peptides ne s'explique pas par la seule diminution de l'abondance des aquaporines mesurée par dosage ELISA car les peptides présentent un taux de variation plus fort. Parmi eux se trouve le peptide 2P de l'extrémité C-terminale de PIP2;1/2;2/2;3 (S280 et S283).

- les peptides dont la quantité augmente en réponse au standard DEA-NO (partie inférieure de la classification hiérarchique, figure 27). Dans un contexte où la teneur en aquaporines PIP1s et PIP2s diminue, cette augmentation est particulièrement frappante. Il s'agit de peptides d'aquaporines PIPs non modifiés, méthylés de PIP1;1 (boucle C) ou monophosphorylés de PIP1;1/1;2 (N-ter) et de PIP2;5/2;7 (C-ter) ou PIP2;1/2;2/2;3 (C-ter, S277 et S280). Comme aucune donnée ELISA n'est disponible concernant les aquaporines PIP2;5 et PIP2;7, la régulation du peptide C-terminal de PIP2;5/2;7 pourrait refléter une augmentation de l'abondance des aquaporines correspondantes ou une réelle régulation locale. Par ailleurs, une augmentation de la phosphorylation du résidu S277 et une diminution simultanée de celle des résidus S280 et S283 sont observés (tableau 8). Ces variations quantitatives supportent l'idée d'une interdépendance de l'état de phosphorylation des résidus S277 et S283.

2- Le contrôle est le milieu correspondant au standard DEA-NO. Parmi les 126 peptides quantifiés dans le traitement par le DEA-NO, 22 ont une abondance qui varie significativement en réponse à au moins un des deux temps de traitement (figure 28). Leur abondance diminue ou augmente de façon monotone et précoce, monotone et tardive ou transitoire.



**Figure 28 :** Variation de l'abondance des peptides d'aquaporines en réponse au traitement par le DEA-NO.

La figure présente la classification hiérarchique réalisée avec les peptides pour lesquels le traitement provoque au moins une variation quantitative significative, le numéro d'identification des peptides (annexe), l'isoforme(s) qu'ils caractérisent, la région protéique correspondante et leur état de MPT. Lorsque la MPT n'est pas spécifié, le peptide n'est pas modifié.

La quantité de la majorité des peptides caractérisant les TIPs diminue de façon précoce. Quatre de ces peptides caractérisent TIP1;2, suggérant que la quantité de la protéine diminue effectivement de façon précoce. D'autre part, la quantité du peptide de l'extrémité N-terminale de TIP2;2 est fortement diminuée d'un facteur 3,54 après 18 min de traitement. Il s'agit du peptide dont la quantité diminue le plus fortement en réponse au traitement DEA-NO. Cette diminution suggère soit une dégradation de la protéine, soit une variation de l'état de méthylation de ce peptide, soit une altération de l'extrémité N-terminale (présence d'une autre MPT).

Concernant la phosphorylation, dans un contexte où l'abondance des protéines augmente d'un facteur 1,3, l'augmentation de l'abondance d'un peptide phosphorylé d'un facteur 1,2 à 1,47 suggère que la phosphorylation n'est pas variable.

En résumé, ces résultats montrent une modulation de l'état de phosphorylation des aquaporines en réponse au milieu standard DEA-NO alors qu'aucune réponse de phosphorylation n'est détectée en réponse au traitement par le DEA-NO lui-même. De plus, une variation inverse de la phosphorylation des résidus S277 et S283 est mise en évidence comme dans le cas du traitement NaCl. Enfin, comme dans le cas du traitement NaCl, une forte régulation est observée pour des aquaporines TIPs.

### **.III.5.c.iii Phosphate**

Parmi les 126 peptides quantifiés dans le traitement par le phosphate, 82 ont une abondance qui varie significativement en réponse à au moins une des deux conditions, carence ou réalimentation. La quantité de 77 de ces peptides varie significativement en réponse à la carence et seulement 18 en réponse à la réalimentation. La représentation simultanée par une classification hiérarchique de ces conditions est biaisée par le fait que la majorité des valeurs de réalimentation n'est pas significativement différente du contrôle.

#### **.III.5.c.iii.1 Carence**

Une classification hiérarchique représentant seulement une condition n'ayant pas de sens, les cinq peptides présentant les plus fortes régulations (rapports quantitatifs supérieurs à 16, caractères gras) et leurs formes dérivées sont présentés dans le tableau 9. La quantité de ces cinq peptides augmente fortement en réponse à la carence en phosphate. Ces variations concernent :

Tableau 9 : Peptides dont l'abondance varie fortement en réponse à la carence en phosphate.

Isoforme	Région	Séquence	Modification post-traductionnelle	Carence PO <sub>4</sub> R p-value
<b>PIP2;1</b>	<b>4 - 16</b>	<b>K.DVEAVPGEGFQTR.D</b>		<b>33,33 0,00001</b>
PIP2;1	4 - 16	K.DVEAVPGEGFQTR.D	Déamidation: Q13	6,67 0,21730
<b>PIP2;2</b>	<b>4 - 14</b>	<b>K.DVEGPEGFQTR.D</b>		<b>25,00 0,00007</b>
PIP2;2	4 - 14	K.DVEGPEGFQTR.D	Déamidation: Q11	5,26 0,42680
<b>PIP2;4</b>	<b>154 - 167</b>	<b>R.YGGGANELADGYNK.G</b>		<b>16,67 0,00023</b>
PIP2;4	154 - 167	R.YGGGANELADGYNK.G	Déamidation: N158	0,70 0,00160
<b>PIP2;1-2;2-2;3</b>	<b>277 - 282</b>	<b>K.SLGSFR.S</b>	<b>Phosphorylation: S277</b>	<b>100,00 0,00010</b>
PIP2;1-2;2-2;3	277 - 287	K.SLGSFRSAANV.-	Phosphorylation: S280/S283	0,24 0,00140
PIP2;1-2;2-2;3	277 - 287	K.SLGSFRSAANV.-	Diphosphorylation: S280+S283	0,37 0,00030
PIP2;7	270 - 280	K.ALGSFRSNATN.-	Phosphorylation: S273/S276	0,93 0,2456
PIP2;7	270 - 280	K.ALGSFRSNATN.-	Diphosphorylation: S273 et S276	0,16 0,0055
<b>PIP2;7</b>	<b>270 - 280</b>	<b>K.ALGSFRSNATN.-</b>	<b>Phosphorylation: S273/S276; Déamidation: N277</b>	<b>50,00 0,02000</b>
PIP2;7	270 - 280	K.ALGSFRSNATN.-	Diphosphorylation: S273 et S276; Déamidation N277	0,92 0,2764
PIP2;7	270 - 280	K.ALGSFRSNATN.-	Phosphorylation: S273/S276; Didéamidation N277 et N280	0,69 0,1224

Ce tableau présente les données quantitatives obtenues pour les peptides les plus fortement régulés (caractère gras) ainsi que pour les autres formes de ces peptides. La colonne 1 présente la ou les protéine(s) que le peptide caractérise, la colonne 2 sa région protéique. La colonne 3 présente la séquence du peptide et la colonne 4 son état de MPT. L'indication Sx/Sy signifie l'impossibilité de discriminer entre les deux sites potentiels de phosphorylation x et y. Ce peptide est considéré comme étant modifié sur Sx ou Sy ou sous la forme d'un mélange de ces 2 peptides monophosphorylés. Lorsqu'aucune MPT n'est spécifiée, le peptide n'est pas modifié. Les colonnes 6 et 7 présentent les valeurs des rapports quantitatifs (R) et des p-values associées obtenues en réponse à la carence en phosphate.

- Les peptides non modifiés de l'extrémité N-terminale de PIP2;1 dont la quantité augmente d'un facteur 33 et de PIP2;2 dont la quantité augmente d'un facteur 25. Ces peptides ont aussi été identifiés sous une forme déamidée, mais cette forme n'est pas autant régulée en réponse à la carence. Dans la mesure où l'abondance des aquaporines PIP2;1/2;2/2;3 mesurée par ELISA n'est pas altérée (figure 20), deux hypothèses se présentent : (1) comme le dosage ELISA mesure la somme de la quantité de trois isoformes, il ne peut pas discriminer entre une situation où les trois isoformes ont toutes une quantité stable et une situation où l'augmentation de l'abondance de deux isoformes (PIP2;1 et PIP2;2) serait compensée par la diminution de l'abondance de la troisième isoforme (PIP2;3). Cependant, une approche transcriptomique a montré que PIP2;3 est une isoforme mineure dans la racine [115], ce qui rend cette hypothèse peu plausible. (2) Les résultats suggèrent donc l'existence de régulations locales. L'extrémité N-terminale de ces deux isoformes ayant précédemment été identifiée méthylée [38], il est possible que cette régulation locale concerne au moins partiellement un évènement de déméthylation.

- Le peptide de la boucle C de PIP2;4 dont la quantité augmente d'un facteur 16,6. Le peptide a aussi été identifié comme déamidé, mais cette forme est peu régulée en réponse à la carence (tableau 9). En l'absence de données quantitatives de type ELISA et d'autres données peptidiques pour PIP2;4, la variation de la forme non modifiée peut refléter une augmentation de l'abondance de la protéine elle-même ou l'existence d'une autre MPT fortement régulée.

- Le peptide 1P et déamidé de l'extrémité C-terminale de PIP2;7, dont la quantité augmente d'un facteur 50 (tableau 9). En revanche, la quantité de la forme uniquement 1P de ce peptide n'est pas modifiée (tableau 9). La quantité du peptide 1P et didéamidé ne varie pas. D'autre part, la quantité de la forme 2P de ce peptide diminue d'un facteur 6,4 et celle de la forme 2P et déamidée ne varie pas. La déamidation semble donc associée à une régulation particulière de la quantité des peptides 1P ou 2P.

On observe que, indépendamment de la déamidation, la phosphorylation du résidu S277 de l'extrémité C-terminale de PIP2;1/2;2/2;3 (<sup>277</sup>SLGSFR<sup>282</sup>) augmente d'un facteur 100 et correspond au plus fort taux de variation des résultats obtenus sur l'ensemble des trois types de traitements. Parallèlement, la quantité du peptide <sup>277</sup>SLGSFRSAANV<sup>287</sup> 1P sur S280 diminue d'un facteur 4,2 et celle du peptide 2P diminue d'un facteur 2,7 (tableau 8). Sachant que l'abondance des aquaporines PIP2;1/2;2/2;3 n'est pas altérée (figure 20), ces résultats indiquent sûrement des variations significatives de la phosphorylation de ces protéines. On note en particulier des variations inverses de l'abondance de la forme 1P du résidu S277 et de la forme 2P (S280 et S283), comme dans le cas de la réponse aux traitements NaCl et



standard DEA-NO. Cependant, contrairement à ces deux dernières conditions où la phosphorylation de S280 ne semble pas variable, le taux de cette phosphorylation diminue dans le cas de la carence. Ainsi, une relation inverse entre la phosphorylation des résidus S277 et S283 est à nouveau constatée. Une hypothèse est que la modification du résidu S277 perturberait la phosphorylation du résidu S280 adjacent. Ceci suggère que la phosphorylation du résidu S277 contrôlerait la phosphorylation des résidus S280 et S283.

### **.III.5.c.iii.2 Réalimentation**

Le comportement des 18 peptides régulés en réponse à la réalimentation est représenté par la classification hiérarchique en figure 29. Elle se divise en deux parties principales. La première regroupe les peptides dont la quantité augmente (partie supérieure de la classification hiérarchique, figure 29) alors que la deuxième partie regroupe les peptides dont la quantité diminue dans des proportions similaires à celle des aquaporines PIP1s et PIP2s mesurées par ELISA (partie inférieure de la classification hiérarchique, figure 29). Ces variations ne sont donc pas prises en compte. La première partie regroupe deux peptides phosphorylés de l'extrémité N-terminale de PIP1;1/1;2 et de PIP2;4. L'abondance des aquaporines PIP1s étant diminuée en réponse à la réalimentation, l'augmentation de la phosphorylation mesurée sur l'extrémité N-terminale de PIP1;1/1;2 suggère une augmentation d'autant plus forte de la phosphorylation en réponse à la réalimentation. En revanche, les dosages ELISA menés ne prenant pas en compte PIP2;4, il n'est pas possible de conclure quant à la régulation de la phosphorylation de son extrémité N-terminale.

En résumé, l'état de phosphorylation des aquaporines PIPs est modulé en réponse à la teneur en phosphate du milieu de culture. En réponse à la carence, la phosphorylation de l'extrémité C-terminale des aquaporines PIP2;1/2;2/2;3 et PIP2;7 est régulée alors que la réalimentation agit davantage sur la phosphorylation de l'extrémité N-terminale de PIP1;1/1;2 et PIP2;4. De plus, la carence induit de fortes variations d'abondance de peptides, reflétant des MPTs plutôt que des dégradations. En plus de la phosphorylation, la déamidation pourrait constituer un mode de régulation dans le cas de la carence.

En conclusion, cette étude a mis en évidence différentes régulations de l'abondance des aquaporines PIP1s et PIP2s en fonction des traitements appliqués, ainsi qu'un contexte de dégradation rapide (standard DEA-NO) et de resynthèse rapide de ces protéines (DEA-NO). D'autre part, elle a mis en évidence des régulations de la déamidation et de la phosphorylation



des aquaporines et une apparente interdépendance de phosphorylation entre les résidus S277 et S283 de l'extrémité C-terminale de PIP2;1/2;2/2;3. Enfin, une forte régulation de l'extrémité N-terminale d'aquaporines TIPs a été observée.

## **.IV DISCUSSION**

### **.IV.1 Choix méthodologiques**

#### **.IV.1.a Préparation des échantillons**

Cette étude vise à quantifier la variation de l'abondance de l'ensemble des aquaporines racinaires ainsi que de leur statut de phosphorylation en réponse à un panel de contraintes représentatives de stress environnementaux. Un volet parallèle de cette étude, non abordé dans le cadre de cette thèse, était de quantifier les variations de l'ensemble des protéines microsomales et de leur statut de phosphorylation en réponse à ces mêmes contraintes. Nous avons donc choisi de purifier des protéines microsomales et d'enrichir l'extrait en protéines hydrophobes pour répondre à ces deux objectifs. En utilisant deux types de double digestion, en fractionnant les peptides et en purifiant les phosphopeptides, nous avons cherché à diminuer la complexité de l'échantillon et ainsi accéder aux peptides d'aquaporines. Malgré le fait que toutes les isoformes d'aquaporines prédites comme racinaires (eFP Browser) aient été identifiées (excepté SIP1;1), une limitation concerne la faible couverture par MS de la séquence des aquaporines. Or, ceci peut représenter une limite dans l'étude des MPTs qui peuvent potentiellement être réparties sur l'ensemble des domaines extramembranaires. Leur identification nécessite donc une description la plus exhaustive possible de ces domaines. Une façon d'améliorer leur couverture de séquence par MS serait d'augmenter le facteur d'enrichissement en aquaporines en utilisant par exemple des techniques d'immunoprécipitation et des anticorps spécifiques de ces protéines.

#### **.IV.2 Approches de quantification**

La méthode de quantification sans marquage offre des avantages par rapport aux autres méthodes de quantification : elle nécessite une préparation peu complexe des échantillons, permet une forte couverture du protéome, permet de comparer un grand nombre d'échantillons et est moins coûteuse du fait de l'absence de marquage [222]. De plus, ce type d'approche offre une large gamme dynamique, intéressante dans le cadre de l'étude des aquaporines dont la quantité peut varier d'au moins un facteur 300 entre différentes isoformes



exprimées dans le même tissu [126]. Cependant, la technique utilisée dans le cadre de cette thèse présente les limitations suivantes :

1) Un nombre restreint de peptides quantifiés. Pour qu'un peptide soit séquencé et donc identifié, sa quantité doit varier en réponse à au moins une des contraintes appliquées. Pour que le rapport quantitatif soit disponible, il doit avoir été calculé à partir d'au moins deux réplicats biologiques. De plus, le traitement des informations issues des spectres et l'appariement des profils MS et MS/MS peuvent créer des limitations lors de l'analyse bio-informatique des données. Les peptides quantifiés ne sont donc pas systématiquement identifiés. Ainsi, un paradoxe est que la meilleure couverture de séquence est obtenue pour les aquaporines TIPs alors que peu de données quantitatives sont disponibles. Au final, 51 % des peptides d'aquaporines présentent des données quantitatives parmi au moins une des conditions testées mais seulement 17 % d'entre eux pour l'ensemble des conditions.

2) Une grande variabilité des valeurs de quantification. La forte variabilité existant entre les valeurs des rapports quantitatifs obtenus peut être liée aux variations d'intensité de signal entre les analyses MS, qui peuvent avoir de multiples origines telles que la séquence peptidique, le bruit de fond ou des paramètres expérimentaux qui ne peuvent pas être précisément contrôlés, comme par exemple l'efficacité d'ionisation [180]. Dans le but de prendre en compte ces contraintes, les données sont normalisées en présumant que la quantité de la majorité des peptides ne varie pas. Cependant, cette normalisation permet de corriger des modifications globales de signaux mais pas au niveau d'un peptide unique [180].

3) L'absence de détection de certaines formes de peptides. Une MPT n'affecte qu'un pourcentage du pool cellulaire d'une protéine et les formes non-modifiées et modifiées coexistent dans la cellule. Or dans cette étude, dans de nombreux cas, seule la forme modifiée est identifiée. Ce n'est que récemment qu'il a été proposé que l'étude de la variation de l'état de phosphorylation d'un peptide devrait intégrer les variations d'abondance du peptide non modifié correspondant. Ainsi, lorsque les variations d'abondance des peptides non modifiés et phosphorylés ne sont pas proportionnelles, Wu *et al.* (2009) interprètent ce comportement comme un signe que le peptide phosphorylé est minoritaire et que donc la variation de son abondance n'affecte pas l'abondance de la protéine totale [223]. D'autre part, dans le cas de l'étude d'aquaporines par Niittylä *et al.* (2007), lorsqu'un peptide non modifié n'est pas identifié, une stratégie a été d'estimer sa quantité en considérant la moyenne de la quantité des autres peptides non modifiés de cette protéine [51]. L'absence d'identification de la forme non-modifiée peut s'expliquer par sa faible teneur par rapport aux formes modifiées. Par exemple, dans le cas des isoformes d'aquaporines PIP<sub>2</sub>;1/2;2/2;3, les formes 1P et 2P



représentent environ 75 % du pool de ces protéines (V. Santoni, données non publiées). Donc là encore, une stratégie de purification plus poussée des aquaporines permettrait peut-être de détecter cette forme mineure non modifiée.

4) Les difficultés de quantification des protéines par MS. La variation de l'abondance d'un seul peptide non modifié et protéotypique ne permet pas de conclure sur l'abondance de la totalité de la protéine car la présence d'une MPT sur ce peptide peut être la cause de cette variation. La quantification d'une protéine nécessite de disposer d'informations quantitatives sur plusieurs peptides protéotypiques non modifiables, ce qui est rarement le cas pour les aquaporines. Pour partiellement répondre à ce problème, des dosages ELISA ont été réalisés pour quantifier la variation de l'abondance des aquaporines en réponse aux traitements. Cependant, d'une part les anticorps utilisés ne sont pas spécifiques d'une isoforme (PIP2;1 à PIP2;3 et PIP1;1 à PIP1;4) et d'autre part, des variations opposées d'abondance entre ces trois isoformes peuvent rendre délicate l'interprétation des résultats d'ELISA. Idéalement, il faudrait disposer d'anticorps spécifiques de chaque isoforme. D'autre part, concernant la réalimentation en phosphate de plantes carencées en cet ion, dans un contexte où l'abondance des aquaporines diminue (figure 20D), l'analyse a été focalisée sur les peptides dont l'abondance augmente, reflétant donc une forte augmentation de leur quantité. Mais il sera aussi intéressant dans un deuxième temps d'analyser les peptides dont l'abondance est mesurée par MS comme inchangée, reflétant en réalité une possible augmentation de leur abondance.

## **.V UN NOUVEAU CONTEXTE DE DEGRADATION DES AQUAPORINES ?**

Le milieu correspondant au standard DEA-NO provoque après 18 min une diminution de l'abondance des aquaporines PIP2;1 à PIP2;3 et PIP1;1 à PIP1;4, de respectivement 50 % et 40 %. Ces dosages ayant été réalisés à partir d'extraits de protéines microsomaales et non de membrane plasmique, il s'agit d'une dégradation de ces protéines plutôt que d'une éventuelle relocalisation de la membrane plasmique vers une autre membrane. Ces résultats ELISA sont soutenus par une apparente diminution générale d'abondance des peptides d'aquaporines mesurée en MS. La différence entre ce milieu et le milieu du contrôle général est l'absence des 50  $\mu$ M de Fe-EDTA. Une hypothèse est que, malgré le fait qu'il reste probablement du fer dans les parois cellulaires et que de fait il est peu probable que les plantes soient en situation de carence en fer, l'absence de fer dans le milieu aurait induit un processus de dégradation rapide. A ce jour, aucune étude n'a montré de relation entre le fer et l'abondance des aquaporines végétales. Cependant, il faut noter qu'une étude menée sur *Arabidopsis* a montré



que l'aquaporine PIP2;1 peut être dégradée *via* le protéasome 26S [70]. Or, en réponse à une carence en fer de 6 jours, la liaison entre UBC13, une enzyme E2 de conjugaison d'ubiquitine, et une enzyme E3 ubiquitin-ligase stimule l'ubiquitination de substrats [224], probablement *via* le résidu lysine 63 de l'ubiquitine qui peut conduire à un adressage au protéasome 26S [225] et donc à une dégradation du substrat. Toutefois, ce mécanisme intervient après 6 jours de carence en fer et la dégradation des aquaporines mesurée dans notre étude est observée dès 18 min après le transfert dans un milieu dépourvu de fer. Ce mécanisme apparent de dégradation des aquaporines PIPs est donc très rapide et constitue une nouveauté car davantage d'arguments sont disponibles sur la stabilité des aquaporines PIPs et TIPs que sur leur dégradation. Par exemple, des approches de *pulse chase* ont montré que la demi-vie de l'aquaporine TIP3 de graines d'haricot est d'au moins 19,5 h [226]. D'autre part, un traitement pendant 1,5 à 16 h par la cycloheximide de plantes d'*Arabidopsis* exprimant la protéine PIP2;1-GFP ne modifie pas l'intensité du signal observé à la membrane plasmique, suggérant une stabilité de la protéine à cette membrane [67]. Enfin, concernant les aquaporines animales, l'utilisation de la cycloheximide a permis de calculer le temps de demi-vie d'AQP2, qui est de 2,9 h [227]. Cette demi-vie dépend de l'état de phosphorylation de l'extrémité C-terminale de la protéine : l'augmentation du taux de phosphorylation de cette zone augmente d'environ 2 h le temps de demi-vie [227]. Pour vérifier la corrélation entre dégradation des aquaporines et l'absence de fer dans le milieu de culture, il faudrait quantifier ces protéines suite à l'application de carence en fer d'intensités différentes et pendant des périodes différentes et plus longues que 18 min, conduisant à un réel état de carence en fer. Par ailleurs, il faudrait mener une approche de protéomique dédiée à l'identification de protéines ubiquitinées, ce qui devrait permettre d'évaluer l'ubiquitination des aquaporines. Enfin, l'utilisation de MG132, inhibiteur du protéasome, lors de dosages ELISA devrait permettre d'étudier l'hypothèse de dégradation des aquaporines *via* le protéasome.

Quoi qu'il en soit, notre étude a peut-être mis en évidence un contexte de dégradation rapide des aquaporines, inconnu jusqu'alors. Cependant, une paradoxe réside dans le fait qu'en réponse à 18 min de traitement par le DEA-NO lui-même, l'abondance des aquaporines augmente, jusqu'à atteindre l'abondance mesurée en conditions de contrôle général pour les PIP1s. Nous sommes donc dans un contexte de dégradation rapide suivie d'une re-synthèse rapide des aquaporines, ce qui constitue une observation difficilement interprétable.



## **.VI LES AQUAPORINES : DES PROTEINES TRES MODIFIEES**

Au cours de cette étude, nous avons identifié différents types de MPT sur les aquaporines (tableaux 5 et 6): acétylation, oxydation, formylation, méthylation, déamidation et phosphorylation. Alors que l'acétylation, qui concerne la méthionine initiatrice des PIP1s, est d'ordre co-traductionnel, les autres modifications sont d'ordre post-traductionnel. A part l'oxydation qui pourrait être de nature artéfactuelle, les autres modifications sont de nature biologique.

### **.VI.1 La formylation**

L'utilisation de fortes concentrations en acide formique peut induire la formylation artéfactuelle d'acides aminés [228, 229]. Cependant, dans ce travail, l'acide formique n'a été utilisé qu'à de rares étapes du protocole de préparation des peptides et à une faible concentration (0,1 %). La formylation des PIPs n'est donc probablement pas d'origine artéfactuelle. La formylation des lysines est une MPT récemment identifiée chez les histones et d'autres protéines nucléaires [230]. Cette modification pourrait interférer avec d'autres mécanismes épigénétiques tels que la méthylation, l'acétylation ou encore la phosphorylation, gouvernant l'état transcriptionnel de la chromatine [230]. Aucune donnée n'est disponible sur son rôle dans le cas où elle affecterait des protéines extra-nucléaires.

### **.VI.2 La méthylation**

L'aquaporine PIP2;1 a été décrite comme pouvant être méthylée sur les résidus K3 et E6 de l'extrémité N-terminale [38]. Ces sites n'ont pas été identifiés au cours de ce travail de thèse; par contre, 13 à 15 nouveaux sites ont été décrits sur les PIPs et TIPs (tableaux 5 et 6). Des données de quantification sont disponibles pour seulement quatre des peptides méthylés de PIPs : leur abondance ne varie pas en réponse au traitement NaCl ni en réponse à la réalimentation en phosphate, la quantité de 2 d'entre eux varie en réponse au standard NO (augmentation et diminution), la quantité de 2 d'entre eux augmente en réponse à la carence en phosphate et la quantité de l'un d'entre eux diminue en réponse à cette carence (annexe). Par contre, aucune donnée de quantification n'est disponible concernant les isoformes TIPs. Il a été montré que la méthylation des résidus K3 et E6 d'*AtPIP2;1* n'interfère pas avec l'activité de transport d'eau de la protéine [38] mais pourrait interférer avec la fonction d'export de la protéine hors du réticulum endoplasmique en affectant le motif di-acide (DVE) fonctionnel dans le cas de PIP2;1 [67]. Cependant à ce jour, ce rôle de la méthylation n'est qu'hypothétique.



### **.VI.3 La déamidation**

Cette étude a mis en évidence la déamidation des aquaporines PIPs et TIPs. Il s'agit d'une modification non enzymatique qui intervient sur les amines des résidus asparagine et glutamine conduisant à la formation respective de résidus acide aspartique et acide glutamique. La déamidation est impliquée dans la dissociation de sous-unités protéiques et dans la dégradation de protéines [231, 232]. Cette modification est souvent décrite comme servant d'horloge moléculaire [232, 233]. Ainsi, deux études menées sur l'aquaporine AQP0 du cristallin de l'œil humain ont montré une implication de la phosphorylation et de la déamidation dans la dégradation de cette aquaporine en fonction de l'âge des individus [234, 235].

Dans le cadre de notre étude, la quantité de trois peptides déamidés (extrémités N-terminales de PIP2;1 et PIP2;2 et boucle C de PIP1;1) est augmentée de façon transitoire en réponse au traitement NaCl (figure 26). Sachant qu'aucune dégradation de la somme des aquaporines PIP2;1/2;2/2;3 n'a été mise en évidence en condition de traitement NaCl (figure 20A), la déamidation des extrémités N-terminale de PIP2;1, de PIP2;2 ne semble pas impliquée dans la dégradation de ces protéines et son rôle reste à élucider. Dans ce contexte, l'étude de mutants de PIPs dont le site d'intérêt de déamidation a été changé en alanine (mimant une absence de déamidation) ou en acide aspartique (mimant une déamidation constitutive) [236] devrait permettre d'étudier l'impact de la déamidation du résidu considéré sur la  $L_p$  et sur la régulation des aquaporines.

En réponse à une carence en phosphate, l'apparition d'une forme déamidée des peptides phosphorylés de PIP2;7 mène à une augmentation nette de l'abondance des formes phosphorylées de cette aquaporine (tableau 9). Bien qu'aucune donnée n'existe sur un potentiel dialogue entre la déamidation et la phosphorylation, ces résultats suggèrent que la déamidation pourrait créer un contexte favorable pour l'activité d'une protéine kinase, augmentant ainsi l'abondance des peptides phosphorylés.

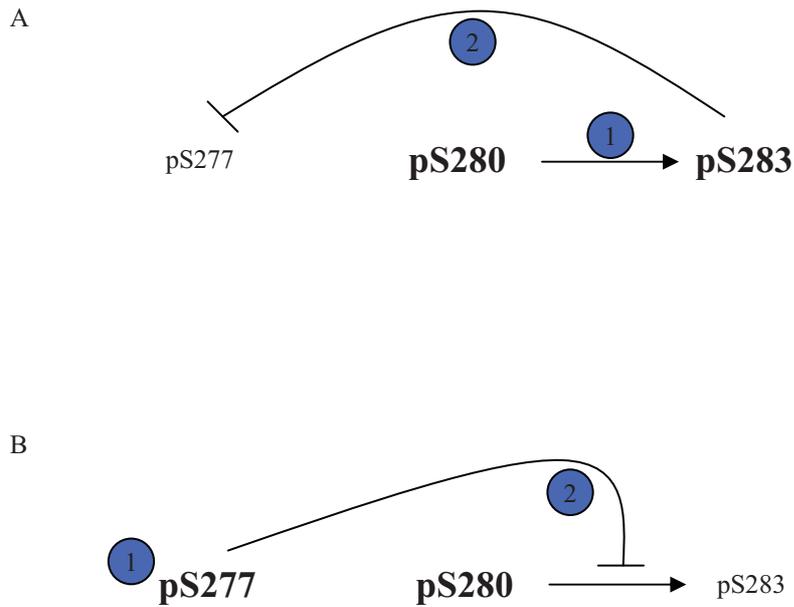
### **.VI.4 La phosphorylation**

Cette étude a mis en évidence sept nouveaux sites de phosphorylation des aquaporines PIPs et NIPs (tableau 7). La position d'un de ces sites reste ambiguë. Elle devra donc être déterminée par des approches de MS avec une fragmentation des peptides de type ETD, qui permet de préserver l'état de phosphorylation de tous les résidus (pour revue [221]). Le rôle de la phosphorylation dans le gating des aquaporines pourra être étudié par expression hétérologue en ovocytes de xénope de protéines mutées sur le site de phosphorylation d'intérêt pour

Tableau 10 : Résumé des effets des traitements NaCl, DEA-NO et phosphate sur l'abondance des aquaporines PIPs et leur état de phosphorylation.

	$L_{pr}$	Abondance PIP1s et PIP2s	Extrémité C-terminale de PIP2;1/2;2/2;3		
			1P (S277)	1P (pS280)	2P (S280&S283)
NaCl	↓	∅	↗ ou ↘	↘	↗
Standard DEA-NO	∅	↓	↑	↑	↓
DEA-NO	↓	↑	∅	∅	∅
Carence phosphate	↓	∅	↑	↓	↓
Réalimentation phosphate	↑	↓	∅	∅	∅

Le tableau présente l'effet des traitements listés dans la colonne 1 sur la  $L_{pr}$  (colonne 2), sur l'abondance des aquaporines PIP1s et PIP2s mesurée par ELISA (colonne 3) ainsi que sur l'abondance du peptide 1P sur S277 (colonne 4), 1P sur S280 (colonne 5) et 2P sur S280 et S283 (colonne 6) de l'extrémité C-terminale de PIP2;1/2;2/2;3, mesurée par MS. Le symbole ∅ signifie qu'aucune différence significative n'a été mesurée. Concernant la forme 1P sur le résidu S277 en condition de traitement NaCl, deux types de variations sont envisageables car une forte variabilité biologique est observée après 2 h de traitement NaCl, rendant délicate l'interprétation des données quantitatives obtenues.



**Figure 30 :** Modèles d'interaction entre la phosphorylation des résidus de l'extrémité C-terminale de PIP2;1/2;2/2;3.

(A) La phosphorylation du résidu S280 favorise la phosphorylation du résidu S283 (1), qui ensuite empêche la phosphorylation du résidu S277 (2)

(B) La phosphorylation du résidu S277 (1) empêche la phosphorylation du résidu S283 (2), quelque soit l'état de phosphorylation du résidu S280. Dans ce cas, la phosphorylation du résidu S280 est nécessaire mais pas suffisante pour assurer la phosphorylation du résidu S283.



mimer une absence de phosphorylation (mutation en A) ou une phosphorylation constitutive (mutation en D) du résidu, associée à un test de gonflement osmotique. L'implication de la phosphorylation dans la localisation sub-cellulaire des aquaporines pourra, quant à elle, être évaluée par l'observation au microscope confocal de protéines mutées sur le site de phosphorylation d'intérêt en A ou en D, et fusionnées à la GFP [54].

## **.VII INTERACTION ENTRE LES TROIS SITES DE PHOSPHORYLATION DE L'EXTREMITÉ C-TERMINALE DE PIP<sub>2</sub>;1/2;2/2;3**

Une étude menée au laboratoire a montré une interdépendance entre la phosphorylation des résidus S280 et S283 de PIP<sub>2</sub>;1/2;2/2;3 : la phosphorylation du résidu S283 n'est détectée sur si le résidu S280 est phosphorylé [54]. De même, une relation de dépendance entre des résidus phosphorylés adjacents a été montrée sur l'extrémité C-terminale de l'aquaporine AQP2 du rein, dont la phosphorylation joue un rôle clé en réponse à une hormone, la vasopressine : une variation quantitative opposée de la phosphorylation des résidus adjacents S256 et S261 a été montrée en réponse à la vasopressine [237] et la phosphorylation du résidu S269 dépend de celle du résidu S256 [238].

Ces travaux de thèse ajoutent une précision au lien déjà identifié entre les résidus S280 et S283 : la variation du taux de phosphorylation des résidus S277 et S283 semble opposée (cas des trois traitements induisant au moins transitoirement une variation de l'abondance de ces peptides : NaCl, standard DEA-NO et carence en phosphate, tableau 10). Ces résultats suggèrent une interdépendance de la phosphorylation des résidus S277 et S283 et suggèrent deux types de scénarios (figure 30):

- Soit la phosphorylation du résidu S280 favorise la phosphorylation du résidu S283, qui elle-même inhibe la phosphorylation du résidu S277 (figure 30A).

- Soit la phosphorylation du résidu S277 empêche la phosphorylation du résidu S283, quelque soit l'état de phosphorylation du résidu S280 (figure 30B). Dans ce cas, la phosphorylation du résidu S280 est nécessaire mais pas suffisante pour assurer la phosphorylation du résidu S283.

Finalement, en l'absence de données concernant un peptide triphosphorylé, une hypothèse est que l'extrémité C-terminale de PIP<sub>2</sub>;1/2;2/2;3 existe sous quatre formes : la forme non modifiée, la forme 1P sur le résidu S277, la forme 1P sur le résidu S280 et la forme 2P sur les résidus S280 et S283. Des études de quantification absolue par MRM devraient permettre de quantifier l'abondance de chacune de ces formes et donc d'évaluer leurs proportions les unes par rapport aux autres et enfin vérifier le modèle d'interdépendance.



D'autre part, l'étude de la phosphorylation de mutants mimant l'absence de phosphorylation (S277A) ou la présence d'une phosphorylation constitutive (S277D) devrait permettre d'étudier le rôle de la phosphorylation du résidu S277 et son impact sur la phosphorylation de S280 et S283. Ces études seront cruciales pour établir, au delà des corrélations observées *in vivo*, des relations de dépendance entre ces différents évènements de phosphorylation. D'un point de vue fonctionnel, des données sont disponibles quant au rôle de la phosphorylation des résidus S280 et S283. Le résidu S280 est homologue au résidu S274 de *SoPIP2;1*, dont la phosphorylation augmenterait le degré d'ouverture de l'aquaporine *SoPIP2;1* [22]. La phosphorylation du résidu S283 est plutôt impliquée dans l'adressage de *AtPIP2;1* à la membrane plasmique [54]. Il s'agit donc maintenant de déterminer le rôle de la phosphorylation du résidu S277 dans le gating, l'adressage à la membrane plasmique ou la dégradation de l'aquaporine. *In fine*, la connaissance du rôle des différentes phosphorylations combinées à leur quantification par MS devraient permettre d'accéder à certains mécanismes moléculaires en jeu dans la réponse aux contraintes environnementales étudiées.



## **TIP2;3**



Le chapitre précédent montre que diverses contraintes induisent des variations d'abondance de peptides d'aquaporines en rapport avec leur état de modification, principalement leur état de phosphorylation et de déamidation. De façon surprenante, de fortes réponses des peptides N-terminaux de TIP2;2 et TIP2;3 à ces traitements ont été mises en évidence : un traitement par 125  $\mu$ M de DEA-NO pendant 18 min diminue la quantité du peptide de l'extrémité N-terminale de TIP2;2 d'un facteur 3,5 (annexe). D'autre part, un traitement par 100 mM de NaCl pendant 45 min diminue la quantité du peptide de l'extrémité N-terminale de TIP2;3 d'un facteur 2,6 et d'un facteur 6,4 après 2 h de ce même traitement (annexe). Ces taux de variation sont parmi les plus forts de ceux observés. Ils nous ont incités à considérer ces deux protéines pour une étude approfondie de leur rôle dans la modulation de la  $L_p_r$  en réponse aux traitements DEA-NO et NaCl.

L'impact des aquaporines TIPs dans la modulation du transport d'eau racinaire a été peu étudié et aucun phénotype hydraulique, tant au niveau des racines que des feuilles, n'a été détecté chez des plantes d'*Arabidopsis* mutées pour les gènes *TIP1;1* et *TIP1;2* [239]. Par contre, un rôle des aquaporines du tonoplaste a été proposé dans l'osmorégulation cellulaire. La résistance hydrique du tonoplaste détermine les gradients de potentiel hydrique de part et d'autre de cette membrane et surtout leur cinétique d'ajustement. Il a été montré qu'un fort niveau d'activité des aquaporines TIPs sur le tonoplaste, et donc une perméabilité hydrique élevée, permettent d'optimiser les ajustements de volumes de la vacuole et du cytoplasme en réponse à un déséquilibre osmotique [240].

Après un inventaire des ressources disponibles dans la communauté, nous avons obtenu trois lignées invalidées pour *TIP2;3* (source : Dr Nicolaus von Wiren) et une lignée exprimant la protéine YFP fusionnée à l'extrémité C-terminale de TIP2;3, sous le contrôle du promoteur natif de *TIP2;3* (source : Dr Lorenzo Frigerio). C'est pour cela que, pour la suite de ce travail, et par rapport à TIP2;2, nous avons favorisé l'étude du rôle de TIP2;3 dans l'hydraulique racinaire.

## **.I QUE SAVONS-NOUS DE TIP2;3 ?**

### **.I.1 La vacuole et les aquaporines TIPs**

Dans la majorité des cellules végétales, le compartiment vacuolaire occupe environ 90 % du volume cellulaire [241]. La vacuole permet un stockage spécifique de certains ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ) et de certains métabolites et elle joue un rôle important dans la régulation du pH cytoplasmique et la signalisation cellulaire. On distingue deux types morphologiques de



vacuoles : les vacuoles de stockage de protéines (PSV) ou d'ions et les vacuoles lytiques (LV) qui ont un rôle dans la dégradation des protéines (voir pour revue [242]). Les aquaporines exprimées au tonoplaste sont appelées TIPs et on trouve 10 isoformes de TIP chez *Arabidopsis* (figure 4). Selon une étude menée par l'équipe, les gènes de *TIP1;1*, *TIP1;2*, *TIP2;2* et *TIP2;3* et dans une moindre mesure de *TIP2;1* sont, parmi les gènes *TIPs*, ceux qui sont exprimés le plus fortement dans la racine [115]. Les études de Gattolin *et al.* (2009) ont montré que les aquaporines *TIP1;1*, *TIP1;2*, *TIP2;1*, *TIP2;2*, *TIP2;3* et *TIP4;1* ont des profils d'expression tissulaires et des localisations sub-cellulaires spécifiques [243]. Ainsi, *TIP1;1* est largement exprimée dans tous les types cellulaires sauf les cellules méristématiques [244]. *TIP1;1* est localisée au tonoplaste de façon non homogène et de manière plus intense au niveau d'invaginations de la vacuole centrale, appelées *bulbs* [127, 243, 244]. *TIP1;2* est principalement exprimée dans les jeunes cellules de la coiffe et est localisée au niveau du réticulum endoplasmique, ainsi qu'au tonoplaste des cellules latérales de la coiffe [243]. *TIP2;1* est spécifiquement exprimée dans les cellules de la base des racines latérales, à proximité du xylème au niveau du péricycle [243]. *TIP4;1* est exprimée au niveau des cellules épidermiques et corticales, mais n'est jamais observée dans les cellules de la coiffe [243]. Enfin, *TIP2;2* et *TIP2;3* ont des profils d'expression chevauchants. Leurs expressions colocalisent au niveau des cellules du péricycle, plus particulièrement celles qui forment les pôles xylémiens. Par contre, elles ne sont jamais observées dans les cellules de la coiffe. *TIP2;2* et *TIP2;3* peuvent parfois être exprimées au niveau des cellules de l'endoderme, tout le long de la racine. Elles sont localisées au tonoplaste et au niveau de *bulbs* [243]. En résumé, l'expression des aquaporines TIPs est fortement contrôlée par l'état de développement de la plante et est associée au profil de différenciation des divers types de vacuoles (pour revue [242]).

### **.I.2 Régulation des aquaporines TIPs**

Différents modes de régulation des aquaporines TIPs ont été décrits, tant au niveau de l'expression des gènes que de l'abondance des protéines ou de leur état de MPT. Par exemple, une étude menée par l'équipe sur la racine d'*Arabidopsis* a montré qu'un traitement de 4 h par 100 mM de NaCl induit une diminution de l'abondance des transcrits d'aquaporines TIPs et qu'un traitement de 24 h par 100 mM de NaCl induit une diminution de l'abondance des protéines TIPs [115]. D'autre part, cette étude a montré qu'un traitement de 45 min par 100 mM de NaCl induit une relocalisation sub-cellulaire de *TIP1;1*-GFP au niveau de *bulbs* [115]. Des études de radiomarquage *in vivo* et *in vitro* à partir de graines d'haricots

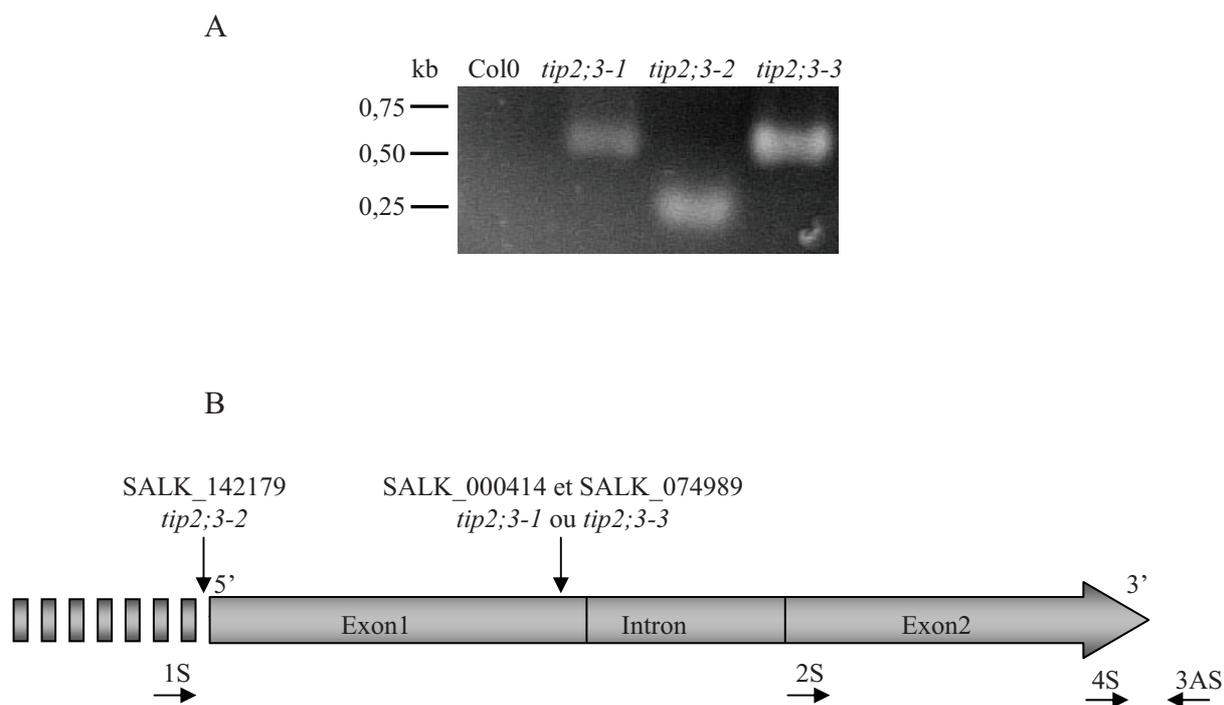


(*Phaseolus vulgaris*) ou de lentilles (*Lens culinaris* Med.) ont montré que les aquaporines TIPs peuvent être phosphorylées [35, 245]. Une autre étude a montré, par une approche couplée de mutagenèse dirigée et de pharmacologie en ovocytes de xénope, le rôle de la phosphorylation des résidus S7, S23 et S99 dans l'activité de l'aquaporine TIP3;1 [246]. Enfin, une autre étude menée sur *Mesembryanthemum crystallinum* a montré qu'un traitement par 200 mM de mannitol induit une relocalisation de l'aquaporine *McTIP1;2* vers des endosomes et que ce processus dépend de la glycosylation de la protéine [68].

### .I.3 TIP2;3

L'aquaporine TIP2;3 fait partie de la sous-famille des 10 TIPs d'Arabidopsis. Son expression est exclusivement racinaire (eFP Browser). Comme décrit précédemment, la protéine TIP2;3-YFP sous le contrôle du promoteur de *TIP2;3* natif est exprimée dans les zones matures de la racine, principalement au niveau des cellules du péricycle mais aussi au niveau du cortex et de l'épiderme. Un territoire d'expression similaire est observé au niveau des racines latérales. TIP2;3-YFP est exprimée au tonoplaste et au niveau de *bulbs* [243]. Des tests de croissance de levures sur milieu contenant des concentrations toxiques de méthylammonium ont montré que TIP2;3 a une activité de transport de l'ammonium [247, 248]. Ainsi, TIP2;3 contribuerait à la compartimentation de l'ammonium dans la vacuole. L'abondance des transcrits de TIP2;3 est régulée au cours de la journée avec un pic d'expression à 14 h [247]. L'expression de TIP2;3 est également inhibée par la carence en azote et stimulée par un apport azoté [247]. Des études transcriptomiques ont aussi montré que les traitements par 100 à 150 mM de NaCl pendant 1 ou 2 h [115, 249, 250] et par 300 mM de mannitol pendant 1 h [249] stimulent l'expression de *TIP2;3*.

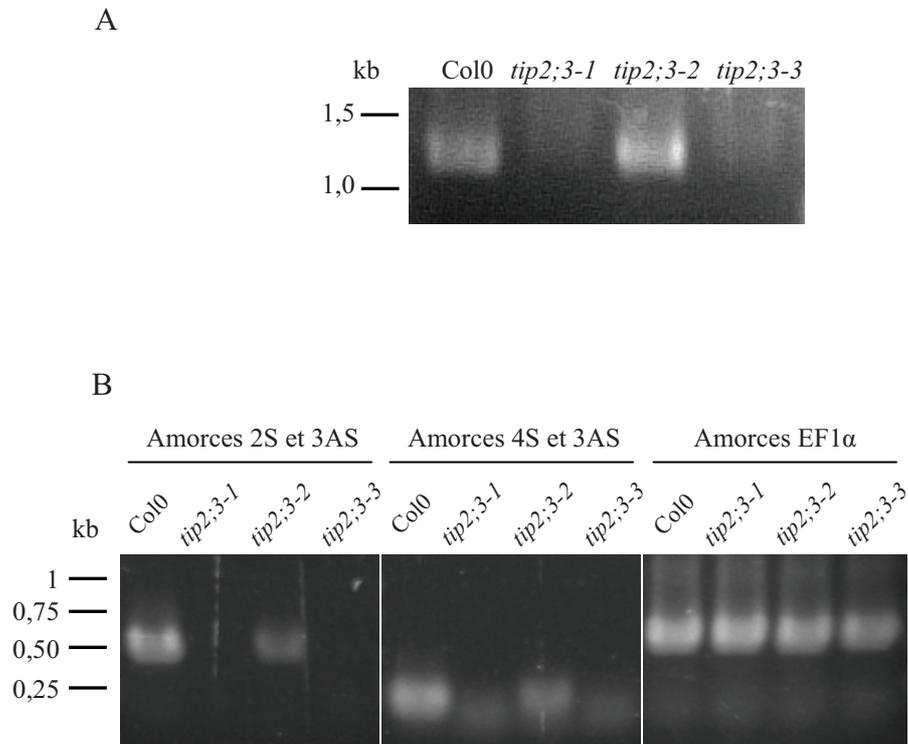
En résumé, il a été montré que l'aquaporine TIP2;3 est régulée au niveau transcriptionnel en réponse à un apport de composés azotés et en réponse à des traitements osmotiques (NaCl et mannitol). Les analyses de protéomique développées dans ce travail de thèse ont aussi révélé une forte diminution de la quantité d'un peptide N-terminal spécifique de cette isoforme en réponse à un traitement par le NaCl (annexe). Nous avons entrepris une caractérisation de l'impact de l'inactivation de cette aquaporine sur la  $L_0$  d'Arabidopsis. Ensuite, une étude biochimique a été menée pour tenter d'élucider le mécanisme pouvant rendre compte de variations d'abondance du peptide de son extrémité N-terminale.



**Figure 31 :** Identification des lignées invalidées pour *TIP2;3*.

(A) Amplicons obtenus par PCR à l'aide des amorces LBb1 et 1S à partir des lignées *tip2;3-1*, *tip2;3-2* et *tip2;3-3*.

(B) Carte physique du gène *TIP2;3* présentant les positions d'insertion d'ADN-T dans les lignées *tip2;3-1*, *tip2;3-2* et *tip2;3-3*. Les flèches horizontales représentent la position des amorces répertoriées dans le tableau 4.



**Figure 32:** Homozygotie des lignées invalidées pour *TIP2;3*.

La figure représente les amplicons obtenus par PCR (A) et RT-PCR (B) à partir des lignées *tip2;3-1*, *tip2;3-2* et *tip2;3-3*. Les localisations des amorces utilisées sont décrites dans la figure 31.

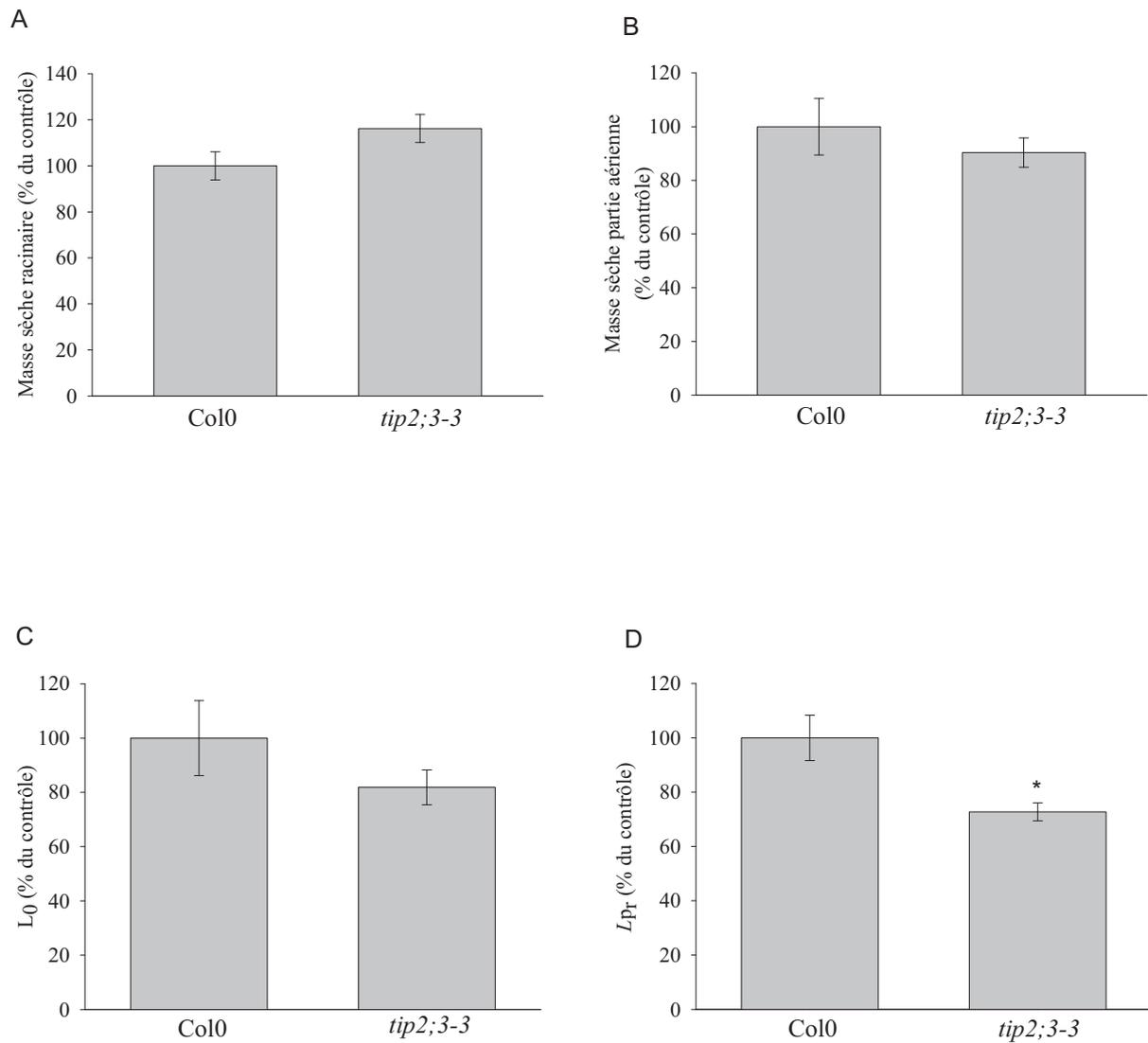


## .II CARACTERISATION MOLECULAIRE DES LIGNEES INVALIDEES POUR TIP2;3

Les trois lignées mutantes invalidées pour le gène *TIP2;3*, nommées *tip2;3-1*, *tip2;3-2* et *tip2;3-3* et fournies par l'équipe du Dr. Nicolaus Von Wiren, correspondent aux lignées SALK\_142179, SALK\_000414 et SALK\_074989. Cependant, en l'absence de correspondance entre les lignées reçues et l'annotation SALK, un premier travail d'identification moléculaire a été entrepris.

Selon les informations répertoriées sur le site du SALK, l'insertion de l'ADN-T de la lignée SALK\_142179 est située dans la région 5'-UTR du gène, celle de la lignée SALK\_000414 à la fin de l'exon 1 et enfin celle de la lignée SALK\_074989 au début de l'unique l'intron. Une réaction de PCR combinant l'amorce LBb1 (présente sur la bordure gauche de l'ADN-T) et l'amorce 1S localisée à l'extrémité 5' du gène *TIP2;3* (figure 31B), permet une amplification chez les trois lignées mutantes et non chez les plantes sauvages, ce qui confirme la présence d'un ADN-T dans les trois lignées (figure 31A). L'amplicon de la lignée *tip2;3-2* a une taille d'environ 250 pb, similaire à la taille attendue pour la lignée SALK\_142179. Les amplicons des lignées *tip2;3-1* et *tip2;3-3* sont de tailles similaires, comprises entre 500 et 750 kb. La distance annoncée par l'institut du SALK quant aux sites d'insertion des ADN-T des lignées SALK\_000414 et SALK\_074989 est de 36 paires de bases. La résolution du gel utilisé étant insuffisante pour observer cette différence, les produits de PCR amplifiés à partir des lignées *tip2;3-1* et *tip2;3-3* ont été purifiés et séquencés (matériel et méthode III.1.). Les résultats indiquent que les sites d'insertion des ADN-T des deux lignées sont strictement identiques (figure 31B), suggérant qu'il s'agit de la même lignée. Le site d'insertion de l'ADN-T identifié par ce séquençage est plus proche du site d'insertion annoncé pour la lignée SALK\_000414 que de celui annoncé pour la lignée SALK\_074989, suggérant que les plantes *tip2;3-1* et *tip2;3-3* correspondent à la lignée SALK\_000414.

Une réaction de PCR combinant les amorces 1S et 3AS, situées de part et d'autre des sites d'insertion des ADN-T (figure 31B), permet l'amplification d'une bande pour la lignée *tip2;3-2*, de la même taille que celle obtenue chez les plantes sauvages. Ces résultats révèlent l'hétérozygotie des plantes *tip2;3-2*. Par contre, aucune bande n'est amplifiée pour les lignées *tip2;3-1* et *tip2;3-3*, révélant leur homozygotie (figure 32A). Dans le but de confirmer ces résultats, des RT-PCR ont été réalisées. L'utilisation de deux couples d'amorces situées en 3' des sites d'insertion des ADN-T (amorces 2S et 3AS, 4S et 3AS) permet l'amplification de



**Figure 33 :** Morphologie,  $L_0$  et  $L_{pr}$  des plantes invalidées pour *TIP2;3*.

Les masses sèches racinaires (A) et des parties aériennes (B), ainsi que les valeurs moyennes de  $L_0$  (C) et de  $L_{pr}$  (D) des plantes sauvages et mutantes *tip2;3-3* sont présentées. Les données sont obtenues à partir de trois cultures indépendantes et  $n=14$  plantes au minimum. L'erreur standard est présentée. L'astérisque indique une valeur significativement différente de la valeur du sauvage (test de Student,  $p<0,05$ ).

bandes pour les plantes sauvages et *tip2;3-2* mais pas *tip2;3-1* et *tip2;3-3* (figure 32B), confirmant les résultats obtenus par PCR.

En résumé, les plantes *tip2;3-2* sont hétérozygotes et les plantes *tip2;3-1* et *tip2;3-3* sont homozygotes et identiques. Nous disposons donc d'une seule lignée homozygote, qui a été utilisée telle quelle pour étudier la fonction de TIP2;3 dans la plante. Les résultats obtenus à partir des plantes *tip2;3-3* sont présentés.

### **.III ROLE DE TIP2;3 DANS LE TRANSPORT D'EAU RACINAIRE**

Nous avons supposé qu'en tant qu'aquaporine du tonoplaste, TIP2;3 devrait être principalement impliquée dans la régulation du transport d'eau cellulaire. Son impact sur le transport d'eau racinaire a été évalué par l'utilisation de la chambre à pression. Parce qu'ils ne reposent sur l'analyse que d'une seule lignée mutante, les résultats obtenus dans ce chapitre donne une idée préliminaire de la fonction de TIP2;3 dans la racine.

#### **.III.1 Implication de TIP2;3 dans le transport d'eau racinaire**

Les mesures du transport d'eau racinaire ont été réalisées sur des plantes sauvages Col0 et *tip2;3-3*, dont les graines ont été amplifiées parallèlement à la même période de l'année.

Chez les plantes mutantes, ni la morphologie (masse sèche des parties racinaires et aériennes), ni la  $L_0$  ne sont altérées (figure 33A à C). En revanche, la  $L_p$  est inhibée de 27 % (figure 33D), ce qui suggère une modification des propriétés intrinsèques de transport d'eau de la racine. Cette inhibition est plus forte que celle documentée chez des plantes invalidées pour d'autres isoformes d'aquaporines. Par exemple, les plantes d'*Arabidopsis* invalidées pour *PIP1;2* présentent une réduction de la  $L_p$  d'environ 20 % [88]. Les plantes d'*Arabidopsis* invalidées pour *PIP2;2* ne présentent pas d'altération de la  $L_p$  [10].

Pour savoir si cette baisse de  $L_p$  est directement liée à l'absence de l'aquaporine TIP2;3 ou est due à un effet induit sur les aquaporines PIPs, la part des aquaporines PIPs dans le transport d'eau racinaire des plantes invalidées pour *TIP2;3* a été évaluée. Pour cela, un traitement par l'azide a été imposé. L'azide provoque une acidose intracellulaire, qui conduit à une fermeture des aquaporines PIPs dépendantes de la protonation d'un résidu histidine de la boucle D cytosolique [111, 112]. L'azide permet donc un blocage coordonné de toutes les aquaporines PIPs. Par exemple, un traitement par 1 mM d'azide inhibe d'environ 60 % la  $L_p$  d'*Arabidopsis* écotype Col0 [83]. Sachant que l'aquaporine TIP1;1 ne présente pas de résidu histidine sur la boucle D, qu'elle est insensible aux protons [111] et que TIP2;3 ne présente

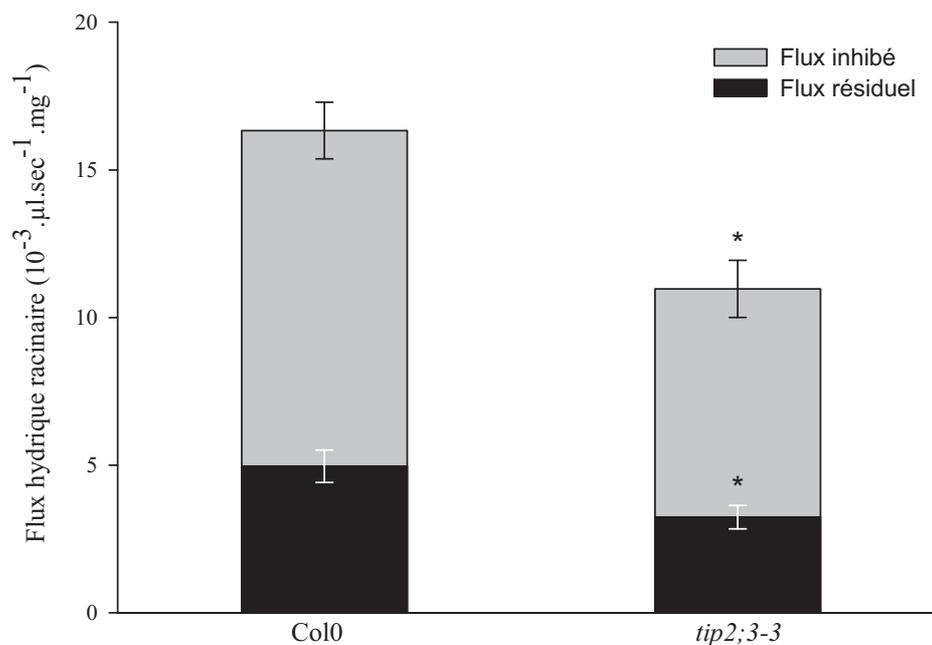


Figure 34 : Sensibilité à l'azide du transport d'eau racinaire chez des plantes sauvages et mutantes invalidées pour *TIP2;3*.

La figure présente le flux inhibé par le traitement par l'azide (gris) et le flux non inhibé, ou résiduel (noir) des plantes Col0 et *tip2;3-3* suite à l'application de 2 mM d'azide dans le milieu de mesure en chambre à pression. La somme de ces deux flux constitue donc le flux racinaire en condition standard. Les données sont obtenues à partir d'une culture,  $n=8$  à 10 plantes. L'erreur standard est présentée. Les astérisques indiquent une valeur significativement différente de la valeur de Col0 (test de Student,  $p<0,05$ ).

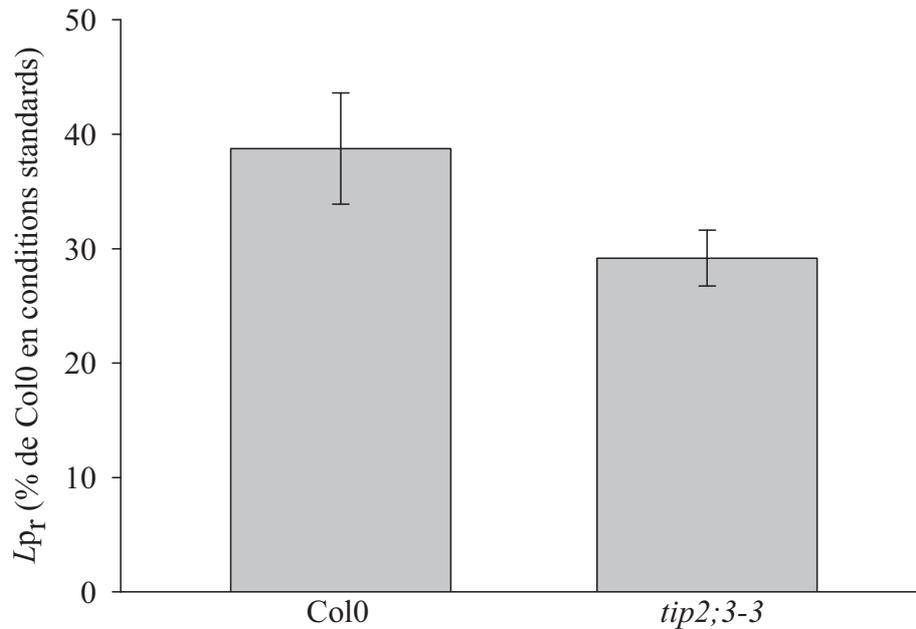


Figure 35 : Effet d'un traitement salin sur la  $L_{p_r}$  de plantes sauvages ou invalidées pour *TIP2;3*.

La figure présente les valeurs de  $L_{p_r}$  des plantes sauvages et *tip2;3-3*, mesurées après 2 h de traitement par 100 mM de NaCl, et rapportées aux valeurs de  $L_{p_r}$  de Col0 mesurées en conditions standards. Les données sont obtenues à partir de 2 cultures indépendantes et  $n=14$  plantes au minimum. L'erreur standard est présentée.



pas non plus de résidu histidine sur la boucle D, nous avons supposé que cette dernière est également insensible aux protons.

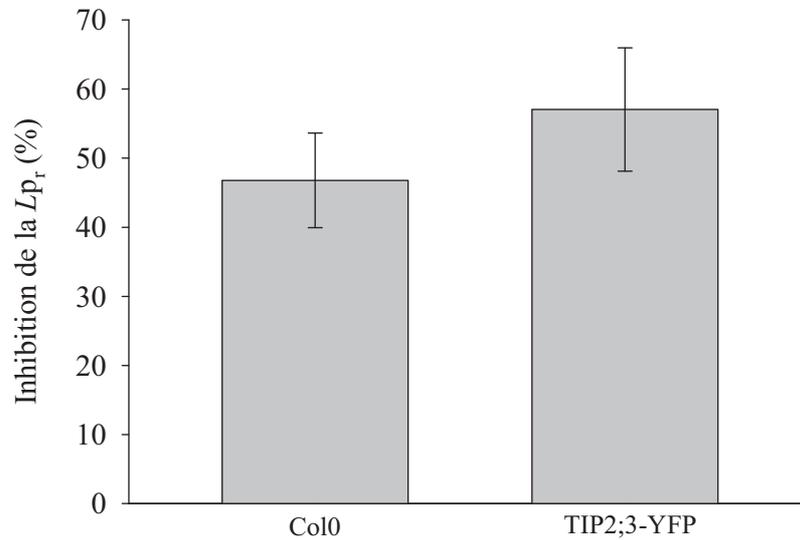
Le flux d'eau racinaire de plantes sauvages ou invalidées pour *TIP2;3* a été mesuré à 340 kPa et rapporté à la masse racinaire. La figure 34 présente le flux inhibé par le traitement par l'azide (gris) et le flux non inhibé, ou résiduel (noir). La somme de ces deux flux constitue donc le flux racinaire en conditions standard. La figure 34 illustre le fait que la  $L_{p_r}$  est réduite de 34 % chez les plantes mutantes par rapport aux plantes sauvages. La part du transport d'eau sensible à l'azide est réduite chez les plantes mutantes, suggérant que les aquaporines PIPs sont moins actives (figure 34, barres grises). La part du transport d'eau insensible à l'azide est également réduite chez les plantes mutantes, suggérant un effet de l'aquaporine TIP2;3 (figure 34, barres noires).

Nos résultats suggèrent que la vacuole, et donc TIP2;3, participent de manière significative aux flux d'eau transcellulaires. La perte de fonction de TIP2;3 aurait donc un effet direct sur la  $L_{p_r}$ . Une hypothèse complémentaire est que l'absence de la protéine TIP2;3 modifie l'équilibre osmotique de la cellule, affectant ainsi l'activité des aquaporines PIPs à la membrane plasmique et donc la  $L_{p_r}$ . L'aquaporine TIP2;3 contribuerait donc de façon directe et indirecte au transport d'eau racinaire.

### **.III.2 Régulation de la $L_{p_r}$ des plantes *tip2;3* en réponse au stress salin**

L'abondance du peptide de l'extrémité N-terminale de TIP2;3 variant fortement en réponse au stress salin (annexe), la  $L_{p_r}$  de la lignée invalidée pour *TIP2;3* a été étudiée suite à l'application de ce traitement. Pour cela, un traitement par 100 mM de NaCl a été appliqué pendant 2 h à des plantes sauvages Col0 et mutantes *tip2;3-3*. La part de la  $L_{p_r}$  insensible au traitement NaCl n'est pas significativement différentes chez les plantes mutantes par rapport aux plantes sauvages (figure 35). Ce résultat suggère que TIP2;3 contribue à la part de  $L_{p_r}$  qui est inhibée par le traitement salin et donc que TIP2;3 est sensible à ce traitement.

En résumé, TIP2;3 participerait directement et indirectement à la  $L_{p_r}$  à hauteur de 30 % et serait sensible au traitement salin. Cependant, ces résultats ont été obtenus à partir d'une seule lignée invalidée pour *TIP2;3* et il sera indispensable de les confirmer à l'aide d'une autre lignée homozygote en préparation. Dans la mesure où l'abondance d'un peptide de l'extrémité N-terminale de TIP2;3 est diminuée par le traitement NaCl, cette zone de la protéine pourrait être impliquée dans sa sensibilité au NaCl. Des études biochimiques ont été entreprises afin de décrire cette implication.



**Figure 36 :** Altération de la  $Lp_r$  chez des plantes sauvages et TIP2;3-YFP suite à un traitement par 100 mM de NaCl pendant 2 h.

Les histogrammes présentent le pourcentage d'inhibition de la  $Lp_r$  des plantes sauvages Col0 et TIP2;3-YFP en réponse à un traitement par 100 mM NaCl pendant 2 h. Les données sont obtenues à partir de 2 cultures indépendantes,  $n=10$  plantes au minimum. L'erreur standard est présentée.

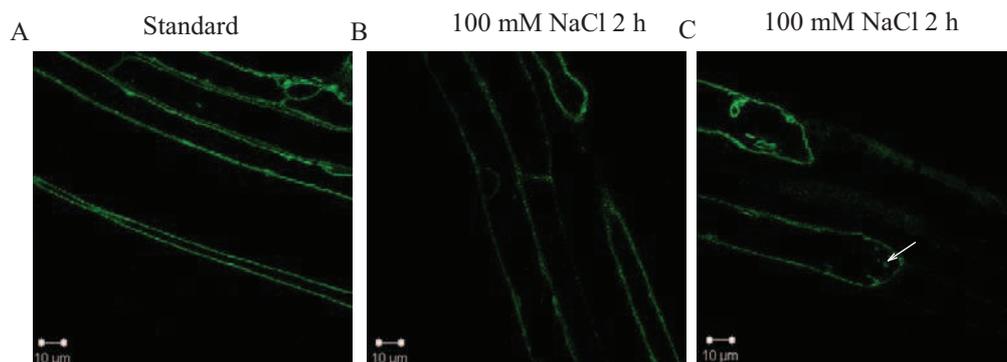


Figure 37 : Localisation subcellulaire de TIP2;3-YFP en conditions standard ou après traitement par 100 mM de NaCl.

Images représentatives de racines de plantes transgéniques exprimant TIP2;3-YFP, âgées de 8 jours cultivées *in vitro* puis transférées en milieu hydroponique standard (A) ou additionné de 100 mM NaCl pendant 2 h (B et C). La flèche blanche pointe une structure ronde, observée dans seulement 3 % des cellules analysées dans les deux conditions.



## .IV ANALYSE BIOCHIMIQUE

Lorsque ce travail a été amorcé, aucun anticorps dirigé contre TIP2;3 n'était disponible commercialement. En revanche, nous avons eu accès à des plantes transgéniques exprimant dans un fond sauvage la protéine TIP2;3 fusionnée à la YFP sous contrôle du promoteur natif de *TIP2;3* (source : Dr Lorenzo Frigerio) et des anticorps dirigés contre la protéine GFP reconnaissant la YFP (Invitrogen). Ces plantes et anticorps ont été utilisés pour immunopurifier la protéine TIP2;3-YFP. La sensibilité de ces plantes au traitement NaCl a préalablement été vérifiée. Ensuite, la localisation sub-cellulaire, la dégradation et l'état de MPT de TIP2;3-YFP ont été étudiés par des approches d'imagerie cellulaire et de biochimie.

### .IV.1 Sensibilité des plantes TIP2;3-YFP au traitement NaCl

Les mesures du transport d'eau racinaire ont été réalisées par la technique de la chambre à pression sur des plantes sauvages Col0 ou exprimant TIP2;3-YFP. De façon similaire aux plantes Col0, un traitement de 2 h par 100 mM de NaCl inhibe de 53 % la  $L_{p_r}$  des plantes TIP2;3-YFP (figure 36). Il est donc justifié d'utiliser ces plantes transgéniques pour la suite de notre étude sur la régulation de TIP2;3 par un traitement salin.

### .IV.2 Localisation sub-cellulaire de TIP2;3 en réponse au traitement NaCl

Dans le cadre de l'étude de protéomique quantitative précédente, les protéines microsomales, donc l'ensemble des membranes cellulaires, ont été analysées. Cette étude ne permet pas de détecter d'éventuels changements de localisation subcellulaire, induits par une MPT par exemple. Cette hypothèse a donc été évaluée pour TIP2;3 spécifiquement en analysant la localisation subcellulaire de TIP2;3-YFP après un traitement NaCl. Pour cela, des plantes exprimant la protéine TIP2;3-YFP, cultivées *in vitro* pendant 8 jours (matériel et méthode I.2.b) ont été transférées en milieu hydroponique standard ou additionné de 100 mM de NaCl pendant 2 h puis observées à l'aide d'un microscope confocal. La figure 37 présente des photographies représentatives des cellules de racines de TIP2;3-YFP en conditions standard (figure 37A) et de traitement NaCl (figure 37B). La photographie C présente des structures rondes à l'intérieur de la vacuole centrale. Contrairement aux résultats décrits par Gattolin *et al.* (2009), la totalité des cellules analysées (n=59 en condition standard et n=90 en condition NaCl) présente un marquage au tonoplaste et seules 3 % d'entre elles présentent un marquage au niveau de *bulbs* [243].

En résumé, le traitement NaCl ne modifie pas la localisation sub-cellulaire de TIP2;3-YFP.

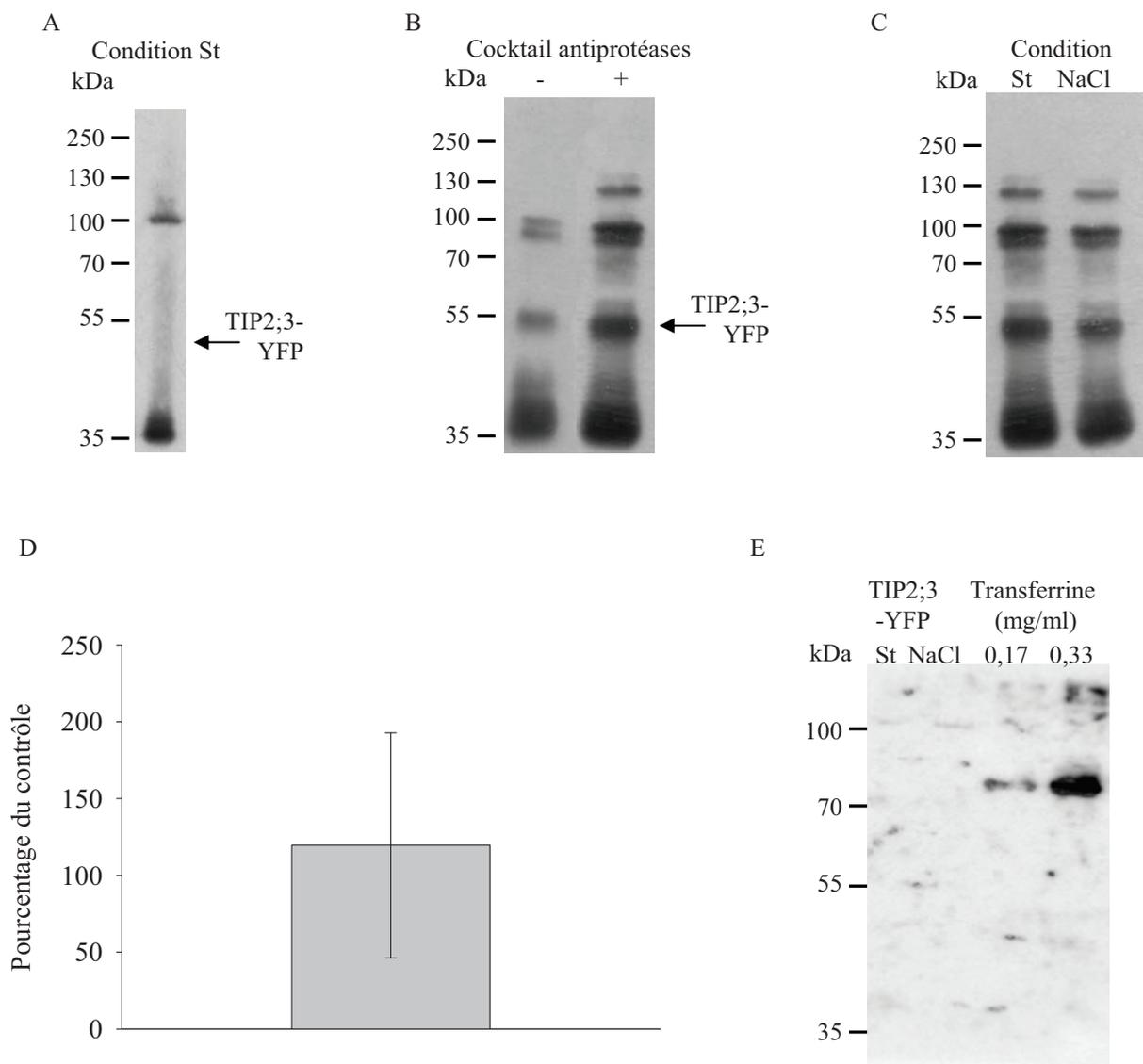


Figure 38 : Recherche d'une dégradation éventuelle de TIP2;3 en réponse au traitement par NaCl.

Les figures A à C présentent ses western blots réalisés avec un anticorps dirigé contre la YFP, effectués à partir de protéines microsomales extraites de racines de plantes transgéniques exprimant TIP2;3-YFP cultivées en conditions standard (A), de protéines enrichies en TIP2;3-YFP par immunoprécipitation à partir de plantes transgéniques exprimant TIP2;3-YFP cultivées en conditions standards (B) ou traitées par 100 mM NaCl pendant 2 h (C).

Le graphique (D) présente la variation relative de la quantité de TIP2;3-YFP en réponse au traitement par 100 mM NaCl pendant 2 h. Les valeurs obtenues sont rapportées à la valeur obtenue en condition standard. Les données ont été obtenues à partir de 2 cultures indépendantes avec 5 plantes par culture. L'erreur standard est présentée.

La figure E présente un western blot réalisé pour tester la présence de sites de glycosylation, effectué à partir de protéines microsomales extraites à partir de racines de plantes transgéniques exprimant TIP2;3-YFP cultivées en conditions standards ou traitées par 100 mM NaCl pendant 2 h. Les données ont été obtenues à partir de 2 cultures indépendantes avec un minimum de 10 plantes par culture. La transferrine est un contrôle positif.

### .IV.3 Dégradation de la protéine TIP2;3 en réponse au traitement NaCl

La diminution de la quantité du peptide non modifié de l'extrémité N-terminale de TIP2;3 pourrait s'expliquer par une dégradation de la protéine. Pour tester cette hypothèse, les protéines microsomales ont été extraites de plantes transgéniques exprimant la protéine TIP2;3-YFP puis dosées précisément par la méthode de Bradford (matériel et méthode VI.1.). Ensuite, un western blot a été réalisé avec un anticorps dirigé contre la protéine YFP (figure 38A). La bande correspondant à la protéine TIP2;3-YFP native, attendue à 50 kDa, est absente. Par contre, une bande à 100 kDa pourrait correspondre à un dimère de TIP2;3-YFP. Les bandes révélées à 35 kDa suggèrent par ailleurs l'existence de dégradation. Dans le but d'évaluer si cette dégradation a lieu lors de l'extraction des protéines, un western blot a été réalisé sur un extrait de protéines enrichies en TIP2;3-YFP par immunoprécipitation (matériel et méthode VI.2.). Cette expérience a été effectuée en présence des mêmes antiprotéases que pour l'extraction de protéines microsomales, c'est-à-dire en présence de PMSF (inhibiteur de protéases à sérine), de phénantroline (inhibiteur de métalloprotéases) et de leupeptine (inhibiteur de protéases à sérine, cystéine et thréonine). Nous avons aussi éventuellement ajouté un cocktail contenant un spectre plus large d'antiprotéases (pepstatine A : inhibiteur de protéases acide, E-64 : inhibiteur de protéases à cystéines, Sigma P8215). La figure 38B montre que la bande native de TIP2;3-YFP attendue à 50 kDa est présente à l'issue des deux protocoles, suggérant que cette nouvelle méthode d'extraction plus que la protection accrue contre les protéases est essentielle au recouvrement de la protéine TIP2;3-YFP. Toutefois, des protéines de plus bas poids moléculaire sont toujours détectées (figure 38B). Ainsi, des processus de dégradation opèrent probablement *in vivo* ou alors, ces processus sont résistants aux inhibiteurs ajoutés lors de l'extraction.

Nous avons conscience qu'il peut être délicat d'étudier un processus de dégradation en réponse à un traitement dans un contexte où une dégradation se produit déjà en conditions standard. Malgré cela, nous avons comparé le profil des protéines enrichies en TIP2;3-YFP par immunoprécipitation à partir de plantes cultivées en milieu standard ou traitées pendant 2 h par 100 mM de NaCl. Les résultats du western blot révèlent un profil inchangé suite au traitement NaCl (figure 38C). Afin d'avoir une approche quantitative, nous avons réalisé un dosage ELISA de ces extraits. La figure 38D montre qu'un traitement par 100 mM NaCl pendant 2 h ne modifie pas l'abondance de TIP2;3-YFP (figure 38D).

En résumé, l'ensemble de ces résultats suggère que la protéine TIP2;3 n'est pas spécifiquement dégradée en réponse au traitement NaCl.



#### .IV.4 Modification post-traductionnelle de TIP2;3

La diminution de la quantité du peptide non modifié de l'extrémité N-terminale de TIP2;3 pourrait s'expliquer par un changement de son état de MPT. Nos approches de MS ont permis de montrer que l'extrémité N-terminale de TIP2;3 est diméthylée, soit sous la forme de deux méthylations sur les résidus S17 et K19, soit sous la forme d'une diméthylation sur le résidu K19. Le peptide diméthylé n'ayant pas été quantifié, une étude dédiée à sa quantification, par MRM par exemple, devrait permettre de savoir si c'est le statut de méthylation du peptide N-terminal de TIP2;3 qui est responsable de la variation de l'abondance de sa forme non modifiée, en réponse au traitement salin.

D'autre part, selon le logiciel NetPhos, TIP2;3 est prédite comme phosphorylable sur les résidus S8, S12 et S17 de son extrémité N-terminale, S47 et T46 de sa boucle A et S201 de sa boucle E. La plus forte probabilité concerne le résidu S17. Cependant, malgré l'utilisation combinée d'un fractionnement SCX et d'un enrichissement sur colonne de titane, l'approche phosphoprotéomique n'a pas permis d'identifier de phosphorylation d'un peptide N-terminal. Des anticorps dirigés contre les sérines phosphorylées ont aussi été utilisés pour caractériser la fraction enrichie en TIP2;3-YFP. Toutefois, cette approche n'a pas été concluante en raison du nombre trop important de marquages non spécifiques (données non montrées).

On sait par ailleurs que chez *Mesembryanthemum crystallinum*, la relocalisation de l'aquaporine *McTIP1;2* en réponse à un traitement par 200 mM de mannitol dépend de la glycosylation de la protéine [68]. Pour tester l'hypothèse d'une glycosylation de TIP2;3 en réponse au traitement NaCl, TIP2;3-YFP a été immunoprécipitée et testée par western blot pour la présence de sites de glycosylation en utilisant la biotine. Cependant, aucune glycosylation n'a été détectée (figure 38E).

Enfin, la sumoylation (SUMO : small ubiquitin-like modifier) est décrite pour affecter de nombreux mécanismes chez les plantes mais surtout pour intervenir lors de la réponse des plantes à des stress biotiques et abiotiques (pour revue [251]). De façon intéressante, un site de sumoylation est prédit sur le résidu K3 de l'extrémité N-terminale (logiciel SUMOsp). Toutefois, une approche de protéomique dédiée serait nécessaire pour étudier cette modification chez TIP2;3.

En résumé, nos résultats suggèrent que la diminution de l'abondance du peptide de l'extrémité N-terminale de TIP2;3 n'est liée ni à une relocalisation ni à une dégradation de la protéine. Elle semble ne pas non plus être liée à un événement de phosphorylation ou de glycosylation.



Des études supplémentaires dédiées à la recherche et à la quantification d'autres MPTs, telles que la sumoylation et la méthylation, pourraient permettre d'élucider cette régulation.

## .V DISCUSSION

Les résultats obtenus dans ce chapitre suggèrent que l'activité de l'aquaporine TIP2;3 serait sensible au traitement salin (figure 35), traitement qui provoque une variation de l'abondance d'un peptide de son extrémité N-terminale. Cette aquaporine semble donc régulée en réponse à ce stress. On peut imaginer que, comme dans le cas des PIPs, la régulation des TIPs s'exerce au travers d'une régulation de leur activité intrinsèque de transport d'eau ou bien d'une relocalisation des TIPs dans des structures membranaires non tonoplastiques. Concernant la 2<sup>ème</sup> hypothèse, il a été montré chez *Arabidopsis* que le traitement salin induit une relocalisation de certaines TIPs, dont *AtTIP1;1*, dans des structures sphériques [115]. Un autre type de relocalisation a été observé chez *Mesembryanthemum crystallinum* où l'aquaporine *McTIP1;2* est relocalisée vers des endosomes en réponse au traitement par 200 mM de mannitol [68]. Cette relocalisation a été interprétée comme faisant partie intégrante du processus de restauration et de maintien de l'osmolarité cellulaire en condition de déséquilibre osmotique [68]. Cependant, ce type de régulation ne semble pas s'appliquer à TIP2;3 puisque la protéine fusion TIP2;3-YFP montre une localisation similaire en conditions standard et de traitement salin. Ceci suggère que la régulation s'opère plutôt au niveau de l'activité de la protéine. De plus, cette régulation pourrait affecter l'extrémité N-terminale qui présente une forte variation de profil protéomique en réponse au traitement NaCl. Une hypothèse est que cette partie de la protéine comporterait des sites de MPTs impliqués dans le contrôle de l'ouverture et de la fermeture (gating) de la protéine. Par exemple trois sites de phosphorylation ont été identifiés chez TIP3;1 [246] comme impliqués dans la régulation de l'activité de cette aquaporine. Notre incapacité à identifier des sites de phosphorylation chez TIP2;3 par phosphoprotéomique suggère que soit ces sites n'existent pas, soit que la proportion de protéines phosphorylées est trop faible pour être détectée. Alternativement, un autre type de modification pourrait être impliqué. L'identification et la quantification de cette éventuelle modification nécessitera d'enrichir davantage l'extrait protéique en TIP2;3, par exemple au travers de techniques d'immunopurifications. Il faudra ensuite mener une approche d'enrichissement spécifique de la modification recherchée : dans un premier temps, la méthylation, puis dans un deuxième temps, une sumoylation, et enfin une approche d'identification par MS/MS.



Il est maintenant démontré que la réponse du transport d'eau racinaire chez *Arabidopsis* à diverses contraintes environnementales dont le NaCl implique la production de ROS [252]. Notre groupe a précédemment décrit une inhibition de la  $Lp_r$  par l' $H_2O_2$  et l'étude phosphoprotéomique quantitative correspondante, engagée dans ce travail de thèse, permettra d'évaluer l'existence de mécanismes communs de régulation en réponse à NaCl et à l' $H_2O_2$ , en particulier pour TIP2;3. Il sera dans ce cas pertinent d'étudier la réponse de mutants *tip2;3* à l' $H_2O_2$ .

Les études de protéomique quantitative développées dans ce travail ont également permis de révéler une forte variation de l'abondance d'un peptide de l'extrémité N-terminale de TIP2;2 (*i.e.* diminution d'un facteur 3,5) après 18 min de traitement par le DEA-NO (annexe). Des analyses préliminaires montrent que TIP2;2 n'est ni relocalisée ni dégradée en réponse au traitement par le DEA-NO (données non montrées). Une approche de physiologie moléculaire similaire à celle menée sur TIP2;3 pourra être engagée dans le cas de TIP2;2 pour évaluer son rôle dans le transport d'eau racinaire.

Les aquaporines TIP2;2 et TIP2;3 présentent le même territoire d'expression et sont les deux isoformes d'aquaporines présentant la plus forte réponse en condition de stress et ce, au niveau de leur extrémité N-terminale (annexe). L'obtention de la totalité des données de MS devrait permettre d'évaluer si ces isoformes sont particulièrement régulées en réponse à d'autres conditions environnementales.

Finalement, cette étude suggère qu'en plus de leur rôle d'osmorégulateur [242], les aquaporines du tonoplaste pourraient jouer un rôle dans la  $Lp_r$  et sa régulation en réponse à des contraintes environnementales. Le rôle, limitant ou non, de la vacuole dans les flux d'eau transcellulaires a déjà été discuté [240] mais aucune donnée expérimentale n'avait permis de trancher ce point. Nos données indiquent que, de fait, un flux d'eau transvacuolaire et pas uniquement un contournement par le cytoplasme constitue une voie de passage majeure de l'eau au travers des cellules végétales. Par ailleurs, les résultats obtenus dans ce chapitre nous ont conduit à proposer que l'absence de la protéine TIP2;3 pourrait modifier l'équilibre osmotique de la cellule, régulant ainsi l'activité des aquaporines PIPs à la membrane plasmique et donc la  $Lp_r$ . Ainsi, l'aquaporine TIP2;3 contribuerait de façon directe et indirecte au transport d'eau racinaire, à hauteur de 30 %.



## **DISCUSSION GENERALE**



Plusieurs études ont montré que la régulation du transport d'eau racinaire est cruciale pour affronter diverses conditions environnementales abiotiques et biotiques stressantes et que les aquaporines sont des acteurs majeurs du transport d'eau racinaire. Dans ce travail, nous avons cherché à relier la régulation de la  $Lp_r$  dans diverses situations environnementales à la régulation des aquaporines, et ce, sur un même organisme. Pour cela, la  $Lp_r$  a été mesurée suite à l'application de contraintes osmotiques (NaCl, mannitol), biotiques (flagelline), oxydantes ( $H_2O_2$ , NO) et nutritionnelles (carence puis réalimentation en nitrate ou phosphate, obscurité et alimentation en saccharose). Les aquaporines étant les acteurs moléculaires majeurs de la régulation de la  $Lp_r$  et leur phosphorylation étant impliquée dans la régulation de leur activité intrinsèque et localisation subcellulaire [16], l'objectif de cette étude était de mettre en évidence un ou plusieurs mécanisme(s) de régulation des aquaporines impliqués dans la modulation de la  $Lp_r$ . Pour cela, la variation potentielle de l'abondance des aquaporines PIP1s (PIP1;1 à PIP1;4) et PIP2s (PIP2;1 à PIP2;3) a été mesurée par dosage ELISA et la variation de l'état de MPT de l'ensemble des isoformes d'aquaporines (PIP, TIP, NIP, SIP) a été étudiée par MS dans quatre situations affectant la  $Lp_r$  : les traitements par le NaCl, le DEA-NO, la carence et réalimentation en phosphate.

Les résultats du premier chapitre montrent que la  $Lp_r$  est inhibée par l'ensemble des contraintes appliquées sauf la réalimentation en phosphate de plantes carencées en cet ion. Les données issues des dosages ELISA des aquaporines PIP1s et PIP2s montrent une absence de corrélation entre la  $Lp_r$  et l'abondance de ces aquaporines (tableau 10). Cette absence de relation n'est pas nouvelle puisque sur plusieurs études traitant de la réponse au stress hydrique, des comportements différents voire opposés ont été répertoriés entre l'expression des gènes d'aquaporines ou la teneur des protéines et la  $L_0$  [110]. Il faut donc imaginer que d'autres types de régulation sont impliqués. Lorsque l'abondance des aquaporines diminue alors que la  $Lp_r$  est inchangée (cas du standard DEA-NO) ou stimulée (cas de la réalimentation en phosphate de plantes carencées), une hypothèse est que les aquaporines seraient plus actives. Par contre, dans le cas où la  $Lp_r$  est inhibée alors que l'abondance des aquaporines reste inchangée (cas du NaCl et de la carence en phosphate) ou augmentée (cas du DEA-NO), une hypothèse est que ces aquaporines seraient moins actives. Ces variations de leur activité peuvent être liées à une modulation de leur activité intrinsèque de transport d'eau ou à une localisation différente de la membrane plasmique. Par exemple, en réponse au traitement salin, la diminution de la phosphorylation du résidu S283 provoquerait un défaut d'adressage de la protéine à la membrane plasmique [54]. De même, sachant que la



phosphorylation du résidu S280 serait impliquée dans l'activité intrinsèque de la protéine [22] et que celle du résidu S283 est impliquée dans l'adressage à la membrane plasmique [54], la diminution de la phosphorylation des résidus S280 et S283 en réponse à la carence en phosphate pourrait expliquer en partie la diminution de l'activité de PIP2;1. Bien sûr, d'autres isoformes de PIPs devraient subir une régulation similaire pour expliquer l'amplitude des variations de  $Lp_r$ . Par contre, on constate qu'il existe des contextes où la  $Lp_r$  augmente, sans que l'on observe une augmentation de la phosphorylation des résidus S280 et S283. Il doit donc exister d'autres mécanismes pour activer les aquaporines. Parmi eux, l'augmentation de la phosphorylation du résidu S277 dans le cas du traitement salin et de la carence en phosphate semble en partie corrélée avec la baisse de  $Lp_r$ .

D'autre part, l'état de phosphorylation de l'extrémité N-terminale de PIP1;1/1;2 est également modulé : il diminue ou est invariant dans les situations où l'activité des aquaporines diminue. Par contre, dans les situations où l'activité des aquaporines augmente, l'abondance de ces peptides phosphorylés augmente. La variation de l'état de phosphorylation de l'extrémité N-terminale de PIP1;1/1;2 semble donc corrélée à une potentielle variation d'activité des aquaporines. Il devient maintenant essentiel de positionner précisément les sites de phosphorylation, par fragmentation de type ETD par exemple. L'étude de mutants mimant l'absence de phosphorylation ou la présence d'une phosphorylation constitutive devrait permettre d'évaluer le rôle de ces phosphorylations ainsi que de celui du résidu S277. Contrairement à d'autres PIP1, l'isoforme PIP1;2 manifeste une activité de transport d'eau après expression hétérologue en ovocytes de xénope. Ce système permettra donc d'étudier le rôle des phosphorylations mentionnées plus haut dans la régulation de l'activité des protéines PIP1s. L'expression en plantes transgéniques de ces protéines mutantes fusionnées à la GFP permettra aussi d'évaluer leur rôle dans l'adressage à la membrane plasmique.

Enfin, la  $Lp_r$  n'est probablement pas régulée uniquement par les aquaporines de la membrane plasmique. En effet, des régulations concernant les aquaporines TIPs ont été mises en évidence en réponse au traitement NaCl (TIP2;3) et DEA-NO (TIP1;2 et TIP2;2). Trois études récentes soulignent une possible implication des TIPs dans la réponse aux stress hydriques et salins [91-93]. La surexpression d'une TIP1 du ginseng (*Panax ginseng*) chez *Arabidopsis* confère une résistance au stress salin [91] alors que celle d'une TIP2 du soja (*Glycine soja*) chez *Arabidopsis* induit une sensibilité accrue à ce stress [93]. Cette apparente contradiction tient peut-être au fait que les deux TIPs appartiennent à des sous-familles différentes, ont des caractéristiques différentes de localisation et d'expression, engendrant donc des réponses différentes. Ce travail de thèse démontre que l'aquaporine TIP2;3 contribue



au transport d'eau racinaire et suggère l'implication de différentes isoformes TIP en réponse à différentes catégories de stress. L'ensemble de ces résultats suggère l'existence d'un dialogue entre le tonoplaste et la membrane plasmique pour coordonner la réponse du transport d'eau racinaire à différentes contraintes environnementales.

En résumé, les observations réalisées au niveau de la  $Lp_r$  sont la résultante de mécanismes multifactoriels. Ce travail a permis d'identifier au moins trois éléments de ces mécanismes : l'état de phosphorylation des trois sites de l'extrémité C-terminale de PIP2;1/2;2/2;3, l'état de phosphorylation de l'extrémité N-terminale de PIP1;1/1;2, ainsi que les aquaporines TIPs.

Les données actuelles issues de l'étude par MS quantitative ne permettent pas de dégager de similitude de comportements d'aquaporines entre les différents traitements considérés. Or il existe des voies de signalisation communes entre différents stimuli. Par exemple, le NO est impliqué dans la réponse des plantes à différents stress abiotiques tels que sécheresse et les fortes températures [253]. Le NO est aussi impliqué dans la tolérance au stress osmotique en induisant l'expression d'antiporteurs  $Na^+/H^+$  [254]. La caractérisation protéomique de protéines microsomales, telle qu'elle a été développée dans ce travail, permettra peut-être de mettre en évidence des similitudes de comportements entre les différents traitements étudiés. Par ailleurs, il a été montré que l' $H_2O_2$  stimule la production de NO. L'analyse par MS des autres traitements ( $H_2O_2$ , mannitol, carence nitrate et nutrition en molécules carbonées) permettra probablement de mettre en évidence des profils de réponse et peut-être des mécanismes communs au sein d'un même type de traitement (osmotique, oxydant ou nutritionnel).

D'autre part, il sera pertinent de comparer les cinétiques de variation d'abondance ou de modification des aquaporines avec celles d'enzymes comme des protéines kinases ou phosphatases, pour pouvoir proposer l'implication d'une de ces enzymes dans la régulation des aquaporines. Par la suite, l'étude, chez des plantes mutantes pour ces enzymes candidates, de la régulation de la  $Lp_r$  et des aquaporines pourrait permettre d'identifier de nouvelles voies de signalisation.



## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**



Ce travail constitue la première étude caractérisant, simultanément et dans un même organisme, la réponse de la  $Lp_r$ , de l'abondance des aquaporines et de leurs formes modifiées, à plusieurs types de contraintes environnementales caractéristiques de stress osmotiques, oxydants et nutritionnels.

Sept des huit traitements testés ont montré un effet sur l'hydraulique racinaire d'*Arabidopsis* au travers de réponses rapides allant de quelques minutes (DEA-NO,  $H_2O_2$ ) à quelques heures (mannitol, NaCl, réalimentation en phosphate de plantes carencées, traitement avec du saccharose de plantes exposées à l'obscurité), et de réponses plus longues *i.e.* de quelques jours (carences en nitrate et en phosphate). Aucun effet d'une réalimentation en nitrate de plantes carencées en cet ion n'a été mesuré. Des études ont montré que ce traitement stimule la  $Lp_r$  chez le lotier [136, 139], la tomate et le concombre [140], le maïs [141] ou encore chez le tournesol [138] ; cependant cet effet n'avait jamais été exploré chez *Arabidopsis*. Une hypothèse est que la  $Lp_r$  d'*Arabidopsis* pourrait être stimulée suite à des temps de réalimentation plus longs que le délai de 24 h qui a été étudié. D'autre part, malgré le fait que la flagelline induise une production d' $H_2O_2$  dans la racine (M. Boudsoq, communication personnelle), un composé décrit comme inhibant la  $Lp_r$  d'*Arabidopsis* [255], aucun effet n'a été mesuré dans cette étude suite à l'application de flg22 dans le milieu de culture.

Des approches protéomique et phosphoprotéomique quantitative menées sur des extraits racinaires de protéines microsomaux ont permis de quantifier les variations d'abondance des aquaporines et de leurs formes modifiées dans les situations environnementales décrites comme altérant la  $Lp_r$ . Cette étude a permis d'identifier, parmi les 35 isoformes d'aquaporines [11], 22 isoformes, dont l'ensemble de celles qui sont prédites comme racinaires, exceptée l'isoforme SIP1;1 (eFP Browser). Sept nouveaux sites de phosphorylation de ces protéines ont également été décrits. Cette étude a aussi montré que les aquaporines PIPs et TIPs peuvent être modifiées par d'autres types de MPTs incluant la déamidation, la méthylation et la formylation. Il apparaît donc, qu'en plus de leur multiplicité d'isoformes, les aquaporines racinaires existent sous de multiples formes de part leur statut de modification post-traductionnelle.

D'un point de vue quantitatif, et dans le cadre de la réponse à trois traitements représentatifs de plusieurs catégories de contraintes environnementales (NaCl, NO, carence et réalimentation en phosphate), la mesure par ELISA des variations d'abondance des aquaporines PIPs, couplée à la classification hiérarchique des variations d'abondance des



peptides d'aquaporines PIPs et TIPs mesurées par MS, permet de dégager les conclusions suivantes :

- les modulations de la  $Lp_r$  ne peuvent pas être simplement expliquées par une variation de l'abondance des aquaporines PIP1s et PIP2s, suggérant que les aquaporines sont impliquées dans la modulation de la  $Lp_r$  au niveau de leur activité intrinsèque de transport d'eau (gating) ou de leur localisation sub-cellulaire.

- les variations de l'état de phosphorylation des résidus S280 (probablement impliqué dans le gating [22]) et S283 (impliqué dans la localisation sub-cellulaire [54]) de l'extrémité C-terminale des aquaporines PIP2;1/2;2/2;3 peuvent expliquer, au moins en partie, les modulations de  $Lp_r$  observées en réponse au traitement salin et à la carence en phosphate. Cependant, on constate qu'il existe des contextes où la  $Lp_r$  est stimulée, sans que l'on observe une augmentation de la phosphorylation des résidus S280 et S283. D'autres mécanismes sont donc probablement impliqués dans la modulation de l'activité des aquaporines. Parmi eux, l'augmentation de la phosphorylation du résidu S277 dans le cas du traitement salin et de la carence en phosphate semble être en partie corrélée avec la baisse de  $Lp_r$ .

- les variations de l'état de phosphorylation de l'extrémité N-terminale de PIP1;1/1;2 pourraient également expliquer une partie des modulations de  $Lp_r$ . En effet, nos résultats ont montré que cet état de phosphorylation diminue ou est invariant dans les situations où l'activité des aquaporines diminue. Par contre, l'abondance des formes phosphorylées augmente dans les situations où l'activité des aquaporines augmente.

- la déamidation pourrait créer un contexte favorable pour l'activité de protéines kinases, au détriment des protéines phosphatases. En effet, cette modification est dans certains cas associée à une augmentation de l'abondance de peptides phosphorylés (cas de PIP2;7 en condition de carence en phosphate).

- les sens de variation des taux de phosphorylation des résidus S277 et S283 sont toujours opposés, suggérant que l'un de ces deux sites est impliqué dans la régulation du taux de phosphorylation de l'autre. Au vu des résultats obtenus dans ce travail, il n'est pas possible de trancher sur l'identité du site dominant.

- des contextes qui, apparemment, impliquent une dégradation rapide (standard DEA-NO) et resynthèse rapide (DEA-NO) des aquaporines PIP ont été mis en évidence. Une implication du contenu en fer du milieu de culture a été suggérée, mais reste à démontrer.

- des peptides d'aquaporines TIPs présentent de fortes variations d'abondance en réponse au traitement salin (TIP2;3) ou DEA-NO (TIP1;2 et TIP2;2), soulevant la question du rôle des aquaporines du tonoplaste dans la régulation de la  $Lp_r$ .



L'approche menée sur une lignée invalidée pour *TIP2;3* suggère un rôle de cette aquaporine dans le transport d'eau racinaire et sa sensibilité au stress salin. De plus, l'approche de biochimie a montré que la variation d'abondance du peptide de l'extrémité N-terminale de cette aquaporine en réponse au stress salin ne semble pas liée à un événement de phosphorylation ni de glycosylation et un rôle de sa méthylation ou d'une autre MPT reste à démontrer.

Les modulations de la  $Lp_r$  en réponse à diverses contraintes environnementales sont donc très certainement d'origine multifactorielle, incluant une interaction entre les phosphorylations de l'extrémité C-terminale d'isoformes PIP racinaires majeures ( $PIP2;1/2;2/2;3$ ), une modulation de l'état de phosphorylation des aquaporines PIP1s et PIP2s, ainsi que la fonction d'aquaporines TIP. Ce dernier point révèle que la voie transvacuolaire constitue probablement un élément majeur du transport de l'eau au travers des cellules végétales.

## **.VI PERSPECTIVES A COURT TERME**

L'analyse (phospho)-protéomique quantitative des traitements  $H_2O_2$ , mannitol, carence nitrate et nutrition en molécules carbonées est en cours et permettra peut-être de mettre en évidence des variations cohérentes d'abondance de peptides et de sites modifiés au sein d'un même type de traitement (osmotique, oxydant ou nutritionnel). Par exemple, comme les traitements par le NaCl et le mannitol sont de nature osmotique et induisent une réponse similaire sur la  $Lp_r$  et sur l'abondance des aquaporines PIP1s et PIP2s, des mécanismes de régulation communs des aquaporines pourraient être révélés. L'étude protéomique de mon travail de thèse concernant spécifiquement les aquaporines est couplée à une étude phosphoprotéomique quantitative globale, qui traite de l'ensemble des autres protéines membranaires microsomaux et est menée par le groupe de M. Rossignol. L'objectif de cette étude est de révéler la dynamique des transporteurs membranaires des racines d'*Arabidopsis* dans les conditions environnementales décrites précédemment. Cette étude, presque achevée dans le cas du traitement salin, a permis d'identifier environ 1400 protéines dont 25 % sont phosphorylées. Parmi elles, 204 protéines sont des transporteurs et canaux (incluant les aquaporines) et 209 protéines ont été identifiées comme des protéines kinases appartenant à différentes familles. La classification hiérarchique des variations d'abondance des peptides phosphorylés en fonction de la cinétique de traitement salin permet de prédire des protéines kinases potentiellement responsables de la régulation de ces classes et conforte l'hypothèse que différentes classes de kinases sont impliquées de façon séquentielle dans la réponse au



traitement salin (étude dont je suis co-auteur, en cours de rédaction pour publication). Cette étude sera étendue dans les mois à venir à l'ensemble des traitements.

## **.VII PERSPECTIVES A MOYEN TERME**

### **.VII.1 Etudier l'effet d'un autre stress biotique sur la $Lp_r$**

Il apparaît que les contraintes étudiées dans ce travail de thèse et conduisant à une altération de la  $Lp_r$  sont de type abiotique ou nutritionnel, et non d'ordre biotique. On sait toutefois que les attaques par des pathogènes peuvent amener à de graves déséquilibres du statut hydrique des plantes. Par ailleurs, dans la mesure où l'acide salicylique induit une inhibition de la  $Lp_r$  [255] et qu'il s'agit d'une molécule impliquée dans la réponse aux pathogènes, on peut s'attendre à mesurer un effet sur la  $Lp_r$  de molécules perçue par la plante comme des signaux d'alerte dans une interaction pathogène. Dans le but d'inclure dans cette étude une contrainte biotique, il serait donc intéressant d'élargir nos analyses et de caractériser de possibles modulations de la  $Lp_r$  suite à l'application d'autres molécules de type MAMPs ou PAMPs, telles que la chitine ou les peptidoglycanes [216].

### **.VII.2 Comprendre l'effet du fer et du NO sur l'abondance des aquaporines PIP**

Les résultats suggérant une dégradation rapide (standard DEA-NO) et une resynthèse rapide (DEA-NO) des aquaporines PIP1s et PIP2s restent actuellement inexplicables. La dégradation a été observée dans un milieu dépourvu de fer, mais contenant 30 mM de NaCl du fait de la nécessité d'appliquer le DEA-NO, donneur de NO, en présence de tampon phosphate contenant du NaCl. De ce fait, il faudrait dans un premier temps s'assurer du rôle du fer dans ce processus de dégradation en quantifiant les aquaporines après traitement dans un milieu simplifié, où une stricte absence de fer pourra être testée. Dans l'hypothèse où les résultats obtenus confirmeraient l'impact du contenu en fer du milieu sur l'abondance des aquaporines, le mécanisme de dégradation de ces protéines devra être identifié. Nous évaluerons en particulier la possible ubiquitination des aquaporines PIP.

### **.VII.3 Les MPTs des aquaporines**

De nouveaux sites de phosphorylation ont été identifiés mais leur position exacte est parfois ambiguë. De ce fait, une première étape consistera à positionner ces sites de phosphorylation, par MS associée à une fragmentation de type ETD. Dans la mesure où les états de phosphorylation de l'extrémité N-terminale de PIP1;1/1;2 et du résidu S277 de l'extrémité C-terminale de PIP2;1/2;2/2;3 sont corrélés aux modulations de la  $Lp_r$ , nous tenterons



d'évaluer leur rôle. Pour cela, les sites d'intérêt devront être substitués par un résidu alanine ou acide aspartique de façon à mimer respectivement l'absence ou la présence constitutive de phosphorylation [54]. Ces protéines devront ensuite être exprimées en système hétérologue (ovocytes de xénope) dans le but d'étudier leur activité de transport d'eau. Obtenir des plantes exprimant de telles protéines, mutées et fusionnées à la GFP, devrait permettre, par imagerie confocale, d'étudier le rôle de ces MPTs dans la localisation sub-cellulaire de la protéine, en conditions standard et de traitement régulant l'état de phosphorylation de cette région (NaCl, standard DEA-NO et carence en phosphate). Plus particulièrement, concernant l'interaction entre les trois sites de phosphorylation de l'extrémité C-terminale de PIP2;1/2;2/2;3, la production de plantes exprimant des protéines portant une mutation ponctuelle sur le résidu S277 (S277A ou S277D) devrait permettre d'étudier l'impact de la phosphorylation de ce résidu sur l'état de phosphorylation des résidus S280 et S283. Des approches de quantification absolue par MRM permettront alors de quantifier l'abondance de chacune des quatre formes de cette extrémité (non modifiée, 1P sur S277, 1P sur S280, et 2P sur S280+S283). Il sera donc possible d'évaluer leurs proportions les unes par rapport aux autres. Enfin, nous savons déjà que la phosphorylation des résidus S280 et S283 de *AtPIP2;1* est impliquée respectivement dans le gating et la localisation sub-cellulaire de cette aquaporine [22, 54]. La connaissance du rôle de la phosphorylation de S277 devrait permettre de préciser les mécanismes moléculaires en jeu et leur importance respective dans la réponse aux contraintes environnementales étudiées.

Concernant les autres MPT identifiées, mais uniquement dans le cas où leur abondance est modifiée en réponse à un traitement, il faudra suivre les mêmes stratégies que celles décrites pour l'étude de la phosphorylation. Pour ce qui est de la méthylation de l'extrémité N-terminale de PIP1;1/1;2, il faudra, dans un premier temps, préciser la position de cette modification. Ensuite, les résidus méthylés d'intérêt devront être remplacés par un résidu alanine [38]. Enfin, concernant la déamidation, le résidu concerné devra être remplacé par un résidu alanine ou acide aspartique de façon à mimer respectivement l'absence ou la présence constitutive de déamidation [236].

#### **.VII.4 Rôle des aquaporines TIPS dans la *Lp<sub>r</sub>***

Ce travail de thèse suggère que TIP2;3 pourraient contribuer de façon directe et indirecte au transport d'eau racinaire. Afin de confirmer cette hypothèse, il faudra absolument disposer d'un second allèle de plantes mutées. Ensuite, plusieurs hypothèses pourront être envisagées concernant le rôle de TIP2;3 dans la diminution de la proportion de transport d'eau prise en



charge par les aquaporines PIPs : (1) l'activité intrinsèque de transport d'eau des aquaporines PIPs est inhibée, (2) leur localisation sub-cellulaire est modifiée ou (3) une dégradation de ces aquaporines a été induite. L'ensemble de ces hypothèses doivent être évaluées. D'autre part, identifier l'éventuelle MPT responsable de la variation d'abondance du peptide de l'extrémité N-terminale de TIP2;3, dans le cas du traitement des plantes par le NaCl, devrait permettre d'identifier un nouveau mécanisme de régulation de la  $Lp_r$ .



## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



1. Dobra, J., V. Motyka, P. Dobrev, *et al.*, *Comparison of hormonal responses to heat, drought and combined stress in tobacco plants with elevated proline content*. J. Plant Physiol., 2010. **167**(16): p. 1360-70.
2. Jackson, M.B., L.R. Saker, C.M. Crisp, *et al.*, *Ionic and pH signalling from roots to shoots of flooded tomato plants in relation to stomatal closure*. Plant and Soil, 2003. **253**: p. 103-113.
3. Steudle, E. and C.A. Peterson, *How does water get through roots?* J. Exp. Bot., 1998. **49**: p. 775-788.
4. Lopez-Bucio, J., A. Cruz-Ramirez, and L. Herrera-Estrella, *The role of nutrient availability in regulating root architecture*. Curr. Opin. Plant Biol., 2003. **6**(3): p. 280-7.
5. Gojon, A., P. Nacry, and J.C. Davidian, *Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants*. Curr. Opin. Plant Biol., 2009. **12**(3): p. 328-38.
6. Singh, L.P., S.S. Gill, and N. Tuteja, *Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance*. Plant Signal. Behav., 2011. **6**(2): p. 175-91.
7. Maurel, C. and C. Plassard, *Aquaporins: for more than water at the plant-fungus interface?* New Phytol., 2011. **190**(4): p. 815-7.
8. Filleur, S., M.F. Dorbe, M. Cerezo, *et al.*, *An arabidopsis T-DNA mutant affected in Nrt2 genes is impaired in nitrate uptake*. FEBS Lett., 2001. **489**(2-3): p. 220-4.
9. Liu, K.H. and Y.F. Tsay, *Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation*. Embo J., 2003. **22**(5): p. 1005-13.
10. Javot, H. and C. Maurel, *The role of aquaporins in root water uptake*. Annals Bot., 2002. **90**: p. 301-313.
11. Johanson, U., M. Karlsson, I. Johansson, *et al.*, *The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in Arabidopsis provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants*. Plant Physiol., 2001. **126**: p. 1-12.
12. Chaumont, F., F. Barrieu, E. Wojcik, *et al.*, *Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize*. Plant Physiol., 2001. **125**: p. 1206-1215.
13. Sakurai, J., F. Ishikawa, T. Yamaguchi, *et al.*, *Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function*. Plant Cell Physiol., 2005. **46**(9): p. 1568-1577.
14. Gustavsson, S., A.S. Lebrun, K. Norden, *et al.*, *A novel plant major intrinsic protein in Physcomitrella patens most similar to bacterial glycerol channels*. Plant Physiol., 2005. **139**(1): p. 287-95.
15. Danielson, J.A. and U. Johanson, *Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss Physcomitrella patens*. BMC Plant Biol., 2008. **8**: p. 45.
16. Maurel, C., L. Verdoucq, D.-T. Luu, *et al.*, *Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions*. Annu. Rev. Plant Biol., 2008. **59**: p. 595-624.
17. Zardoya, R. and S. Villalba, *A phylogenetic framework for the aquaporin family in eukaryotes*. J. Mol. Evol., 2001. **52**: p. 391-404.
18. Kruse, E., N. Uehlein, and R. Kaldenhoff, *The aquaporins*. Genome Biol., 2006. **7**(2): p. 206.
19. Jung, J.S., G.M. Preston, B.L. Smith, *et al.*, *Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model*. J. Biol. Chem., 1994. **269**(20): p. 14648-14654.
20. Chrispeels, M.J. and P. Agre, *Aquaporins: water channel proteins of plant and animal cells*. Trends Biochem. Sci., 1994. **19**(10): p. 421-425.
21. Daniels, M.J., M.J. Chrispeels, and M. Yeager, *Projection structure of a plant vacuole membrane aquaporin by electron cryo-crystallography*. J. Mol. Biol., 1999. **294**(5): p. 1337-49.

22. Tornroth-Horsefield, S., Y. Wang, K. Hedfalk, *et al.*, *Structural mechanism of plant aquaporin gating*. *Nature*, 2006. **439**: p. 688-694.
23. Wallace, I.S. and D.M. Roberts, *Homology modeling of representative subfamilies of Arabidopsis Major Intrinsic proteins. Classification based on the aromatic/Arginine selectivity filter*. *Plant Physiol.*, 2004. **135**: p. 1059-1068.
24. Wallace, I.S. and D.M. Roberts, *Distinct transport selectivity of two structural subclasses of the nodulin-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporin channels*. *Biochemistry*, 2005. **44**: p. 16826-16834.
25. Biela, A., K. Grote, B. Otto, *et al.*, *The Nicotiana tabacum plasma membrane aquaporin NtAQPI is mercury-insensitive and permeable for glycerol*. *Plant J.*, 1999. **18**: p. 565-570.
26. Gerbeau, P., G. Amodeo, T. Henzler, *et al.*, *The water permeability of Arabidopsis plasma membrane is regulated by divalent cations and pH*. *Plant J.*, 2002. **30**: p. 71-81.
27. Rivers, R.L., R.M. Dean, G. Chandy, *et al.*, *Functional analysis of nodulin 26, an aquaporin in soybean root symbiosomes*. *J. Biol. Chem.*, 1997. **272**: p. 16256-16261.
28. Holm, L.M., T.P. Jahn, A.L. Moller, *et al.*, *NH<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> permeability in aquaporin-expressing Xenopus oocytes*. *Pflugers Arch.*, 2005. **450**(6): p. 415-28.
29. Takano, J., M. Wada, U. Ludewig, *et al.*, *The Arabidopsis major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation*. *Plant Cell*, 2006. **18**(6): p. 1498-1509.
30. Choi, W.-G. and D.M. Roberts, *Arabidopsis NIP2;1, a Major Intrinsic Protein transporter of lactic acid induced by anoxic stress*. *J. Biol. Chem.*, 2007. **282**(33): p. 24209-24218.
31. Ma, J.F., K. Tamai, N. Yamaji, *et al.*, *A silicon transporter in rice*. *Nature*, 2006. **440**(30): p. 688-691.
32. Uehlein, N., C. Lovisolo, F. Siefritz, *et al.*, *The tobacco aquaporin NtAQPI is a membrane CO<sub>2</sub> pore with physiological functions*. *Nature*, 2003. **425**: p. 734-737.
33. Bienert, G.P., A.L. Moller, K.A. Kristiansen, *et al.*, *Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes*. *J. Biol. Chem.*, 2007. **282**(2): p. 1183-1192.
34. Fotiadis, D., P. Jenös, T. Mini, *et al.*, *Structural characterization of two aquaporins isolated from native spinach leaf plasma membranes*. *J. Biol. Chem.*, 2001. **276**: p. 1707-1714.
35. Harvengt, P., A. Vlerick, B. Fuks, *et al.*, *Lentil seed aquaporins form a hetero-oligomer which is phosphorylated by a Mg<sup>2+</sup>-dependant and Ca<sup>2+</sup>-regulated kinase*. *Biochem. J.*, 2000. **352**: p. 183-190.
36. Johansson, I., M. Karlsson, V.K. Shukla, *et al.*, *Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation*. *Plant Cell*, 1998. **10**: p. 451-459.
37. Santoni, V., J. Vinh, D. Pflieger, *et al.*, *A proteomic study reveals novel insights into the diversity of aquaporin forms expressed in the plasma membrane of plant roots*. *Biochem. J.*, 2003. **373**: p. 289-296.
38. Santoni, V., L. Verdoucq, N. Sommerer, *et al.*, *Methylation of aquaporins in plant plasma membrane*. *Biochem. J.*, 2006. **400**(1): p. 189-197.
39. Daniels, M.J. and M. Yeager, *Phosphorylation of aquaporin PvTIP3;1 defined by mass spectrometry and molecular modeling*. *Biochemistry*, 2005. **44**: p. 14443-14454.
40. Meinnel, T., P. Peynot, and C. Giglione, *Processed N-termini of mature proteins in higher eukaryotes and their major contribution to dynamic proteomics*. *Biochimie*, 2005.

41. Martinez, A., J.A. Traverso, B. Valot, *et al.*, *Extent of N-terminal modifications in cytosolic proteins from eukaryotes*. *Proteomics*, 2008. **8**(14): p. 2809-31.
42. Miao, G.-H., Z. Hong, and D.P.S. Verma, *Topology and phosphorylation of soybean nodulin-26, an intrinsic protein of the peribacteroid membrane*. *J. Cell Biol.*, 1992. **118**: p. 481-490.
43. Weaver, C.D. and D.M. Roberts, *Determination of the site of phosphorylation of nodulin 26 by the calcium-dependent protein kinase from soybean nodules*. *Biochemistry*, 1992. **31**: p. 8954-8959.
44. Johansson, I., C. Larsson, B. Ek, *et al.*, *The major integral proteins of spinach leaf plasma membranes are putative aquaporins and are phosphorylated in response to Ca<sup>2+</sup> and apoplastic water potential*. *Plant Cell*, 1996. **8**: p. 1181-1191.
45. Nuhse, T.S., A.R. Bottrill, A.M. Jones, *et al.*, *Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses*. *Plant J.*, 2007. **51**(5): p. 931-40.
46. Nühse, T.S., A. Stensballe, O.N. Jensen, *et al.*, *Phosphoproteomics of the Arabidopsis plasma membrane and a new phosphorylation site database*. *Plant Cell*, 2004. **16**: p. 2394-2405.
47. Nühse, T.S., A. Stensballe, O.N. Jensen, *et al.*, *Large-scale analysis of in vivo phosphorylated membrane proteins by immobilized metal ion affinity chromatography and mass spectrometry*. *Mol. Cell. Proteomics*, 2003. **2**(11): p. 1234-1243.
48. Guenther, J.F., N. Chanmanivone, M.P. Galetovic, *et al.*, *Phosphorylation of soybean nodulin 26 on serine 262 enhances water permeability and is regulated developmentally and by osmotic signals*. *Plant Cell*, 2003. **15**: p. 981-991.
49. Whiteman, S.A., T.S. Nühse, D.A. Ashford, *et al.*, *A proteomic and phosphoproteomic analysis of Oryza sativa plasma membrane and vacuolar membrane*. *Plant J.*, 2008. **56**: p. 146-156.
50. Whiteman, S.A., L. Serazetdinova, A.M. Jones, *et al.*, *Identification of novel proteins and phosphorylation sites in a tonoplast enriched membrane fraction of Arabidopsis thaliana*. *Proteomics*, 2008. **8**(17): p. 3536-3547.
51. Niittylä, T., A.T. Fuglsang, M.G. Palmgren, *et al.*, *Temporal analysis of sucrose-induced phosphorylation changes in plasma membrane proteins of Arabidopsis*. *Mol. Cell. Proteomics*, 2007. **6**(10): p. 1711-1726.
52. Benschop, J.J., S. Mohammed, M. O'flaherty, *et al.*, *Quantitative phospho-proteomics of early elicitor signalling in Arabidopsis*. *Mol. Cell. Proteomics*, 2007.
53. Hem, S., V. Rofidal, N. Sommerer, *et al.*, *Novel subsets of the Arabidopsis plasmalemma phosphoproteome identify phosphorylation sites in secondary active transporters*. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 2007. **363**: p. 375-380.
54. Prak, S., S. Hem, J. Boudet, *et al.*, *Multiple phosphorylations in the C-terminal tail of plant plasma membrane aquaporins. Role in sub-cellular trafficking of AtPIP2;1 in response to salt stress*. *Mol. Cell. Proteomics*, 2008. **7**(6): p. 1019-1030.
55. Van Wilder, V., U. Miecielica, H. Degand, *et al.*, *Maize plasma membrane aquaporins belonging to the PIP1 and PIP2 subgroups are in vivo phosphorylated*. *Plant Cell Physiol.*, 2008. **49**(9): p. 1364-77.
56. Hsu, J.L., L.Y. Wang, S.Y. Wang, *et al.*, *Functional phosphoproteomic profiling of phosphorylation sites in membrane fractions of salt-stressed Arabidopsis thaliana*. *Proteome Sci.*, 2009. **7**: p. 42.
57. Jones, A.M., D. MacLean, D.J. Studholme, *et al.*, *Phosphoproteomic analysis of nuclei-enriched fractions from Arabidopsis thaliana*. *J. Proteomics*, 2009. **72**(3): p. 439-51.

58. Reiland, S., G. Messerli, K. Baerenfaller, *et al.*, *Large-scale Arabidopsis phosphoproteome profiling reveals novel chloroplast kinase substrates and phosphorylation networks*. *Plant Physiol.*, 2009. **150**(2): p. 889-903.
59. Kline, K.G., G.A. Barrett-Wilt, and M.R. Sussman, *In planta changes in protein phosphorylation induced by the plant hormone abscisic acid*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010. **107**(36): p. 15986-15991.
60. Endler, A., S. Reiland, B. Gerrits, *et al.*, *In vivo phosphorylation sites of barley tonoplast proteins identified by a phosphoproteomic approach*. *Proteomics*, 2009. **9**(2): p. 310-21.
61. Amezcua-Romero, J.C., O. Pantoja, and R. Vera-Estrella, *Ser123 is essential for the water channel activity of McPIP2;1 from Mesembryanthemum crystallinum*. *J. Biol. Chem.*, 2010. **285**(22): p. 16739-47.
62. Temmei, Y., S. Uchida, D. Hoshino, *et al.*, *Water channel activities of Mimosa pudica plasma membrane intrinsic proteins are regulated by direct interaction and phosphorylation*. *FEBS Lett.*, 2005. **579**: p. 4417-4422.
63. Maurel, C., R.T. Kado, J. Guern, *et al.*, *Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin alpha-TIP*. *EMBO J.*, 1995. **14**: p. 3028-3035.
64. Fetter, K., V. Van Wilder, M. Moshelion, *et al.*, *Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity*. *Plant Cell*, 2004. **16**: p. 215-228.
65. Zelazny, E., J.W. Borst, M. Muylaert, *et al.*, *FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007. **104**(30): p. 12359-12364.
66. Zelazny, E., U. Micielica, J.W. Borst, *et al.*, *An N-terminal diacidic motif is required for the trafficking of maize aquaporins ZmPIP2;4 and ZmPIP2;5 to the plasma membrane*. *Plant J.*, 2009. **57**(2): p. 346-355.
67. Sorieul, M., V. Santoni, C. Maurel, *et al.*, *Mechanisms and effects of retention of over-expressed aquaporin AtPIP2;1 in the endoplasmic reticulum*. *Traffic*, 2010. **12**(4): p. 473-82.
68. Vera-Estrella, R., B.J. Barkla, H.J. Bonhert, *et al.*, *Novel regulation of aquaporins during osmotic stress*. *Plant Physiol.*, 2004. **135**: p. 2318-2329.
69. Sahr, T., T. Adam, C. Fizames, *et al.*, *O-carboxyl- and N-methyltransferases active on plant aquaporins*. *Plant Cell Physiol.*, 2010. **51**(12): p. 2092-104.
70. Lee, H.K., S.K. Cho, O. Son, *et al.*, *Drought stress-induced Rma1H1, a RING membrane-anchor E3 ubiquitin ligase homolog, regulates aquaporin levels via ubiquitination in transgenic Arabidopsis plants*. *Plant Cell*, 2009. **21**(2): p. 622-41.
71. Alexandersson, E., L. Fraysse, S. Sjøvall-Larsen, *et al.*, *Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins*. *Plant Mol. Biol.*, 2005. **59**(3): p. 469-484.
72. Hachez, C., M. Moshelion, E. Zelazny, *et al.*, *Localization and quantification of plasma membrane aquaporin expression in maize primary root: a clue to understanding their role as cellular plumbers*. *Plant Mol. Biol.*, 2006. **62**(1-2): p. 305-23.
73. Jang, J.Y., D.G. Kim, Y.O. Kim, *et al.*, *An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, 2004. **54**(5): p. 713-725.
74. Birnbaum, K., D.E. Shasha, J.Y. Wang, *et al.*, *A gene expression map of the Arabidopsis root*. *Science*, 2003. **302**(5652): p. 1956-60.

75. Maggio, A. and R.J. Joly, *Effects of mercuric chloride on the hydraulic conductivity of tomato root systems. Evidence for a channel-mediated water pathway*. Plant Physiol., 1995. **109**: p. 331-335.
76. Carvajal, M., D.T. Cooke, and D.T. Clarkson, *Responses of wheat plants to nutrient deprivation may involve the regulation of water-channel function*. Planta, 1996. **199**: p. 372-381.
77. Carvajal, M., V. Martinez, and C.F. Alcaraz, *Physiological function of water channels as affected by salinity in roots of paprika pepper*. Physiol. Plant., 1999. **105**: p. 95-101.
78. Tazawa, M., E. Ohkuma, M. Shibasaka, *et al.*, *Mercurial-sensitive water transport in barley roots*. J. Plant Res., 1997. **110**: p. 435-442.
79. Amodeo, G., R. Dorr, A. Vallejo, *et al.*, *Radial and axial water transport in the sugar beet storage root*. J. Exp. Bot., 1999. **50**: p. 509-516.
80. Martre, P., G.B. North, and P.S. Nobel, *Hydraulic conductance and mercury-sensitive water transport for roots of Opuntia acanthocarpa in relation to soil drying and rewetting*. Plant Physiol., 2001. **126**: p. 352-362.
81. Barrowclough, D.E., C.A. Peterson, and E. Steudle, *radial hydraulic conductivity along developing onion roots*. J. Exp. Bot., 2000. **51**: p. 547-557.
82. Carvajal, M., A. Cerda, and V. Martinez, *Does calcium ameliorate the negative effect of NaCl on melon root water transport by regulating aquaporin activity?* New Phytol., 2000. **145**: p. 439-447.
83. Sutka, M., G. Li, J. Boudet, *et al.*, *Natural variation of root hydraulics in Arabidopsis grown in normal and salt-stressed conditions*. Plant Physiol., 2011. **155**(3): p. 1264-76.
84. Siefritz, F., M.T. Tyree, C. Lovisolo, *et al.*, *PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to functions in plants*. Plant Cell, 2002. **14**: p. 869-876.
85. Kaldenhoff, R., K. Grote, J.-J. Zhu, *et al.*, *Significance of plasmalemma aquaporins for water-transport in Arabidopsis thaliana*. Plant J., 1998. **14**: p. 121-128.
86. Martre, P., R. Morillon, F. Barrieu, *et al.*, *Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit*. Plant Physiol., 2002. **130**: p. 2101-2110.
87. Javot, H., V. Lauvergeat, V. Santoni, *et al.*, *Role for a single aquaporin isoform in root water uptake*. Plant Cell, 2003. **15**: p. 509-522.
88. Postaire, O., C. Tournaire-Roux, A. Grondin, *et al.*, *A PIP1 aquaporin contributes to hydrostatic pressure-induced water transport in both the root and rosette of Arabidopsis*. Plant Physiol., 2010. **152**(3): p. 1418-30.
89. Katsuhara, M., K. Koshio, M. Shibasaka, *et al.*, *Over-expression of a barley aquaporin increased the shoot/root ratio and raised salt sensitivity in transgenic rice plants*. Plant Cell Physiol., 2003. **44**(12): p. 1378-83.
90. Lian, H.L., X. Yu, Q. Ye, *et al.*, *The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice*. J. Plant Physiol., 2004. **45**: p. 481-489.
91. Peng, Y., W. Lin, W. Cai, *et al.*, *Overexpression of a Panax ginseng tonoplast aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimation ability in transgenic Arabidopsis plants*. Planta, 2007.
92. Sade, N., B.J. Vinocur, A. Diber, *et al.*, *Improving plant stress tolerance and yield production: is the tonoplast aquaporin SITIP2;2 a key to isohydric to anisohydric conversion?* New Phytol., 2009. **181**: p. 651-661.
93. Wang, X., Y. Li, W. Ji, *et al.*, *A novel Glycine soja tonoplast intrinsic protein gene responds to abiotic stress and depresses salt and dehydration tolerance in transgenic Arabidopsis thaliana*. J. Plant Physiol., 2011. **168**(11): p. 1241-8.

94. Zimmermann, H.M. and E. Steudle, *Apoplastic transport across young maize roots: effect of the exodermis*. *Planta*, 1998. **206**(1): p. 7-19.
95. Scott, I.M., S.M. Clarke, J.E. Wood, *et al.*, *Salicylate accumulation inhibits growth at chilling temperature in Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 2004. **135**(2): p. 1040-9.
96. Shah, J., *The salicylic acid loop in plant defense*. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2003. **6**(4): p. 365-71.
97. Mori, I.C., R. Pinontoan, T. Kawano, *et al.*, *Involvement of superoxide generation in salicylic acid-induced stomatal closure in Vicia faba*. *Plant Cell Physiol.*, 2001. **42**(12): p. 1383-8.
98. Boursiac, Y., J. Boudet, O. Postaire, *et al.*, *Stimulus-induced down-regulation of root water transport involves reactive oxygen species cell signalling and plasma membrane intrinsic protein internalization*. *Plant J.*, 2008. **56**(2): p. 207-218.
99. Volobueva, O., G. Velikanov, and F. Baluska, *Regulation of intercellular water exchange in various zones of maize root under stresses*. *Rus. J. Plant Physiol.*, 2004. **51**: p. 676-683.
100. Zhang, J., X. Zhang, and J. Liang, *Exudation rate of hydraulic conductivity of maize roots are enhanced by soil drying and abscisic acid treatment*. *New Phytol.*, 1995. **131**: p. 329-336.
101. Hose, E., E. Steudle, and W. Hartung, *Abscisic acid and hydraulic conductivity of maize roots: a study using cell- and root-pressure probes*. *Planta*, 2000. **211**(6): p. 874-882.
102. Aroca, R., A. Ferrante, P. Vernieri, *et al.*, *Drought, abscisic acid and transpiration rate effects on the regulation of PIP aquaporin gene expression and abundance in Phaseolus vulgaris plants*. *Ann. Bot.*, 2006. **98**(6): p. 1301-10.
103. Mahdieh, M. and A. Mostajeran, *Abscisic acid regulates root hydraulic conductance via aquaporin expression modulation in Nicotiana tabacum*. *J. Plant Physiol.*, 2009. **166**(18): p. 1993-2003.
104. Ruiz-Lozano, J.M., M. del Mar Alguacil, G. Barzana, *et al.*, *Exogenous ABA accentuates the differences in root hydraulic properties between mycorrhizal and non mycorrhizal maize plants through regulation of PIP aquaporins*. *Plant Mol. Biol.*, 2009. **70**(5): p. 565-79.
105. Aroca, R., P. Vernieri, J. Irigoyen, *et al.*, *Involvement of abscisic acid in leaf and root of maize (Zea mays L.) in avoiding chilling-induced water stress*. *Plant Science*, 2003. **165**: p. 671-679.
106. Wan, X. and J.J. Zwiazek, *Root water flow and leaf stomatal conductance in aspen (Populus tremuloides) seedlings treated with abscisic acid*. *Planta*, 2001. **213**(5): p. 741-7.
107. Simonneau, T., P. Barrieu, and F. Tardieu, *Accumulation rate of ABA in detached maize roots correlated with root water potential regardless of age and branching order*. *Plant, Cell and Environment*, 1998. **21**: p. 1113-1122.
108. Olivella, C., C. Biel, M. Vendrell, *et al.*, *Hormonal and physiological responses of Gerbera jamesonii to flooding stress*. *HortScience*, 2000. **35**: p. 222-225.
109. Jia, W., Y. Wang, S. Zhang, *et al.*, *Salt-stress-induced ABA accumulation is more sensitively triggered in roots than in shoots*. *J Exp Bot*, 2002. **53**(378): p. 2201-6.
110. Aroca, R., R. Porcel, and J.M. Ruiz-Lozano, *Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions*. *J Exp Bot*, 2011(14).
111. Tournaire-Roux, C., M. Sutka, H. Javot, *et al.*, *Gating of aquaporins by cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress*. *Nature*, 2003. **425**: p. 393-397.

112. Verdoucq, L., A. Grondin, and C. Maurel, *Structure-function analysis of plant aquaporin AtPIP2;1 gating by divalent cations and protons*. *Biochem J*, 2008. **415**(3): p. 409-16.
113. Liu, F., T. Vantoai, L.P. Moy, *et al.*, *Global transcription profiling reveals comprehensive insights into hypoxic response in Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2005. **137**(3): p. 1115-29.
114. North, G.B., P. Martre, and P.S. Nobel, *Aquaporins account for variations in hydraulic conductance for metabolically active root regions of Agave deserti in wet, dry, and rewetted soil*. *Plant Cell Environment*, 2004. **27**: p. 219-228.
115. Boursiac, Y., S. Chen, D.-T. Luu, *et al.*, *Early effects of salinity on water transport in Arabidopsis roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression*. *Plant Physiol.*, 2005. **139**: p. 790-805.
116. Shangguan, Z., L.T.W. Wenzhao, M. Shao, *et al.*, *Effects of Phosphorus Nutrient on the Hydraulic Conductivity of Sorghum (Sorghum vulgare Pers.) Seedling Roots Under Water Deficiency*. *J. Integrative Plant Biol.*, 2005. **47**: p. 421-427.
117. Tyerman, S.D., C.M. Niemietz, and H. Bramley, *Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles*. *Plant Cell Environ.*, 2002. **25**: p. 173-194.
118. Moshelion, M., N. Moran, and F. Chaumont, *Dynamic changes in the osmotic water permeability of protoplast plasma membrane*. *Plant Physiol.*, 2004. **135**(4): p. 2301-17.
119. Shope, J.C. and K.A. Mott, *Membrane trafficking and osmotically induced volume changes in guard cells*. *J. Exp. Bot.*, 2006. **57**(15): p. 4123-31.
120. Peyrano, G., E. Taleisnik, M. Quiroga, *et al.*, *Salinity effects on hydraulic conductance, lignin content and peroxydase activity in tomato roots*. *Plant Physiol. Biochem.*, 1997. **35**(1-17).
121. Horie, T., T. Kaneko, G. Sugimoto, *et al.*, *Mechanisms of water transport mediated by PIP aquaporins and their regulation via phosphorylation events under salinity stress in barley roots*. *Plant Cell Physiol.*, 2011. **52**(4): p. 663-75.
122. Muries, B., M. Faize, M. Carvajal, *et al.*, *Identification and differential induction of the expression of aquaporins by salinity in broccoli plants*. *Mol. Biosyst.*, 2011. **7**(4): p. 1322-35.
123. Martinez-Ballestra, M.C., F. Aparicio, V. Pallas, *et al.*, *Influence of saline stress on root hydraulic conductance and PIP expression in Arabidopsis*. *J. Plant Physiol.*, 2003. **160**: p. 689-697.
124. Maathuis, F.J., V. Filatov, P. Herzyk, *et al.*, *Transcriptome analysis of root transporters reveals participation of multiple gene families in the response to cation stress*. *Plant J.*, 2003. **35**(6): p. 675-692.
125. Zhu, C., D. Schraut, W. Hartung, *et al.*, *Differential responses of maize MIP genes to salt stress and ABA*. *J. Exp. Bot.*, 2005. **56**(421): p. 2971-2981.
126. Monneuse, J.M., M. Sugano, T. Becue, *et al.*, *Towards the profiling of the Arabidopsis thaliana plasma membrane transportome by targeted proteomics*. *Proteomics*, 2011. **11**(9): p. 1789-97.
127. Saito, C., T. Ueda, H. Abe, *et al.*, *A complex and mobile structure forms a distinct subregion within the continuous vacuolar membrane in young cotyledons of Arabidopsis*. *Plant J.*, 2002. **29**(3): p. 245-255.
128. Henzler, T., R.N. Waterhouse, A.J. Smyth, *et al.*, *Diurnal variations in hydraulic conductivity and root pressure can be correlated with the expression of putative aquaporins in the roots of Lotus japonicus*. *Planta*, 1999. **210**: p. 50-60.

129. Lopez, F., A. Bousser, I. Sissoeff, *et al.*, *Diurnal regulation of water transport and aquaporin gene expression in maize roots: contribution of PIP2 proteins*. *Plant Cell Physiol.*, 2003. **44**(12): p. 1384-1395.
130. Hachez, C., D. Veselov, Q. Ye, *et al.*, *Short-term control of maize cell and root water permeability through plasma membrane aquaporin isoforms*. *Plant Cell Environ.*, 2011.
131. Vera-Estrella, R., B. Barkla, J. Amezcua-Romero, *et al.*, *Day/night regulation of aquaporins during the CAM cycle in Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Cell Environ.*, 2011. **34**.
132. Sakurai-Ishikawa, J.M.-H., M., H. Hayashi, A. Ahamed, *et al.*, *Transpiration from shoots triggers diurnal changes in root aquaporin expression*. *Plant Cell Environ.*, 2011. **34**(7): p. 1150-1163.
133. Aroca, R., G. Amodeo, S. Fernandez-Illescas, *et al.*, *The role of aquaporins and membrane damage in chilling and hydrogen peroxide induced changes in the hydraulic conductance of maize roots*. *Plant Physiol.*, 2005. **137**(1): p. 341-53.
134. Yu, X., Y.H. Peng, M.H. Zhang, *et al.*, *Water relations and an expression analysis of plasma membrane intrinsic proteins in sensitive and tolerant rice during chilling and recovery*. *Cell Res.*, 2006. **16**(6): p. 599-608.
135. Lee, S.H., A.P. Singh, and G.C. Chung, *Rapid accumulation of hydrogen peroxide in cucumber roots due to exposure to low temperature appears to mediate decreases in water transport*. *J. Exp. Bot.*, 2004. **55**: p. 1733-1741.
136. Clarkson, D.T., M. Carvajal, T. Henzler, *et al.*, *Root hydraulic conductance: diurnal aquaporin expression and the effects of nutrient stress*. *J. Exp. Bot.*, 2000. **51**(342): p. 61-70.
137. Cramer, M.D., H.J. Hawkins, and G.A. Verboom, *The importance of nutritional regulation of plant water flux*. *Oecologia*, 2009. **161**(1): p. 15-24.
138. Gloser, V., M.A. Zwieniecki, C.M. Orians, *et al.*, *Dynamic changes in root hydraulic properties in response to nitrate availability*. *J. Exp. Bot.*, 2007. **10**: p. 2409-2415.
139. Prosser, I.M., A. Massonneau, A.J. Smyth, *et al.*, *Nitrate assimilation in the forage legume Lotus japonicus L*. *Planta*, 2006. **223**(4): p. 821-34.
140. Gorska, A., Q. Ye, N.M. Holbrook, *et al.*, *Nitrate control of root hydraulic properties in plants: translating local information to whole plant response*. *Plant Physiol.*, 2008. **148**(2): p. 1159-67.
141. Gorska, A., A. Zwieniecka, N.M. Holbrook, *et al.*, *Nitrate induction of root hydraulic conductivity in maize is not correlated with aquaporin expression*. *Planta*, 2008. **228**(6): p. 989-98.
142. Wang, Y.H., D.F. Garvin, and L.V. Kochian, *Nitrate-induced genes in tomato roots. Array analysis reveals novel genes that may play a role in nitrogen nutrition*. *Plant Physiol.*, 2001. **127**(1): p. 345-59.
143. Radin, J.W. and M.P. Eidenbock, *Hydraulic conductance as a factor limiting leaf expansion of phosphorus-deficient cotton plants*. *Plant Physiol.*, 1984. **75**(2): p. 372-7.
144. Liu, H., W. Sun, W. Su, *et al.*, *Co-regulation of water channels and potassium channels in rice*. *Physiol. Plant.*, 2006. **128**: p. 58-69.
145. Shin, R. and D.P. Schachtman, *Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004. **101**(23): p. 8827-32.
146. Apel, K. and H. Hirt, *Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction*. *Annu Rev Plant Biol*, 2004. **55**: p. 373-99.
147. Bailey-Serres, J. and R. Mittler, *The roles of reactive oxygen species in plant cells*. *Plant Physiol.*, 2006. **141**(2): p. 311.

148. Ye, Q. and E. Steudle, *Oxidative gating of water channels (aquaporins) in corn roots*. Plant Cell Environ, 2006. **29**(4): p. 459-70.
149. Benabdellah, K., J.M. Ruiz-Lozano, and R. Aroca, *Hydrogen peroxide effects on root hydraulic properties and plasma membrane aquaporin regulation in Phaseolus vulgaris*. Plant Mol. Biol., 2009. **70**(6): p. 647-61.
150. Hooijmaijers, C., J.Y. Rhee, K.J. Kwak, *et al.*, *Hydrogen peroxide permeability of plasma membrane aquaporins of Arabidopsis thaliana*. J. Plant Res., 2011.
151. Tamas, L., I. Mistrik, J. Huttova, *et al.*, *Role of reactive oxygen species-generating enzymes and hydrogen peroxide during cadmium, mercury and osmotic stresses in barley root tip*. Planta, 2010. **231**(2): p. 221-31.
152. Delledonne, M., *NO news is good news for plants*. Curr. Opin. Plant. Biol., 2005. **8**(4): p. 390-6.
153. Courtois, C., A. Besson, J. Dahan, *et al.*, *Nitric oxide signalling in plants: interplays with Ca<sup>2+</sup> and protein kinases*. J. Exp. Bot., 2008. **59**(2): p. 155-63.
154. Lindermayr, C., G. Saalbach, and J. Durner, *Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis*. Plant Physiol., 2005. **137**(3): p. 921-30.
155. Grun, S., C. Lindermayr, S. Sell, *et al.*, *Nitric oxide and gene regulation in plants*. J. Exp. Bot., 2006. **57**: p. 507-516.
156. Zhao, M.G., Q.Y. Tian, and W.H. Zhang, *Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in Arabidopsis*. Plant Physiol., 2007. **144**(1): p. 206-17.
157. Delledonne, M., J. Zeier, A. Marocco, *et al.*, *Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001. **98**(23): p. 13454-9.
158. Jih, P.J., Y.C. Chen, and S.T. Jeng, *Involvement of hydrogen peroxide and nitric oxide in expression of the ipomoelin gene from sweet potato*. Plant Physiol., 2003. **132**(1): p. 381-9.
159. Bright, J., R. Desikan, J.T. Hancock, *et al.*, *ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis*. Plant J., 2006. **45**(1): p. 113-22.
160. Arcondeguy, T., I. Huez, J. Fourment, *et al.*, *Symbiotic nitrogen fixation does not require adenylation of glutamine synthetase I in Rhizobium meliloti*. FEMS Microbiol. Lett., 1996. **145**(1): p. 33-40.
161. Wallace, I.S., W.G. Choi, and D.M. Roberts, *The structure, function and regulation of the nodulin 26-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporins*. Biochim. Biophys. Acta, 2006. **1758**: p. 1165-1175.
162. Hwang, J.H., S.R. Ellingson, and D.M. Roberts, *Ammonia permeability of the soybean nodulin 26 channel*. FEBS Lett., 2010. **584**(20): p. 4339-43.
163. Uehlein, N., K. Fileschi, M. Eckert, *et al.*, *Arbuscular mycorrhizal symbiosis and plant aquaporin expression*. Phytochem., 2007. **68**(1): p. 122-129.
164. Marjanovic, Z., N. Uehlein, R. Kaldenhoff, *et al.*, *Aquaporins in poplar: what a difference a symbiont makes!* Planta, 2005. **222**(2): p. 258-68.
165. Aroca, R., R. Porcel, and J.M. Ruiz-Lozano, *How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in Phaseolus vulgaris under drought, cold or salinity stresses*. New Phytol., 2007. **173**(4): p. 808-819.
166. Opperman, C.H., C.G. Taylor, and M.A. Conkling, *Root-knot nematode-directed expression of a plant root-specific gene*. Science, 1994. **263**: p. 221-223.

167. Werner, M., N. Uehlein, P. Proksch, *et al.*, *Characterization of two tomato aquaporins and expression during the incompatible interaction of tomato with the plant parasite *Cuscuta reflexa**. *Planta*, 2001. **213**: p. 550-555.
168. Han, X., A. Aslanian, and J.R. Yates, 3rd, *Mass spectrometry for proteomics*. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2008. **12**(5): p. 483-90.
169. Macek, B., M. Mann, and J.V. Olsen, *Global and site-specific quantitative phosphoproteomics: principles and applications*. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2009. **49**: p. 199-221.
170. Zhu, W., J.W. Smith, and C.M. Huang, *Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics*. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2010. **2010**: p. 840518.
171. Liu, H., R.G. Sadygov, and J.R. Yates, 3rd, *A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics*. *Anal. Chem.*, 2004. **76**(14): p. 4193-201.
172. Pasa-Tolic, L., M.S. Lipton, C.D. Masselon, *et al.*, *Gene expression profiling using advanced mass spectrometric approaches*. *J. Mass Spectrom.*, 2002. **37**(12): p. 1185-98.
173. Bantscheff, M., M. Schirle, G. Sweetman, *et al.*, *Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review*. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007. **389**(4): p. 1017-31.
174. Oda, Y., K. Huang, F.R. Cross, *et al.*, *Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999. **96**(12): p. 6591-6.
175. Ong, S.-E., G. Mittler, and M. Mann, *Identifying and quantifying in vivo methylation sites by heavy metal SILAC*. *Nat. Methods*, 2004. **1**(2): p. 19-26.
176. Wiese, S., K.A. Reidegeld, H.E. Meyer, *et al.*, *Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research*. *Proteomics*, 2007. **7**(3): p. 340-50.
177. Yao, X., A. Freas, J. Ramirez, *et al.*, *Proteolytic <sup>18</sup>O labeling for comparative proteomics: model studies with two serotypes of adenovirus*. *Anal. Chem.*, 2001. **73**(13): p. 2836-2842.
178. Gerber, S.A., J. Rush, O. Stemman, *et al.*, *Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003. **100**(12): p. 6940-6945.
179. Pratt, J.M., D.M. Simpson, M.K. Doherty, *et al.*, *Multiplexed absolute quantification for proteomics using concatenated signature peptides encoded by QconCAT genes*. *Nat. Protoc.*, 2006. **1**(2): p. 1029-43.
180. Lange, V., P. Picotti, B. Domon, *et al.*, *Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial*. *Mol. Syst. Biol.*, 2008. **4**: p. 222.
181. Glinski, M. and W. Weckwerth, *Differential multisite phosphorylation of the trehalose-6-phosphate synthase gene family in *Arabidopsis thaliana*: a mass spectrometry-based process for multiparallel peptide library phosphorylation analysis*. *Mol. Cell. Proteomics*, 2005. **4**(10): p. 1614-25.
182. Ytterberg, A.J. and O.N. Jensen, *Modification-specific proteomics in plant biology*. *J. Proteomics*, 2010. **73**(11): p. 2249-66.
183. Wang, F., C. Song, K. Cheng, *et al.*, *Perspectives of comprehensive phosphoproteome analysis using shotgun strategy*. *Anal. Chem.*, 2011.
184. Paradela, A. and J.P. Albar, *Advances in the analysis of protein phosphorylation*. *J. Proteome. Res.*, 2008. **7**(5): p. 1809-18.
185. Nita-Lazar, A., H. Saito-Benz, and F.M. White, *Quantitative phosphoproteomics by mass spectrometry: past, present, and future*. *Proteomics*, 2008. **8**(21): p. 4433-43.
186. Kline-Jonakin, K.G., G.A. Barrett-Wilt, and M.R. Sussman, *Quantitative plant phosphoproteomics*. *Curr. Opin. Plant. Biol.*, 2011. **14**(5): p. 507-11.

187. Zhao, Y. and O.N. Jensen, *Modification-specific proteomics: strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques*. Proteomics, 2009. **9**(20): p. 4632-41.
188. Ficarro, S.B., M.L. McClelland, P.T. Stukenberg, *et al.*, *Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to Saccharomyces cerevisiae*. Nat. Biotechnol., 2002. **20**(3): p. 301-5.
189. Kokubu, M., Y. Ishihama, T. Sato, *et al.*, *Specificity of immobilized metal affinity-based IMAC/C18 tip enrichment of phosphopeptides for protein phosphorylation analysis*. Anal. Chem., 2005. **77**(16): p. 5144-54.
190. Lee, J., Y. Xu, Y. Chen, *et al.*, *Mitochondrial phosphoproteome revealed by an improved IMAC method and MS/MS/MS*. Mol. Cell. Proteomics, 2007. **6**(4): p. 669-76.
191. Ishihama, Y., F.Y. Wei, K. Aoshima, *et al.*, *Enhancement of the efficiency of phosphoproteomic identification by removing phosphates after phosphopeptide enrichment*. J. Proteome Res., 2007. **6**(3): p. 1139-44.
192. Villen, J. and S.P. Gygi, *The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry*. Nat. Protoc., 2008. **3**(10): p. 1630-8.
193. Swaney, D.L., C.D. Wenger, J.A. Thomson, *et al.*, *Human embryonic stem cell phosphoproteome revealed by electron transfer dissociation tandem mass spectrometry*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009. **106**(4): p. 995-1000.
194. Gruhler, A., J.V. Olsen, S. Mohammed, *et al.*, *Quantitative phosphoproteomics applied to the yeast pheromone signaling pathway*. Mol. Cell. Proteomics, 2005. **4**(3): p. 310-327.
195. Wilson-Grady, J.T., J. Villen, and S.P. Gygi, *Phosphoproteome analysis of fission yeast*. J. Proteome Res., 2008. **7**(3): p. 1088-97.
196. Jensen, S.S. and M.R. Larsen, *Evaluation of the impact of some experimental procedures on different phosphopeptide enrichment techniques*. Rapid Commun. Mass Spectrom., 2007. **21**(22): p. 3635-45.
197. Thingholm, T.E., M.R. Larsen, C.R. Ingrell, *et al.*, *TiO(2)-based phosphoproteomic analysis of the plasma membrane and the effects of phosphatase inhibitor treatment*. J. Proteome Res., 2008. **7**(8): p. 3304-13.
198. Stulemeijer, I.J., M.H. Joosten, and O.N. Jensen, *Quantitative phosphoproteomics of tomato mounting a hypersensitive response reveals a swift suppression of photosynthetic activity and a differential role for hsp90 isoforms*. J. Proteome Res., 2009. **8**(3): p. 1168-82.
199. Chen, Z.H., A. Hills, C.K. Lim, *et al.*, *Dynamic regulation of guard cell anion channels by cytosolic free Ca<sup>2+</sup> concentration and protein phosphorylation*. Plant J., 2010. **61**(5): p. 816-25.
200. Jones, A.M., M.H. Bennett, J.W. Mansfield, *et al.*, *Analysis of the defence phosphoproteome of Arabidopsis thaliana using differential mass tagging*. Proteomics, 2006. **6**(4): p. 155-165.
201. Robertson, W.R., K. Clark, J.C. Young, *et al.*, *An Arabidopsis thaliana plasma membrane proton pump is essential for pollen development*. Genetics, 2004. **168**(3): p. 1677-87.
202. Murashige, T. and F. Skoog, *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant., 1962. **15**: p. 473-497.
203. Griveau, S., C. Dumézy, P. Goldner, *et al.*, *Electrochemical analysis of the kinetics of nitric oxide release from two diazeniumdiolates in buffered aqueous solutions*. Electrochem. comm., 2007. **9**: p. 2551-2556.

204. Besson-Bard, A., S. Griveau, F. Bedioui, *et al.*, *Real-time electrochemical detection of extracellular nitric oxide in tobacco cells exposed to cryptogein, an elicitor of defence responses*. *J. Exp. Bot.*, 2008. **59**(12): p. 3407-14.
205. Goldstein, S., A. Russo, and A. Samuni, *Reactions of PTIO and carboxy-PTIO with NO, NO<sub>2</sub>, and O<sub>2</sub><sup>-</sup>*. *J. Biol. Chem.*, 2003. **278**(51): p. 50949-55.
206. Felix, G., J.D. Duran, S. Volko, *et al.*, *Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin*. *Plant J.*, 1999. **18**(3): p. 265-76.
207. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding*. *Anal. Biochem.*, 1976. **72**: p. 248-254.
208. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **222**: p. 680-865.
209. Wisniewski, J.R., A. Zougman, N. Nagaraj, *et al.*, *Universal sample preparation method for proteome analysis*. *Nat. Methods*, 2009. **6**(5): p. 359-62.
210. MacLean, D., M.A. Burrell, D.J. Studholme, *et al.*, *PhosCalc: a tool for evaluating the sites of peptide phosphorylation from mass spectrometer data*. *BMC Res. Notes*, 2008. **1**: p. 30.
211. Olsen, J.V., B. Blagoev, F. Gnad, *et al.*, *Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks*. *Cell*, 2006. **127**(3): p. 635-48.
212. Caraux, G. and S. Pinloche, *PermutMatrix: a graphical environment to arrange gene expression profiles in optimal linear order*. *Bioinformatics*, 2005. **21**(7): p. 1280-1.
213. Zhu, J.K., J. Liu, and L. Xiong, *Genetic analysis of salt tolerance in arabidopsis. Evidence for a critical role of potassium nutrition*. *Plant Cell*, 1998. **10**(7): p. 1181-91.
214. Wilson, I.D., S.J. Neill, and J.T. Hancock, *Nitric oxide synthesis and signalling in plants*. *Plant Cell Environ.*, 2008. **31**(5): p. 622-31.
215. Millet, Y.A., C.H. Danna, N.K. Clay, *et al.*, *Innate immune responses activated in Arabidopsis roots by microbe-associated molecular patterns*. *Plant Cell*, 2010. **22**(3): p. 973-90.
216. Boller, T. and G. Felix, *A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors*. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2009. **60**: p. 379-406.
217. Graf, A., A. Schlereth, M. Stitt, *et al.*, *Circadian control of carbohydrate availability for growth in Arabidopsis plants at night*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010. **107**(20): p. 9458-63.
218. Contento, A.L. and D.C. Bassham, *Increase in catalase-3 activity as a response to use of alternative catabolic substrates during sucrose starvation*. *Plant Physiol. Biochem.*, 2010. **48**(4): p. 232-8.
219. Azad, A.K., Y. Sawa, T. Ishikawa, *et al.*, *Phosphorylation of plasma membrane aquaporin regulates temperature-dependent opening of tulip petals*. *Plant Cell Physiol.*, 2004. **45**(5): p. 608-17.
220. Sugiyama, N., H. Nakagami, K. Mochida, *et al.*, *Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in Arabidopsis*. *Mol. Syst. Biol.*, 2008. **4**: p. 193.
221. Wiesner, J., T. Premisler, and A. Sickmann, *Application of electron transfer dissociation (ETD) for the analysis of posttranslational modifications*. *Proteomics*, 2008. **8**(21): p. 4466-83.
222. Xie, F., T. Liu, W.J. Qian, *et al.*, *Liquid chromatography-mass spectrometry-based quantitative proteomics*. *J. Biol. Chem.*, 2011. **286**(29): p. 25443-9.

223. Wu, Y.B., J. Dai, X.L. Yang, *et al.*, *Concurrent quantification of proteome and phosphoproteome to reveal system-wide association of protein phosphorylation and gene expression*. *Mol. Cell. Proteomics*, 2009. **8**(12): p. 2809-26.
224. Li, W. and W. Schmidt, *A lysine-63-linked ubiquitin chain-forming conjugase, UBC13, promotes the developmental responses to iron deficiency in Arabidopsis roots*. *Plant J.*, 2010. **62**(2): p. 330-43.
225. Saeki, Y., T. Kudo, T. Sone, *et al.*, *Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome*. *Embo J.*, 2009. **28**(4): p. 359-71.
226. Höfte, H., L. Hubbard, J. Reizer, *et al.*, *Vegetative and seed-specific forms of tonoplast intrinsic protein in the vacuolar membrane of Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 1992. **99**: p. 561-570.
227. Moeller, H.B., J. Praetorius, M.R. Rutzler, *et al.*, *Phosphorylation of aquaporin-2 regulates its endocytosis and protein-protein interactions*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010. **107**(1): p. 424-9.
228. Goodlett, D.R., F.B. Armstrong, R.J. Creech, *et al.*, *Formylated peptides from cyanogen bromide digests identified by fast atom bombardment mass spectrometry*. *Anal. Biochem.*, 1990. **186**(1): p. 116-20.
229. Orlando, R., P.T. Kenny, and M.G. Zagorski, *Covalent modification of Alzheimer's amyloid beta-peptide in formic acid solutions*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992. **184**(2): p. 686-91.
230. Wisniewski, J.R., A. Zougman, and M. Mann, *Nepsilon-formylation of lysine is a widespread post-translational modification of nuclear proteins occurring at residues involved in regulation of chromatin function*. *Nucleic Acids Res.*, 2008. **36**(2): p. 570-7.
231. Geiger, T. and S. Clarke, *Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation*. *J. Biol. Chem.*, 1987. **262**(2): p. 785-94.
232. Robinson, N.E. and A.B. Robinson, *Use of Merrifield solid phase peptide synthesis in investigations of biological deamidation of peptides and proteins*. *Biopolymers*, 2008. **90**(3): p. 297-306.
233. Weintraub, S.J. and S.R. Manson, *Asparagine deamidation: a regulatory hourglass*. *Mech. Ageing Dev.*, 2004. **125**(4): p. 255-7.
234. Schey, K.L., M. Little, J.G. Fowler, *et al.*, *Characterization of human lens major intrinsic protein structure*. *Investigative Ophthal. Visual Sci.*, 2000. **41**: p. 175-182.
235. Ball, L.E., D.L. Garland, R.K. Crouch, *et al.*, *Post-translational modifications of aquaporin 0 (AQP0) in the normal human lens: spatial and temporal occurrence*. *Biochemistry*, 2004. **43**(30): p. 9856-65.
236. Gupta, R., C.O. Asomugha, and O.P. Srivastava, *The common modification in alpha-crystallin in the lens, N101D, is associated with increased opacity in a mouse model*. *J. Biol. Chem.*, 2011.
237. Hoffert, J.D., T. Pisitkun, G. Wang, *et al.*, *Quantitative phosphoproteomics of vasopressin-sensitive renal cells: Regulation of aquaporin-2 phosphorylation at two sites*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006. **103**(18): p. 7159-7164.
238. Hoffert, J.D., R.A. Fenton, H.B. Moeller, *et al.*, *Vasopressin-stimulated increase in phosphorylation at ser-269 potentiates plasma membrane retention of aquaporin-2*. *J. Biol. Chem.*, 2008. **283**(36): p. 24617-27.
239. Schussler, M.D., E. Alexandersson, G.P. Bienert, *et al.*, *The effects of the loss of TIP1;1 and TIP1;2 aquaporins in Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 2008. **56**(5): p. 756-67.

240. Maurel, C., H. Javot, V. Lauvergeat, *et al.*, *Molecular physiology of aquaporins in plants*. *Int. Rev. Cytol.*, 2002. **215**: p. 105-148.
241. Taiz, L., *The plant vacuole*. *J. Exp. Biol.*, 1992. **172**: p. 113-122.
242. Wudick, M.M., D.T. Luu, and C. Maurel, *A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins*. *New Phytol.*, 2009. **184**(2): p. 289-302.
243. Gattolin, S., M. Sorieul, P.R. Hunter, *et al.*, *In vivo imaging of the tonoplast intrinsic protein family in Arabidopsis roots*. *BMC Plant Biol.*, 2009. **9**: p. 133.
244. Beebo, A., D. Thomas, C. Der, *et al.*, *Life with and without AtTIP1;1, an Arabidopsis aquaporin preferentially localized in the apposing tonoplasts of adjacent vacuoles*. *Plant Mol. Biol.*, 2009. **70**(1-2): p. 193-209.
245. Johnson, K.D. and M.J. Chrispeels, *Tonoplast-bound protein kinase phosphorylates Tonoplast Intrinsic Protein*. *Plant Physiol.*, 1992. **100**(4): p. 1787-1795.
246. Maurel, C., R.T. Kado, J. Guern, *et al.*, *Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin  $\alpha$ -TIP*. *EMBO J.*, 1995. **14**: p. 3028-3035.
247. Loque, D., U. Ludewig, L. Yuan, *et al.*, *Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH<sub>3</sub> transport into the vacuole*. *Plant Physiol.*, 2005. **137**: p. 671-680.
248. Dynowski, M., G. Schaaf, D. Loque, *et al.*, *Plant plasma membrane water channels conduct the signaling molecule H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*. *Biochem. J.*, 2008. **414**(1): p. 53-61.
249. Kilian, J., D. Whitehead, J. Horak, *et al.*, *The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses*. *Plant J.*, 2007. **50**(2): p. 347-63.
250. Dinneny, J.R., T.A. Long, J.Y. Wang, *et al.*, *Cell identity mediates the response of Arabidopsis roots to abiotic stress*. *Science*, 2008. **320**(5878): p. 942-5.
251. Park, H.J., W.Y. Kim, H.C. Park, *et al.*, *SUMO and SUMOylation in plants*. *Mol Cells*, 2011.
252. Boursiac, Y., S. Prak, J. Boudet, *et al.*, *The response of Arabidopsis root water transport to a challenging environment implicates reactive oxygen species- and phosphorylation-dependent internalization of aquaporins*. *Plant Signal. Behav.*, 2008. **3**(12): p. 1096-8.
253. Qiao, W. and L.M. Fan, *Nitric oxide signaling in plant responses to abiotic stresses*. *J. Integr. Plant Biol.*, 2008. **50**(10): p. 1238-46.
254. Chen, J., Q. Xiao, F. Wu, *et al.*, *Nitric oxide enhances salt secretion and Na<sup>+</sup> sequestration in a mangrove plant, Avicennia marina, through increasing the expression of H<sup>+</sup>-ATPase and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter under high salinity*. *Tree Physiol.*, 2010. **30**(12): p. 1570-85.
255. Boursiac, Y., J. Boudet, O. Postaire, *et al.*, *Stimulus-induced downregulation of root water transport involves reactive oxygen species-activated cell signalling and plasma membrane intrinsic protein internalization*. *Plant J.*, 2008. **56**(2): p. 207-18.

## **ANNEXE**



Annexe : Numéro attribué aux peptides caractérisant des isoformes d'aquaporine.

N°	Isoformes	Région	Séquence	MPT	NaCl	NO	PO4
					t1/2 / C p value tmax / C p value	t1/2 / SNO p value tmax / SNO p value	carence p value réalim. p value
1	PIP1;1-12;1-3;1-4	1-9	-MEGKKEEDYR.V	Ac: M1	1,23 0,52 1,04 0,83	0,00 0,00 0,00 0,00	0,00 0,00
2	PIP1;1-12;1-3;1-4	1-9	-MEGKKEEDYR.V	Ac: M1; Ox: M1	1,39 0,27 1,10 0,92	0,00 0,00	0,00 0,00
3	PIP1;1-12;1-3;1-4	2-9	MEGKKEEDYR.V		1,27 0,54 1,01 0,76	0,00 0,00	0,00 0,00
4	PIP1;1-12;1-3;1-4	1-14	-MEGKKEEDYRVGANK.F	Ac: M1	1,23 0,76 0,35 0,03	0,00 0,00	0,00 0,00
5	PIP1;1-12;1-3;1-4	1-14	-MEGKKEEDYRVGANK.F	Ac: M1; Ox: M1	1,18 0,86 0,54 0,13	0,00 0,00	0,00 0,00
6	PIP1;1-12;1-3;1-4	5-14	K.EEDYRVGANK.F		0,87 0,13 0,55 0,01	0,20 0,00 0,98 0,93	0,30 0,01 1,20 0,67
7	PIP1;1-12	15-29	K.FFERQPIGTSAQSDK.D	P: T23/S24/S27	1,32 0,04 1,11 0,83	0,62 0,00 1,18 0,20	0,00 0,00 1,03 0,51
8	PIP1;1-12	15-29	K.FFERQPIGTSAQSDK.D		1,12 0,56 0,83 0,06	0,80 0,00 0,97 0,61	0,25 0,00 0,88 0,41
9	PIP1;1-12	19-29	R.QPIGTSAQSDK.D	M: S27/D28/K29	1,08 0,97 1,37 0,06	0,00 0,00 0,00 0,00	1,85 0,00 0,00 0,00
10	PIP1;1-12	19-29	R.QPIGTSAQSDK.D		0,90 0,94 0,77 0,33	0,00 0,00	0,00 0,00
11	PIP1;3	15-30	K.FFERQPIGTSAQTDK.D		1,28 0,07 1,59 0,11	0,55 0,01 1,03 0,08	0,76 0,23 0,04 1,23
12	PIP1;3	19-29	R.QPIGTSAQTDK.D		1,11 0,94 1,30 0,33	0,00 0,00	0,00 0,00
13	PIP1;4	15-30	K.FFERQPIGTSAQSDK.D		1,43 0,06 1,03 0,24	0,64 0,00	0,78 0,04
14	PIP1;5	5-14	K.EEDYRVGANK.F		0,89 0,07 0,56 0,00	0,00 0,00	1,00 0,55
15	PIP1;5	15-30	K.FFERQPIGTAATESK.D		0,98 0,11 1,14 0,82	0,38 0,00	0,80 0,18
16	PIP1;5	15-30	K.FFERQPIGTAATESK.D	Dét: Q19	1,59 0,26		0,84 0,42
17	PIP1;5	19-30	R.QPIGTAATESK.D				
18	PIP1;5	34-47	K.EPPAPFFPEGLK.S		0,00 0,00	0,00 0,00	0,02 0,98
19	PIP1;1	157-174	K.QYALGGGANTVAHGYTK.G		1,10 0,43 0,82 0,01	0,86 0,03	0,84 0,02
20	PIP1;1	157-174	K.QYALGGGANTVAHGYTK.G	Dét: N166	1,05 0,83 1,05 0,29	0,16 0,00	0,28 0,00
21	PIP1;1	157-174	K.QYALGGGANTVAHGYTK.G	M: K174	1,54 0,03 0,91 0,13	0,00 0,00	0,00 0,00
22	PIP1;1	157-174	K.QYALGGGANTVAHGYTK.G	F: K174	0,95 0,98 0,90 0,69	2,27 0,00	1,57 0,00
23	PIP1;2	157-174	K.QYALGGGANTVAHGYTK.G		1,05 0,98 1,11 0,69	0,09 0,00	0,26 0,00
24	PIP1;2	157-174	K.QYALGGGANTVAHGYTK.G	Dét: Q159/N166	1,02 0,70 0,99 0,34	0,07 0,00	0,60 0,24
25	PIP1;3	152-174	K.GFQPNPYQTLGGGANTVAHGYTK.G		0,99 0,75 1,12 0,99	0,37 0,00	0,18 0,00
26	PIP1;4	153-175	K.GFQPTPYQTLGGGANTVAHGYTK.G	Dét: Q155/Q160	1,05 0,49 1,03 0,64	0,44 0,00	0,24 0,00
27	PIP1;4	153-175	K.GFQPTPYQTLGGGANTVAHGYTK.G		1,04 0,92 0,93 0,34	0,00 0,00	0,21 0,00
28	PIP1;5	153-175	K.GFQPLGYQTINGGGANVAHGYTK.G		1,12 0,53 0,89 0,36	0,31 0,00	0,07 0,00
29	PIP1;5	153-175	K.GFQPLGYQTINGGGANVAHGYTK.G	Dét: N162	1,20 0,39 1,12 0,86	0,83 0,00	0,00 0,00
30	PIP1;1-13;1-4;1-5;2;5	239-248	R.SLGAALFNK.D		1,14 0,18 1,10 0,24	1,16 0,43	1,15 0,29
31	PIP1;2	239-248	R.SLGAALFNK.D		1,14 0,59 1,19 0,37	0,00 0,00	1,01 0,92
32	PIP2;1	4-16	K.DVEAVPGEFGQTR.D	Dét: Q13	1,35 0,52 1,04 0,52	2,78 0,00	33,33 0,00
33	PIP2;1	4-16	K.DVEAVPGEFGQTR.D		4,55 0,00 1,52 0,26	4,76 0,01	2,00 0,46
34	PIP2;1	17-33	R.DYQDPPAPFDGAEK.K	Dét: Q19	1,16 0,78 1,59 0,44	0,70 0,00	1,25 0,91
35	PIP2;1	17-33	R.DYQDPPAPFDGAEK.K		1,02 0,70	0,70 0,00	0,00 0,00
36	PIP2;1	4-33	K.DVEAVPGEFGQTRDYQDPPAPFDGAEK.K	Dét: Q14/Q19	0,63 0,06 0,88 0,32	0,30 0,00	1,28 0,16
37	PIP2;2	4-14	K.DVEGPEGQTR.D		1,30 0,57 0,61 0,04	2,00 0,00	0,39 0,07
38	PIP2;2	4-14	K.DVEGPEGQTR.D	Dét: Q11	2,00 0,04 0,90 0,77	0,00 0,00	5,26 0,43
39	PIP2;2	15-32	R.DYEDPPPTPFDADELTK.W	P: T22	1,04 0,63 0,80 0,19	0,00 0,00	4,17 0,00
40	PIP2;2	15-32	R.DYEDPPPTPFDADELTK.W	F: K32	0,58 0,51 2,93 0,41	0,00 0,00	0,00 0,00
41	PIP2;2	15-32	R.DYEDPPPTPFDADELTK.W	M: D28	1,28 0,17 1,40 0,16	0,51 0,01	0,74 0,27
42	PIP2;2	15-32	R.DYEDPPPTPFDADELTK.W		1,22 0,23 1,33 0,34	0,78 0,69 0,28	0,00 0,00
43	PIP2;2	4-32	K.DVEGPEGQTRDYEDPPPTPFDADELTK.W	Dét: N8	0,92 0,95 0,98 0,58	0,28 0,00	1,00 0,70
44	PIP2;3	15-32	R.DYEDPPPTPFDADELTK.W	2M: E9 et S10	1,05 0,41 0,83 0,14	2,38 0,26	0,37 0,00
45	PIP2;4	4-16	K.DLDVNESGPPAAR.D	P: S10	1,61 0,03 1,45 0,11	0,00 0,00	0,00 0,00
46	PIP2;4	4-16	K.DLDVNESGPPAAR.D		0,94 0,49 0,88 0,28	0,00 0,00	0,00 0,00
47	PIP2;4	4-19	K.DLDVNESGPPAARDYK.D		1,19 0,15 1,43 0,03	0,00 0,00	0,00 0,00
48	PIP2;4	4-19	K.DLDVNESGPPAARDYK.D		1,14 0,90 1,18 0,68	0,00 0,00	0,00 0,00
49	PIP2;4	20-33	K.DPPAPFFDMEELK.K		1,04 0,44 0,54 0,29	0,61 0,01	0,74 0,47
50	PIP2;5	16-33	K.DYDPPPPAPLLDMGELK.S			0,83	0,83
51	PIP2;5	16-33	K.DYDPPPPAPLLDMGELK.S			0,83	0,83
52	PIP2;7	16-32	K.DYDPPPPAPLLDMGELK.S			0,83	0,83



112	P1P2:4	165 - 178	Y.NKGTGLGAEIIGTF.V	1.32	0.41	0.72	0.11	2.17	0.37	0.95	0.61	1.39	0.24	1.52	0.01	1.11	0.60
113	P1P2:4	252 - 264	W.VGPMIGAAAFAFY.H	1.92	0.02	1.32	0.03	1.49	0.27	1.49	0.27	1.56	0.24	1.56	0.01	0.94	0.62
114	P1P2:7	139 - 154	F.MKTPYNTLGGANTVA.D	1.27	0.54	0.71	0.03	2.17	0.75	0.35	0.13	0.57	0.21	1.61	0.03	0.70	0.03
115	P1P2:7	158 - 171	Y.SKGTALGAEIIGTF.V	1.02	0.74	0.74	0.10	2.17	0.52	1.16	0.85	0.82		0.82	0.17	1.35	0.08
116	P1P2:7	249 - 257	F.LGALAAAAY.H	1.23	0.58	0.77	0.02	1.22	0.27	0.87	0.50	0.81		0.81	0.00	1.61	0.01
117	P1:1 1:2 1:3 1:4 2:4 2:6 2:7 2:8	164 - 171	L.GAEIIGTF.V	0.92	0.01	1.00	0.12	1.06	0.94	0.71	0.18	1.14		1.14	0.37	1.30	0.05
118	TIP1:1 1:2	28 - 33	F.ISTLIF.V	0.87	0.02	1.08	0.75	1.06	0.96	1.11	0.92	1.25		1.25	0.00	0.69	0.00
119	TIP1:1	122 - 133	L.KFATGGGLAVPAF.G	1.20	0.07	1.39	0.00	1.05	0.92	0.42	0.01	0.37	0.02	0.79	0.47	1.02	0.86
120	TIP1:1	129 - 135	L.AVPAFGLS	0.55	0.00			1.03	0.01	0.91	0.43	0.88	0.43	0.97	0.41	1.23	0.42
121	TIP1:1	161 - 181	Y.ATAIDPKNGSLGTIAPAIAGF.I	0.74	0.11	0.88	0.55	1.06	0.98	0.91	0.43	0.85	0.69	0.85	0.39	1.39	0.08
122	TIP1:1 1:2	165 - 181	LDPKNGSLGTIAPAIAGF.I	1.67	0.08	0.75	0.40	1.59	0.64	1.12	0.76	1.39	0.69	0.85	0.39	1.89	0.00
123	TIP1:1 1:2 2:2 2:3	172 - 181	L.GTIAPAIAGF.I	1.15	0.64	1.18	0.13	2.33	0.30	1.12	0.76	1.06	0.63	1.72	0.00	1.61	0.02
124	TIP1:1s TIP2:1s TIP3:1s	182 - 188	F.JVGANILA	0.99	0.32	0.93	0.36	0.97	0.67	1.12	0.88	1.04	0.41	1.67	0.06	0.84	0.12
125	TIP1:1 1:2	182 - 193	F.IVGANILAGGAF.S	1.08	0.80	0.93	0.36	1.89	0.90	1.12	0.88	1.39	0.41	1.39	0.22	1.39	0.20
126	TIP1:1 1:2	182 - 193	F.JVGANILAGGAF.S	0.86	0.09	0.86	0.09	1.02	0.88	0.96	0.66	0.71	0.03	1.16	0.02	1.22	0.01
127	TIP1:1 1:2	194 - 204	F.SGASMPAVAF.G	0.86	0.09	0.86	0.09	1.56	0.42	0.85	0.36	0.32	0.01	0.96	0.57	1.49	0.02
128	TIP1:1 1:2	205 - 213	F.GPAVVSWTW.T	0.65	0.20	0.53	0.02	1.23	0.09	1.09	0.97	0.74	0.03	0.60	0.17	1.32	0.11
129	TIP1:1	220 - 232	Y.WAGPLVGGIAGL.I	1.06	0.98	0.91	0.43	2.08	0.59	1.03	0.79	0.63	0.01	1.35	0.41	1.35	0.08
130	TIP1:1	221 - 232	W.AGPLVGGIAGL.I	0.74	0.11	0.88	0.55	1.23	0.09	1.09	0.97	0.74	0.03	0.60	0.17	1.32	0.11
131	TIP1:1	221 - 234	W.AGPLVGGIAGL.I	1.67	0.08	0.75	0.40	2.08	0.59	1.03	0.79	0.63	0.01	1.35	0.41	1.35	0.08
132	TIP1:1	238 - 249	F.FINTHEQLPTT.D	1.15	0.64	1.18	0.13	1.30	0.00	1.27	0.36	1.15	0.63	1.30	0.03	1.05	0.83
133	TIP1:1	239 - 251	F.INTHEQLPTT.DY.-	0.86	0.09	0.86	0.09	1.30	0.00	1.27	0.36	1.15	0.63	1.30	0.03	1.05	0.83
134	TIP1:1 1:2	244 - 249	HEQLPTT.D	1.14	0.50	0.98	0.39	1.08	0.77	0.99	0.66	0.58		0.58	0.04	1.32	0.11
135	TIP1:2	1 - 15	-PTRNIAIGVQEEVY.H	1.06	0.98	0.91	0.43	1.08	0.77	0.99	0.66	0.58		0.58	0.04	1.32	0.11
136	TIP1:2	37 - 45	F.AGSGSIAF.N	0.65	0.20	0.53	0.02	1.23	0.09	1.09	0.97	0.74	0.03	0.60	0.17	1.32	0.11
137	TIP1:2	45 - 63	F.NKTTDNGATTPSGLYAAAL.A	1.08	0.80	0.93	0.36	2.08	0.59	1.03	0.79	0.63	0.01	1.35	0.41	1.35	0.08
138	TIP1:2	125 - 136	F.ATGGEPIPAFGLS	0.86	0.09	0.86	0.09	1.30	0.00	1.27	0.36	1.15	0.63	1.30	0.03	1.05	0.83
139	TIP1:2	161 - 181	Y.ATAVDPKNGSLGTIAPAIAGF.I	0.86	0.09	0.86	0.09	1.30	0.00	1.27	0.36	1.15	0.63	1.30	0.03	1.05	0.83
140	TIP1:2	220 - 229	Y.WAGPLIGGGL.A	0.65	0.20	0.53	0.02	1.23	0.09	1.09	0.97	0.74	0.03	0.60	0.17	1.32	0.11
141	TIP1:2	222 - 230	W.AGPLJGGGL.A	1.06	0.89	0.90	0.12	2.08	0.59	1.03	0.79	0.63	0.01	1.35	0.41	1.35	0.08
142	TIP1:2	225 - 234	L.IGGGLAGHIY.D	1.85	0.01	0.93	0.70	1.30	0.00	1.27	0.36	1.15	0.63	1.30	0.03	1.05	0.83
143	TIP1:2	235 - 239	Y.DFVFLD	1.14	0.50	0.98	0.39	1.08	0.77	0.99	0.66	0.58		0.58	0.04	1.32	0.11
144	TIP2:1	25 - 30	F.ISTLLE.V	1.06	0.89	0.90	0.12	2.08	0.59	1.03	0.79	0.63	0.01	1.35	0.41	1.35	0.08
145	TIP2:1 2:2 2:3	179 - 190	L.IVGANILAAAGPF.S	1.06	0.89	0.90	0.12	2.08	0.59	1.03	0.79	0.63	0.01	1.35	0.41	1.35	0.08
146	TIP2:1	222 - 231	L.IGGGLAGLIY.G	1.85	0.01	0.93	0.70	1.30	0.00	1.27	0.36	1.15	0.63	1.30	0.03	1.05	0.83
147	TIP2:2 2:3	140 - 150	L.EGVVMEIVVTF.A	1.06	0.89	0.90	0.12	2.08	0.59	1.03	0.79	0.63	0.01	1.35	0.41	1.35	0.08
148	TIP2:2 2:3	191 - 208	F.SGGSMPARSPGPAVVS.G.D	1.06	0.89	0.90	0.12	2.08	0.59	1.03	0.79	0.63	0.01	1.35	0.41	1.35	0.08
149	TIP2:2 2:3	222 - 231	L.VGGGALAGLIY.G	1.85	0.01	0.93	0.70	1.30	0.00	1.27	0.36	1.15	0.63	1.30	0.03	1.05	0.83
150	TIP2:2	236 - 249	F.IGSYAPAPITTESYP.-	1.14	0.50	0.98	0.39	1.08	0.77	0.99	0.66	0.58		0.58	0.04	1.32	0.11

Ce tableau présente le numéro attribué aux peptides (colonne 1), la ou les protéine(s) que le peptide caractérise (colonne 2), sa région protéique (colonnes 3), sa séquence (colonne 4) et son état de MPT (colonne 5). L'indication Sx/Sy signifie l'impossibilité de discriminer entre les deux sites potentiels de phosphorylation x et y. Ce peptide est considéré comme étant modifié sur Sx ou Sy ou sous la forme d'un mélange de ces 2 peptides monophosphorylés. La même convention est appliquée pour la position des déamidations et méthylations. Lorsqu'aucune MPT n'est spécifiée, le peptide n'est pas modifié. Les colonnes 6 à 19 présentent les rapports quantitatifs et les p-values associées obtenus en réponse au traitement NaCl (6 à 0), DEA-NO (10 à 15) et phosphate (16 à 19). Ac : acétylation, Ox : oxydation, P : phosphorylation, M : méthylation, Déa : déamidation, F : formylation ; SINO : standard DEA-NO, C : contrôle général.









## **Régulation des aquaporines et réponse des racines d'*Arabidopsis thaliana* à des stimuli abiotiques et nutritionnels**

La conductivité hydraulique racinaire ( $L_{p_r}$ ) traduit la facilité du passage de l'eau au travers des racines. Ce paramètre, majoritairement contrôlé par l'activité de canaux hydriques membranaires (aquaporines), est modulable par diverses contraintes environnementales. Ce travail a permis de caractériser, sur un même organisme (*Arabidopsis*), les effets d'un ensemble de contraintes abiotiques et biotiques, représentatives de situations environnementales, sur la  $L_{p_r}$ . Alors que la flagelline n'affecte pas la  $L_{p_r}$ , les contraintes osmotiques (NaCl, mannitol), oxydantes ( $H_2O_2$ , NO) et nutritionnelles (carence en phosphate, en nitrate, culture des plantes en nuit prolongée) inhibent la  $L_{p_r}$ . Par contre, la réalimentation en phosphate ainsi que l'addition de saccharose à des plantes cultivées en nuit prolongée stimulent la  $L_{p_r}$ . Une approche phosphoprotéomique quantitative, basée sur l'analyse par MS de protéines microsomaux racinaires purifiées à partir de plantes cultivées dans trois de ces contextes (NaCl, NO, phosphate) a permis de quantifier les variations d'abondance de l'ensemble des aquaporines racinaires ainsi que de leur état de MPT. D'un point de vue qualitatif, 22 aquaporines ont été identifiées dans la racine ainsi que plusieurs types de MPTs, incluant des nouveaux sites de phosphorylation (7), de méthylation (13 à 15), de formylation (4) et de déamidation (25 à 26). D'un point de vue quantitatif, cette étude a permis de conclure que les observations réalisées au niveau de la  $L_{p_r}$  sont la résultante de mécanismes multifactoriels incluant l'état de phosphorylation des trois sites de l'extrémité C-terminale de PIP2;1/2;2/2;3, l'état de phosphorylation de l'extrémité N-terminale de PIP1;1/1;2, ainsi que les aquaporines TIPs. Ce travail permet donc de proposer de nouveaux mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la  $L_{p_r}$  en réponse à des contraintes de l'environnement.

Mots clés : contraintes environnementales, racines,  $L_{p_r}$ , aquaporines, modification post-traductionnelle, phosphoprotéomique quantitative

## **Regulation of aquaporins and response of *Arabidopsis thaliana* roots to abiotic and nutritional stimuli**

The water uptake capacity of plant roots (root hydraulic conductivity,  $L_{p_r}$ ) is mainly determined by water channels (aquaporins) and is modulated by environmental constraints. The present work characterised, in a unique organism (*Arabidopsis*), effects on  $L_{p_r}$  of abiotic and biotic constraints representative of environmental situations. Whereas flagelline does not affect  $L_{p_r}$ , osmotic (NaCl or mannitol), oxidative ( $H_2O_2$  or NO) and nutritional (phosphate or nitrate starvation, prolonged night) stimuli inhibit  $L_{p_r}$ . However, phosphate and sucrose resupply stimulate  $L_{p_r}$ . A phosphoproteomics approach based on MS analysis of microsomal proteins extracted from roots of plants cultivated in different environmental constraints (NaCl, NO, phosphate starvation and resupply) allowed to quantify variations of abundance of roots aquaporins and of their PTMs. As a qualitative point of view, 22 aquaporins were identified in roots as well as several post-translational modifications including new sites of phosphorylation (7), methylation (13 to 15), formylation (4) and deamidation (25 to 26). From a quantitative point of view, the present work drove to the conclusion that the modulations of  $L_{p_r}$  result from multifactorial mechanisms including the phosphorylation status of the C-terminal part of PIP2;1/2;2/2;3 and of the N-terminal part of PIP1;1/1;2 and TIP aquaporins. This study proposes new molecular mechanisms implicated in  $L_{p_r}$  regulation in response to various environmental situations.

Keywords: environmental constraints, roots,  $L_{p_r}$ , aquaporins, post-translational modification, quantitative phosphoproteomics