



HAL
open science

Etude des phases précoces de la transduction des signaux environnementaux chez le lin : une approche protéomique

Marc Tafforeau

► **To cite this version:**

Marc Tafforeau. Etude des phases précoces de la transduction des signaux environnementaux chez le lin : une approche protéomique. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Rouen, 2002. Français. NNT : . tel-00003381

HAL Id: tel-00003381

<https://theses.hal.science/tel-00003381>

Submitted on 16 Sep 2003

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

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



Thèse de Doctorat de l'Université de Rouen

Discipline : Biologie

Spécialité : Biochimie Végétale

Présentée par

Marc Tafforeau

Etude des phases précoces de la transduction des signaux environnementaux chez le lin : une approche protéomique

Soutenue le 05 juillet 2002

Composition du Jury

M. M. Thellier	Professeur, membre de l'Académie des Sciences	Président du Jury
M. G. Ledoigt	Professeur de l'Université de Clermont-Ferrand	Rapporteur
M. A. Bardou	Directeur de Recherche de l'Université Rennes 1	Rapporteur
M. M. Hebraud	Chargé de Recherche à l'INRA, Theix	Examineur
M. R. Charlionet	Chargé de Recherche à l'INSERM	Examineur
M. C. Ripoll	Professeur à l'Université de Rouen	Directeur de Thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Mr le professeur Thellier, membre de l'Académie des Sciences, d'avoir accepté de présider le jury de thèse. De plus, je remercie vivement le professeur G. Ledoigt et le Directeur de Recherche A. Bardou d'être rapporteurs de ce travail.

Mes remerciements vont aussi à toute l'équipe du laboratoire PJC (UMR 6037) pour son accueil. Plus particulièrement, je suis reconnaissant envers les personnes suivantes :

- Marie Claire Verdus pour sa bonne humeur, et ses connaissances intarissables sur les plantes*
- Armelle Cabin pour sa rigueur à la paille ainsi que pour ses bons conseils*
- Camille Ripoll pour m'avoir encadré pendant quatre ans, et pour sa passion de la recherche scientifique*
- Guillaume, Cédric et Thomas toujours prêts à faire une pause café pour diminuer le stress important de la recherche en laboratoire.*

Pour tous leurs conseils sur l'électrophorèse bidimensionnelle et toutes les techniques qui s'en rapprochent, je remercie énormément Sandrine Thébault et Roland Charlionet de l'INSERM 519 sans qui ces résultats n'existeraient sans doute pas. Je les remercie aussi pour leur disponibilité et leur gentillesse.

Je tiens aussi à remercier Muriel Bardor et toute l'équipe de Loïc Faye, UMR 6037, (dont Patrice Lerouge et Bernard Foucher pour leur disponibilité) qui m'ont permis de réaliser de nombreuses extractions de protéines au sein de leur laboratoire.

Pour l'immunodétection, ainsi que l'activité sur gel, je remercie Sandrine Chiri de l'Université de Jussieu (Paris), toujours souriante et jamais à cours d'idées innovantes.

Enfin, pour en finir avec le domaine technique, je tiens à remercier Michel Hébraud (FNRA de Theix) pour ses bons conseils sur l'électrophorèse bidimensionnelle et son grand cœur.

Mais il ne faut bien sûr pas oublier l'essentiel, à savoir mes parents, que je ne pourrai jamais assez remercier de tout ce qu'ils ont fait pour moi.

Enfin, je remercie ma future épouse pour m'avoir soutenu pendant toute cette épreuve, et pour son amour.

Liste des Abréviations

2-DE : électrophorèse bidimensionnelle

ADP : *Adenosine DiPhosphate*

AMP : *Adenosine MonoPhosphate*

ATP : *Adenosine TriPhosphate*

BAPTA : 1,2-Bis(o-AminoPhenoxy)éthane TetrAcétate

BSA : *Bovin Serum Albumin*

CDPK : *Calcium Dependent Protein Kinase*

CHAPS : 3-[(3-CHolamidopropyl)diméthylAmmonio]-1-Propane-Sulfonate

DTE : *DiThioErythritol*

EDTA : *Ethylene Diamine Tetracetic Acid*

EGDMA : *EthyleneGlycolDiMethAcrylate*

EGTA : *Ethylene Glycol-bis[2-aminoethyl ether]-N,N,N'N'-Tetracetic Acid*

GFP : *Green Fluorescent Protein*

GMP : *Guanidine MonoPhosphate*

GSM : *Global System for Mobile*

HEMA : *HydroxyEthylMethAcrylate*

MALDI-TOF : *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight*

MAPK : *Mitogen Activated Protein Kinase*

MAPKK : *Mitogen Activated Protein Kinase Kinase*

MAPKKK : *Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase*

MBP : *Myelin Basic Protein*

MM : *Masse Moléculaire*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

pH : *potentiel Hydrogène*

pI : *Point Isoélectrique*

PIN : *Protease Inhibitor*

PR : *Pathogen Response*

PVDF : *PolyVinylidene diFluoride*

PVPP : *PolyVinyl-PolyPyrrolidone*

SDS : *Sodium Dodecyl Sulfate*

SDS-PAGE : *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*

SIMS : *Secondary Ion Mass Spectrometry*

TCA : *TriChloro-acetic Acid*

β -SH : *β -mercapto-ethanol*

Sommaire du Mémoire

Liste des Abréviations

Page 3

Première Partie

Introduction Générale

Page 9

Introduction Bibliographique.

Page 16

I. Le calcium : une molécule de signalisation ubiquiste ?

Page 17

I.1. Imager le calcium : la nécessité d'un intermédiaire.

Page 19

I.2. Pourquoi le calcium ?

Page 21

I.3. La régulation de la concentration cytosolique en calcium : la nécessité de transports actifs et passifs.

Page 22

I.4. Une régulation de la concentration calcique est nécessaire à la signalisation.

Page 23

I.4.1. Transports actifs primaires et secondaires.

Page 24

I.4.2. Influx de calcium : les canaux perméables aux ions calcium.

Page 26

I.4.3. Les canaux endomembranaires.

Page 28

I.4.4. Les inhibiteurs de canaux calciques et les chélateurs de calcium.

Page 30

I.5. Les cibles de la signalisation par le calcium.

Page 31

I.5.1. Protéines kinases dépendantes du calcium.

Page 31

I.5.2. Phosphatases et Phospholipases.

Page 34

I.6. La spécificité des signaux calciques.

Page 35

I.6.1. Réponses calciques transitoires.

Page 36

I.6.2. Les oscillations de calcium et les pics répétitifs.

Page 37

I.6.3. Les signaux calciques spatialement localisés.

Page 38

I.6.4. Gradients de calcium dans les systèmes à croissance apicale.

Page 40

I.7. Le calcium : une molécule de signalisation ubiquiste ?

Page 42

II. Les systèmes de transduction des signaux non directement régulés par le calcium.

Page 43

II.1. Les Mitogen Activated Protein Kinases.	Page 43
II.1.1. Les différentes MAP kinases.	Page 43
II.1.2. Rôles de la voie des MAP kinases chez les végétaux.	Page 45
II.2. Les histidines kinases (systèmes à deux composants).	Page 50
II.3. Transmissions hydrauliques et électriques.	Page 53
III. La mémorisation des signaux environnementaux chez les plantes.	Page 55
III.1. Exemples de mémorisations des signaux environnementaux.	Page 55
III.1.1. La modification de la croissance symétrique des bourgeons axillaires chez <i>Bidens pilosa</i> L.	Page 56
III.1.2. La modification de la croissance de l'hypocotyle de <i>Bidens pilosa</i> L. et de la tomate.	Page 57
III.1.3. La thigmomorphogénèse de la bryone.	Page 57
III.1.4. Induction des méristèmes épidermiques chez le lin.	Page 58
III.2. Le stockage de l'information.	Page 59
IV. Effets des rayonnements électromagnétiques à une puissance non thermique sur les organismes vivants.	Page 62
IV.1. Mesure des champs électromagnétiques et action sur les constituants biologiques.	Page 62
IV.1.1 Evaluation de l'exposition à un rayonnement électromagnétique	Page 63
IV.1.2. Actions des champs électromagnétiques sur les constituants biologiques.	Page 64
IV.1.3. Perturbation des mesures de champs électromagnétiques en laboratoire.	Page 65
IV.2. Exemples d'effets des rayonnements électromagnétiques à une puissance non thermique.	Page 66
IV.2.1. Effets des rayonnements à très basse fréquence.	Page 66
IV.2.2. Effets du champ magnétique terrestre.	Page 67
IV.2.3. Effets des micro-ondes sur les organismes vivants.	Page 68
IV.3. Théorie des interactions entre les ondes électromagnétiques et le vivant.	Page 70
IV.3.1. La théorie du Champ L (L-Field).	Page 70
IV.3.2. la théorie de l'excitation cohérente de Fröhlich.	Page 72

Deuxième Partie

Méthodes expérimentales, Résultats et Discussion.

	Page 76
I. Matériels et méthodes.	Page 77
<i>I.1. Conditions de culture des plantes.</i>	Page 77
<i>I.2. Application des différents stimuli.</i>	Page 78
<i>I.2.1 Stimuli appliqués au lin pour l'analyse protéomique.</i>	Page 78
<i>I.2.2. Stimuli appliqués au lin pour la production de méristèmes épidermiques.</i>	Page 79
<i>I.2.3. Stimuli appliqués à Arabidopsis pour l'analyse protéomique.</i>	Page 81
<i>I.3. Production et comptage des méristèmes épidermiques.</i>	Page 81
<i>I.4 Extractions des protéines.</i>	Page 82
<i>I.4.1. Extraits protéiques pour l'électrophorèse bidimensionnelle.</i>	Page 82
<i>I.4.2. Extraits protéiques pour l'électrophorèse monodimensionnelle.</i>	Page 83
<i>I.4.3. Extraits protéiques pour la mesure de l'activité tyrosine-kinase en solution.</i>	Page 83
<i>I.5. Séparations électrophorétiques.</i>	Page 83
<i>I.5.1. Electrophorèse monodimensionnelle.</i>	Page 84
<i>I.5.2. Electrophorèse Bidimensionnelle.</i>	Page 84
<i>I.5.3. Transfert des protéines sur membrane de PVDF.</i>	Page 86
<i>I.6. Séquençage N-terminal.</i>	Page 86
<i>I.7. Détection d'activité kinase.</i>	Page 86
<i>I.7.1. Détection d'activité tyrosine kinase en solution.</i>	Page 87
<i>I.7.2. Détection d'activité kinase sur gel.</i>	Page 87
<i>I.8. Analyse des images obtenues par électrophorèse bidimensionnelle.</i>	Page 88
<i>I.9. Comparaison d'empreintes de protéine obtenues par spectrométrie de masse.</i>	Page 89
<i>I.10. Détection par la méthode SIMS de l'état phosphorylation de protéines après séparation électrophorétique.</i>	Page 89
II. Résultats et Discussion.	Page 91
<i>II.1. Modifications du protéome de l'hypocotyle de lin à la suite de stimuli mécaniques.</i>	Page 91

<i>II.1.1. Stimulus mécanique non lésant.</i>	Page 91
<i>II.1.2. Compression lésante de l'hypocotyle.</i>	Page 93
<i>II.2. Production de méristèmes chez le lin et modifications du protéome du lin et d'Arabidopsis à la suite d'un choc de froid.</i>	Page 93
<i>II.2.1. Effets d'un choc de froid.</i>	Page 93
<i>II.2.2. Effets des inhibiteurs de canaux calciques et d'un chélateur de calcium sur la production des méristèmes épidermiques.</i>	Page 95
<i>II.2.3. Effets du lanthane et de l'EGTA sur le protéome de lin.</i>	Page 98
<i>II.3. Effets de rayonnements électromagnétiques sur le lin et Arabidopsis.</i>	Page 101

Troisième Partie

<i>Résumé du mémoire et Conclusion</i>	Page 105
--	----------

Quatrième Partie

<i>Annexe 1.</i>	Page 113
<i>Annexe 2.</i>	Page 114
<i>Annexe 3.</i>	Page 116
<i>Références bibliographiques.</i>	Page 118
<i><u>Publication 1</u> : 2D-electrophoresis investigation of short-term response of flax seedlings to a cold shock.</i>	Page 143
<i><u>Publication 2</u> : Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS): a tool for the determination of the phosphorylation status of proteins in electrophoresis gels.</i>	Page 157
<i><u>Publication 3</u> : GSM telephone induces Ca-related epidermal meristem production in flax.</i>	Page 171
<i><u>Publication 4</u> : Detection of low intensity GHz radiation by plants.</i>	Page 189
<i><u>Publication 5</u> : Arabidopsis proteome changes induced by cold shock or GSM telephone radiation.</i>	Page 198

Résumés et figures	Page 210
---------------------------	----------

Première Partie

Introduction générale

*Étude des phases précoces de la transduction des signaux
environnementaux chez le lin : une approche protéomique*

Les végétaux ont commencé à coloniser les continents au silurien, il y a 400 millions d'années. Ce sont les premiers êtres vivants à avoir réussi une telle adaptation et s'ils se sont développés dans le milieu hostile qu'était la terre à cette époque, c'est grâce à la mise en place de systèmes efficaces (photosynthèse, mise en place d'organes spécifiques comme les racines et les feuilles, etc.). Les végétaux ont aussi pu se répandre sur la surface de la planète en mettant en place, à titre d'exemple, la pollinisation, puis, plus tard en créant une symbiose avec les insectes *via* les fleurs. Le règne végétal a réussi à se maintenir et même à continuer à se répandre malgré l'avancée du règne animal. Il semble donc évident que les plantes, qui contrairement aux animaux sont incapables de se déplacer afin d'échapper à un stress environnemental, ont su développer des stratégies pour répondre aux modifications de leur milieu et pour survivre.

Le quotidien des végétaux n'est pas de tout repos. En effet, sa croissance est, à tout instant, affectée par une multitude de stress environnementaux. Les plantes ont mis en place des mécanismes qui leur sont propres pour percevoir et répondre à toute une série de stress environnementaux tels que la déshydratation, les basses températures, la chaleur, des stress mécaniques comme le toucher ou le vent, des blessures ou encore des infections par des espèces qui leur sont pathogènes. Tous ces stress environnementaux sont donc perçus par la plante comme des *stimuli* qui, par un phénomène de transduction du signal au sein de la cellule végétale, vont à leur tour induire tout un ensemble de réponses biochimiques, moléculaires (expression ou répression de certains gènes), ou physiologiques [Dixon and Lamb, 1990 ; Ryan, 1990 ; Grillo and Leone, 1996 ; Ingram and Bartels, 1996 ; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1996, 1997 ; Braam *et al.*, 1997 ; Bray, 1997 ; Lamb and Dixon, 1997 ; Yang *et al.*, 1997 ; Satoh and Murata, 1998 ; Shinozaki *et al.*, 1998]. Cependant, chez les végétaux, les mécanismes impliqués dans la perception et dans la transduction des signaux pour répondre à un stress environnemental demeurent encore mal connus.

Chez les végétaux, un ion semble avoir un rôle central dans la transduction des signaux environnementaux : le calcium. En effet, des modifications rapides et transitoires de la concentration cytosolique en calcium libre interviennent après l'application de *stimuli* divers chez des plantes [Knight *et al.*, 1991]. Des changements de concentration du calcium libre sont mis en évidence à l'aide de colorants sensibles au calcium, ou de protéines luminescentes ou fluorescentes. Cette intervention ubiquiste du calcium dans les événements

de transduction des signaux environnementaux soulève plusieurs questions : pourquoi cet ion est utilisé alors que les autres ions comme le sodium ou le potassium ne semblent pas affectés ? Comment sont contrôlées les concentrations en calcium à l'intérieur de la plante (canaux ioniques, transporteurs passifs et actifs) et quelles sont les molécules capables d'intervenir sur ces contrôles ? Si le calcium intervient effectivement dans les systèmes de transduction des signaux environnementaux, quelles sont les cibles de ce messager (protéines comme les protéines kinases dépendante du calcium et les phosphatases), et comment une cellule est-elle capable d'intégrer des informations différentes en utilisant le même messager ? Les travaux de recherche effectués sur les plantes ont aussi mis en évidence d'une part des molécules capables de véhiculer une information à l'intérieur d'une cellule végétale (les *Mitogen Activated Protein Kinases* [Mizoguchi *et al.*, 1996 ; Widmann *et al.*, 1999 ; Ligterink and Hirt, 2000] et les systèmes à deux composants [Parkinson and Kofoed, 1992 ; Appleby *et al.*, 1996 ; Mizuno, 1998 ; Sakakibara *et al.*, 2000]) et d'autre part des systèmes de communication dans la plante entière (flux hydriques ou électriques [Mancuso, 1999]).

On suppose généralement (souvent de façon implicite) que la chaîne de transduction, de la perception initiale d'un signal jusqu'à son expression finale, est un processus continu dans le temps. Cependant les plantes doivent adapter leur développement à l'ensemble des *stimuli* qu'elles reçoivent et pas seulement à chacun d'eux pris séparément. Comme ces *stimuli* sont reçus à des temps différents, une réponse développementale optimale, intégrée, sera d'autant plus aisément produite par les plantes si celles-ci ont l'aptitude de discriminer [Bush, 1995] puis de stocker, rappeler et traiter les signaux induits par les différents *stimuli*. Le stockage de signaux mécaniques sur des périodes allant de 2 jours à plusieurs mois, a été mis en évidence avec plusieurs modèles expérimentaux comme : l'inhibition de croissance de l'hypocotyle de plantules de *Bidens* [Desbiez *et al.*, 1987a ; 1991a] ou de tomate [Lefèvre *et al.*, 1993], la rupture de symétrie de croissance des bourgeons cotylédonaire de *Bidens* [Desbiez *et al.* 1984 ; 1991c] ou encore la thigmomorphogenèse de *Bryonia* [Bourgeade *et al.*, 1989]. Plus récemment, Verdus *et al.* [1996 ; 1997] ont montré dans notre laboratoire que l'information de perception de *stimuli* divers non lésants (mécaniques ou hydriques) est stockée dans des plantules de lin (*Linum usitatissimum* L.). Ceci est révélé en soumettant les plantules de lin à une déplétion calcique temporaire (typiquement 2 jours) dont l'effet est de déclencher la formation de méristèmes épidermiques dans l'hypocotyle *uniquement* si des *stimuli* ont été administrés à la plante. Le stockage d'informations est alors facilement mis en évidence ; en effet, après administration aux plantules d'un *stimulus*, on peut différer la

déplétion calcique de plusieurs jours et déclencher la formation des méristèmes avec une cinétique inchangée par rapport à celle qui est observée quand la déplétion suit immédiatement la stimulation [Verdus *et al.*, 1997] ; ceci prouve que l'information générée lors de la perception d'un signal était restée stockée sans affaiblissement dans la plante jusqu'à ce que la déplétion calcique la « révèle ». Ces résultats suggèrent que le calcium pourrait être impliqué dans le mécanisme de stockage d'informations. Des données allant dans ce sens ont aussi été rapportées par le groupe de Marc Knight à l'Université d'Oxford. Ces chercheurs ont montré qu'un prétraitement par le froid de plantules *d'Arabidopsis* altérait les caractéristiques spatio-temporelles transitoires de calcium, la « signature calcique », déclenchées par un choc de froid [Knight *et al.*, 1996 ; Knight and Knight, 2000]. Un effet similaire de la sécheresse a aussi été rapporté par ce groupe [Knight *et al.*, 1998]. Dans tous ces cas, l'histoire des stress antérieurs qu'a subi une plante altère la dynamique de la réponse calcique déclenchée par un nouveau *stimulus* ; ce qui suggère bien l'existence chez les plantes d'une sorte de « mémoire » des *stimuli* qu'elles perçoivent.

A part des indications sur l'implication du calcium (et peut être d'autres ions), les mécanismes de stockage d'informations chez les végétaux restent très obscurs [Verdus *et al.*, 1997 ; Thellier *et al.*, 2000]. Ainsi, les modèles mathématiques des processus de stockage et de rappel d'informations chez les plantes qui ont été publiés, sont purement phénoménologiques [Desbiez *et al.*, 1994 ; Demongeot *et al.*, 2000]. Peu de données biochimiques [Boyer *et al.*, 1979 ; Davies, 1987 ; Desbiez *et al.*, 1987a, 1991a, 1995] ou moléculaires [Vian *et al.*, 1995a et b] viennent, en effet, éclairer ces mécanismes. Pour tenter d'avancer dans la compréhension des mécanismes de stockage et de rappel d'informations chez le lin, l'objectif de ce travail de thèse était de mettre en évidence les changements rapides dans le protéome consécutifs à l'application de *stimuli* abiotiques. La principale méthode expérimentale employée a été l'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE). L'analyse protéomique est un concept qui est né il y a environ 25 ans avec l'apparition de la technique de l'électrophorèse bidimensionnelle [O'Farrell, 1975 ; Klose, 1975] ; le terme de protéome s'est imposé vers 1995 [Wasinger *et al.*, 1995], date à partir de laquelle les techniques fondées sur l'électrophorèse se sont fortement développées grâce notamment à la réalisation de matériels commerciaux permettant une meilleure reproductibilité des séparations. Le couplage avec d'autres techniques d'analyse comme la spectrométrie de masse, est encore venu accroître les performances de la méthode [Yates, 1998]. L'électrophorèse bidimensionnelle est un outil de choix lorsqu'il s'agit de rechercher des modifications induites au niveau

cellulaire ou tissulaire dans des organismes vivants [Zivy and de Vienne, 2000]. La comparaison de cartes protéomiques d'une même espèce végétale à différents stades de son évolution, ou avant et après qu'elle ait subi un stress environnemental, permet de mettre en évidence des modifications des protéines dans un gel pouvant contenir jusqu'à deux milliers de spots différents [Thiellement *et al.*, 1999]. Les informations obtenues de cette façon ne sont évidemment pas exhaustives mais apportent beaucoup plus d'informations que la plupart des autres méthodes. L'analyse protéomique est donc en principe une méthode adaptée à la problématique de ces travaux.

L'approche par électrophorèse bidimensionnelle et son application au modèle « lin » souffrent cependant de quelques handicaps. Même si sa sensibilité est bonne, la technique de l'électrophorèse bidimensionnelle exige de séparer les protéines provenant d'un grand nombre de plantules. Les cartes protéomiques obtenues sont donc la superposition des cartes de différents tissus et cellules. Même si pour nos analyses, nous avons isolé un organe particulier (l'hypocotyle), il faut être conscient que nous ne pouvons obtenir par cette méthode que des indications « moyennes ». A notre connaissance aucun gel d'électrophorèse bidimensionnelle de plantules de lin n'a été publié jusqu'ici ; ceci a nécessité une exploration préalable et une mise au point des techniques pour cette plante. De plus, le génome du lin est très peu connu (aucune base de données n'existe sur ce végétal) ; c'est un handicap sérieux pour l'identification des protéines correspondant à des « spots » modifiés sur les gels d'électrophorèse bidimensionnelle (nous avons fait quelques analyses comparatives avec *Arabidopsis thaliana* pour tenter d'obtenir des indications). Néanmoins, même si l'identification des protéines du lin est (à cette étape du travail) difficile, on peut espérer obtenir par la méthode de l'électrophorèse bidimensionnelle une « signature protéomique » de l'effet des *stimuli* environnementaux sur le lin et chercher si cette signature est dépendante de l'histoire des stress reçus par la plante. Nous décrivons dans ce mémoire nos efforts expérimentaux pour avancer vers cet objectif.

Malgré ses limitations pour l'analyse par électrophorèse bidimensionnelle, le modèle de l'induction des méristèmes chez le lin a le mérite d'être d'une très grande sensibilité pour révéler la perception et le stockage de signaux abiotiques faibles. Les résultats existants sur ce modèle concernaient principalement l'effet de *stimuli* mécaniques [Verdus *et al.*, 1996 ; 1997], nous avons étudié celui d'autres *stimuli*, et tout d'abord d'un choc de froid. Nous avons déterminé la cinétique de production des méristèmes et analysé les changements

précoces du protéome de l'hypocotyle que nous avons comparés à ceux induits par des stress mécaniques non lésants ou des blessures. Pour caractériser les différences observées sur les gels obtenus par électrophorèse bidimensionnelle, nous avons tenté de mettre en évidence l'activité kinase sur gel et recherché par immunodétection la présence de tyrosines phosphorylées. Ces caractérisations sur gel se sont avérées difficiles dans nos conditions expérimentales ; aussi avons nous tenté de mettre au point une autre voie de détection des protéines phosphorylées en utilisant la technologie SIMS (*Secondary Ions Mass Spectrometry*) après une séparation électrophorétique. Cette nouvelle méthode a l'avantage d'avoir une sensibilité très élevée, d'être utilisable pour tous les échantillons biologiques et pourrait, à terme, permettre de développer une nouvelle technique d'analyse du protéome.

Nous avons également cherché à mieux comprendre l'implication du calcium dans les phénomènes de transduction, de stockage et de rappel des informations. Pour cela, nous avons étudié la production de méristèmes en présence d'inhibiteurs de canaux calciques et de complexants du calcium. L'analyse par électrophorèse bidimensionnelle nous a permis de mettre en évidence des modifications du protéome de l'hypocotyle de lin spécifiques d'un type de *stimulus* (stress mécanique, choc de froid, par exemple) ou de traitement (inhibiteur de canaux calciques, chélateur de calcium) qui sont observées aussi bien pendant ou après ces *stimuli* ou ces différents traitements.

Les stress mécaniques, l'exposition aux basses températures ou les blessures légères sont pour les plantes des *stimuli* naturels. Nous nous sommes interrogés sur les effets éventuels de sollicitations physiques dues à l'activité humaine. Nous avons choisi d'exposer les plantes à des doses non thermiques d'un rayonnement électromagnétique dans le domaine des GHz. Nous avons montré que des rayonnements de fréquence 105 GHz ou 0.9 GHz (fréquence de la téléphonie mobile) provoquent la formation de méristèmes chez le lin de façon similaire aux *stimuli* environnementaux naturels. Nous décrivons les premiers résultats d'analyse des modifications du protéome obtenus avec *Arabidopsis thaliana*.

Le plan de ce mémoire est le suivant. Dans une première partie (Introduction bibliographique), nous passons en revue les différents mécanismes de transduction des signaux chez les plantes, avec un éclairage tout particulier sur le rôle du calcium. Nous résumons également les données bibliographiques concernant le stockage d'informations chez les plantes. Enfin, nous donnons quelques éléments concernant les effets des rayonnements

électromagnétiques et leur interprétation. La deuxième partie contient l'exposé des méthodes expérimentales et des résultats obtenus. Nous avons choisi de présenter nos résultats sous forme d'une série de manuscrits qui font, ou feront, l'objet de nos publications (ils sont rassemblés à la fin du mémoire). Ainsi le texte de cette deuxième partie renvoie souvent à ces manuscrits. Le mémoire se termine par un Résumé et une Conclusion Générale.

Introduction
Bibliographique.

I. Le calcium : une molécule de signalisation ubiquiste ?

Depuis quelques années, les produits vantant les mérites du calcium ne cessent d'augmenter (qu'il s'agisse de produits laitiers ou bien d'autres produits comme les cosmétiques), si bien que l'on trouve cet ion à tout les niveaux. Bien évidemment, il ne s'agit ici que d'arguments purement mercantiles dans la majorité des cas, mais il faut bien reconnaître que le calcium a de nombreux rôles physiologiques et est absolument nécessaire dans de nombreux processus biochimiques.

Il y a déjà quelques décennies que le calcium est reconnu comme étant un ion de signalisation ubiquiste chez les végétaux. En effet, toutes les cellules vivantes utilisent un réseau de transduction de signaux pour contrôler la croissance, obtenir des nutriments du milieu extérieur, et bien sûr réagir avec leurs environnements. Bien évidemment, ces systèmes correspondent à une sorte de langage cellulaire que les biologistes cherchent depuis longtemps à comprendre. Pour simplifier les études, ces systèmes de signalisation ont souvent été étudiés dans des conditions très simples avec des cellules isolées pour essayer de déterminer la voie de transduction correspondant à un seul *stimulus*. Or les cellules ne sont pas si simplistes et pour un seul *stimulus*, il peut y avoir de nombreuses voies de signalisation différentes activées, ce qui résulte souvent à des interactions complexes et croisées entre ces différentes voies [Trewavas and Malhó, 1998 ; Jenkins, 1998]. Ces systèmes d'interactions croisées permettent sûrement aux cellules d'utiliser un nombre relativement faible d'éléments de transduction et d'intégration des signaux en regard au nombre très important de *stimuli* qui peuvent subvenir. Chez les cellules végétales, il a déjà été recensé plusieurs messagers impliqués dans la transduction des signaux environnementaux comme le calcium, le pH, le GMP cyclique, l'AMP cyclique, l'ADP ribose, les hormones et l'inositol 1,4,5-triphosphate. Mais dans cette liste, seul le calcium a été montré comme étant un messenger utilisé dans presque toutes les voies de transduction (Tableau 1) comme par exemple celle de la lumière rouge qui induit la photomorphogénèse [Shacklock *et al.*, 1992], de l'acide abscissique qui entraîne la fermeture des stomates [Mc Ainh *et al.*, 1990], de la sécrétion de α -amylase provoquée par les gibbérellines [Bush and Jones, 1988], lors de stress hydriques [Knight *et al.*, 1997], de stress osmotiques [Taylor *et al.*, 1996], de stress mécaniques, d'action d'éliciteurs fongiques [Knight *et al.*, 1991], de stress froid ou d'acclimatation [Knight *et al.*,

1996], de stress chaud [Gong *et al.*, 1998] ou bien encore de stress oxydatifs [Price *et al.*, 1994].

Les connaissances sur les rôles du calcium en tant que messager dans les systèmes de transduction des signaux ont pu fortement progresser grâce à des systèmes de mesure des concentrations intracellulaire. Les premières mesures de la concentration de calcium libre dans le cytoplasme ont été effectuées à l'aide de microélectrodes spécifiques [Brownlee and Wood, 1986 ; Miller and Sanders, 1987 ; Felle, 1989]. Mais comme l'inconvénient majeur de ces électrodes est qu'il est impossible d'obtenir des informations spatiales, les techniques d'imagerie et de comptage basées sur les colorants fluorescents et surtout l'æquorine, une protéine de la méduse (l'apoæquorine) qui s'assemble avec un luminophore (la coéluentérazine) pour donner un complexe luminescent sensible au calcium, ont principalement été utilisées pour obtenir des informations sur la cinétique et la structure des signaux calciques [Read *et al.*, 1993].

Bien que de nombreuses études aient montré l'implication du calcium dans beaucoup de phénomènes de réponse à des *stimuli*, de réelles preuves que l'augmentation transitoire de la concentration du calcium cytosolique est essentielle pour la transduction des signaux restent difficiles à obtenir. Même si des modifications de la concentration en calcium sont enregistrées après l'administration d'un *stimulus*, il faut prouver que sans ce phénomène, toute la machinerie de transduction qui se déroule plus tardivement (activation de kinases, et transcription de gènes) est bloquée, mais aussi que des éléments de réponse sensibles au calcium sont présents dans la cellule. Déjà, de solides démonstrations commencent à abonder dans ce sens, mettant en évidence le rôle central du calcium dans de nombreux évènements comme l'intervention du phytochrome [Schacklock *et al.*, 1992 ; Bowler *et al.*, 1994 ; Neuhaus *et al.*, 1997], la fermeture des stomates en réponse à de nombreux *stimuli* [Mc Robbie, 1997], la croissance des pointes de poils absorbants de racines, de tubes polliniques et du rhizoïde des algues [Brownlee and Wood, 1986 ; Wymer *et al.*, 1997 ; Holdaway-Clarke *et al.*, 1998 ; Malhó *et al.*, 1998], la régulation de l'activité de canaux ioniques [Pei *et al.*, 1998 ; Czempinski *et al.*, 1997 ; Allen *et al.*, 1998], la régulation de l'activité hormonale [Gilroy *et al.*, 1993 ; Staxen *et al.*, 1999], le turnover des protéines [Brauer *et al.*, 1990], l'expression de gènes [Braam, 1992], la reproduction [Roberts and Brownlee, 1995], la croissance et le développement [Camacho *et al.*, 2000 ; Messerli *et al.*, 1999], la sénescence [Huang *et al.*, 1997], et la régulation de la division cellulaire [Messiaen *et al.*, 1993 ; Ehrhardt *et al.*, 1996].

1.1. Imager le calcium : la nécessité d'un intermédiaire.

Comme imager ou détecter directement le calcium *in vivo* est impossible actuellement, des molécules intermédiaires sont obligatoires. Les colorants fluorescents souvent introduits dans les cellules par micro-injection sont capables d'imager les hétérogénéités de la répartition du calcium libre dans le cytoplasme. De plus, une quantification du calcium est possible dans certain cas de façon indépendante de la concentration du colorant. Il existe plusieurs classes de colorants en fonction de leur caractéristique d'excitation et d'émission. Les sondes fluorimétriques (Fluo-3, Calcium Green-1) sont excitées à une seule longueur d'onde (généralement avec un microscope confocal laser) et émettent à une autre longueur d'onde. Avec ces sondes à calcium, les mesures quantitatives sont pratiquement impossibles tant que la répartition homogène dans les tissus n'a pas été démontrée [Takahashi *et al.*, 1999]. Les sondes ratiométriques (Figure 1) ont quant à elles soit une double excitation soit une double émission (Fura-dextrans, Indo). Les mesures effectuées avec une double longueur d'onde permet d'obtenir des informations sur la concentration en calcium de façon indépendante de la concentration en colorant fluorescent, ce qui rend possible les mesures quantitatives [Dempster, 1999]. Mais les méthodes liées aux colorants ont des limites : les cellules ou les tissus analysés doivent être pénétrés de façon homogène par les sondes, la concentration des colorants doit rester très faible pour ne pas induire des effets tampon des ions et ne pas avoir un effet cytotoxique, et de plus les colorants sensibles au calcium ont souvent une affinité non négligeable pour d'autres ions comme le magnésium et les protons et enfin, le fait de devoir exciter les sondes induit souvent un bruit de fond d'autofluorescence dû à la présence chez les végétaux de nombreux composés capables de fluorescer (chromophores, pigments, etc.) [Fricker *et al.*, 1999].

La visualisation des variations de la concentration cytosolique en calcium est souvent réalisée à l'aide de l'æquorine (Figure 2) dont la protéine est introduite dans le génome de la plante pour être exprimée de façon constitutive (voire même adressée dans le compartiment voulu ; Tableau 2). La reconstitution du luminophore se fait en présence de coélectérazine (capable de traverser la membrane plasmique) dans le milieu extérieur ce qui évite les micro-injections (Figure 3). Les possibilités qu'offrent ce système d'imagerie et de comptage sont très importantes : en utilisant une technologie de mutagenèse dirigée sur la protéine æquorine ou en utilisant différentes sortes de luminophores (coélectérazine), il est possible de la rendre

plus ou moins sensible au calcium et donc de créer des indicateurs de différentes concentrations en calcium (de 10 nM à 10 μ M). Malgré tout, il reste des limitations importantes à l'emploi du système *æquorine* : la luminescence produite est relativement faible, ce qui nécessite souvent de restreindre les mesures sur quelques couches cellulaires dans le cas de plantes entières (mais il est possible d'augmenter ce signal en couplant l'*apoæquorine* à la Green Fluorescent Protein [Baudet *et al.*, 2000]) ; le fait de devoir reconstituer pendant plusieurs heures le système en ajoutant de la coéluentérazine au milieu de culture peut avoir des effets toxiques sur la plante, la fixation du calcium à l'*apoæquorine* est quasi-irréversible, ce qui entraîne des modifications de la concentration cytosolique, les mesures quantitatives restent difficiles à mettre en place et enfin, seules quelques plantes sont facilement transformables pour produire des protéines luminescentes [Plieth, 2001].

La troisième famille d'indicateurs de calcium est la famille des protéines fluorescentes. Fondées sur les principes de la Green Fluorescent Protein (GFP), des constructions chimériques ont été réalisées pour pouvoir imager le calcium. Les molécules ayant sûrement un bel avenir sont les caméléons. Le principe de ces molécules est un ensemble de deux protéines fluorescentes dont l'une est excitée (fluorophore accepteur) par l'émission de l'autre (fluorophore donneur). En fonction de la distance qui sépare les deux fluorophores, l'accepteur sera plus ou moins bien excité par le donneur. Le montage réalisé pour obtenir les caméléons est un couplage du donneur et de l'accepteur avec un bras modulable en longueur. Si le bras fixe du calcium, celui-ci se modifie et la distance qui sépare le donneur de l'accepteur se réduit, entraînant ainsi l'excitation de l'accepteur si le donneur est excité antérieurement [Miyawaki *et al.*, 1999]. Les limites de ces indicateurs sont le fait que ces constructions sont modifiées à pH inférieur à 7 et sont sensibles aux ions chlorures (Figure 4).

Même si ces méthodes sont de plus en plus efficaces et permettent des mesures qualitatives aussi bien que quantitatives, elles restent fondées sur des modifications des cellules ou des tissus étudiés. Ainsi, l'introduction d'un colorant nécessite souvent de rendre chimiquement les cellules perméables, et les effets de toxicité ne sont pas forcément bien connus. De même, les modifications génétiques introduites dans le génome de plantes qui expriment des protéines luminescentes ou fluorescentes peuvent conduire à des dérèglements des voies de biosynthèse ainsi que des modifications de ratio entre les protéines, voire des interactions entre différentes molécules qui n'ont pas lieu d'être dans une plante normale. Une

voie d'analyse des modifications de la concentration cytosolique en calcium totalement différente pourrait être mise en œuvre avec la technologie des microscopes ioniques (NANOSIMS : Nano Secondary Ions Mass Spectrometry) qui imageraient le calcium d'une cellule ou d'un ensemble de cellules après congélation et cryofracture [Dérue *et al.*, 1999].

1.2. Pourquoi le calcium ?

Le métabolisme de toutes les cellules vivantes nécessite la présence de phosphate inorganique et de molécules phosphorylées, en particulier dans le cytoplasme pour les réactions associées à l'utilisation d'énergie. Or, un phénomène physicochimique bien connu est la très faible solubilité du phosphate inorganique en présence de calcium, ce qui donne un précipité. C'est pourquoi les cellules ont dû adapter un système de contrôle de la concentration en calcium intracellulaire (et plus particulièrement cytoplasmique) pour pouvoir continuer à utiliser la source d'énergie qu'est la phosphorylation. Les cellules ont donc diminué la concentration en calcium bien en dessous du millimolaire, concentration du milieu extérieur, c'est-à-dire de la mer au commencement de la vie sur Terre. Ainsi, on trouve des systèmes de transport actif (entre autres systèmes de régulation) du calcium à l'intérieur des cellules, ce qui permet de maintenir une concentration cytosolique de calcium en dessous du micromolaire (de manière générale chez les plantes, cette concentration est de l'ordre de 200 nM [Bush, 1995]). Le gradient de concentration créé par la différence de potentiel électrochimique du calcium entre l'intérieur et l'extérieur de la membrane des cellules en fait un candidat très intéressant pour l'utiliser comme messager secondaire (le messager primaire étant par exemple l'effet direct d'un stress subi par l'organisme) lors de la transduction d'un signal. En effet, la différence de potentiel permet de faire entrer le calcium dans la cellule avec une rapidité que l'on ne peut pas obtenir avec d'autres ions souvent à des concentrations proches du millimolaire.

Un autre argument fait de l'ion calcium un excellent candidat pour servir de messager : le calcium peut se fixer (en plus des interactions ioniques courantes) à plusieurs atomes d'oxygène non chargés (généralement six à huit), comme cela peut être le cas au niveau de chaînes principales ou latérales de protéines, et ainsi jouer un rôle dans la conformation des molécules de la cellule. Plus précisément, cette capacité de se fixer aux atomes d'oxygène des molécules permet certainement un contrôle de cette molécule au niveau

de sa conformation et de son hydrophobie, et donc ainsi jouer un rôle au niveau de la transduction de certains signaux cellulaires [McPhalen *et al.*, 1991 ; Ames *et al.*, 1997]. Chez les cellules animales, il existe des micro domaines couplés à la membrane ou l'on peut trouver des accumulations de calcium qui interviennent dans des voies de signalisation utilisant des protéines [Blakstone and Sheng, 1999], ce qui montre que le calcium peut réguler des molécules et donc des voies de signalisation.

1.3. La régulation de la concentration cytosolique en calcium : la nécessité de transports actifs et passifs.

Le calcium cytosolique libre est maintenu typiquement à une concentration proche de 200 nM [Bush, 1995], mais il semble évident que cette concentration est bien plus importante du fait du nombre très important de molécules capables de fixer le calcium (et principalement les protéines apparentées à la calmoduline). Des mesures faites sur des neurones montrent qu'environ 0,1 à 1 % du calcium total d'une cellule est libre dans le cytoplasme [Brinley *et al.*, 1977 ; Gorman and Thomas, 1980]. Cette tendance qu'a le calcium à être fixé par des éléments cellulaires permet de réduire de façon considérable le coefficient de diffusion du calcium dans le cytoplasme [Thomas, 1982] entraînant le fait que des modifications transitoires de concentration peuvent rester très localisées spatialement, ce qui permet l'utilisation du calcium comme un messager capable de réagir avec les éléments cellulaires dans le temps et dans l'espace.

Dans les cellules, on trouve des organites capables d'accumuler le calcium et donc de contribuer à l'effet tampon de la concentration de cet ion dans le cytosol. De plus, ces réservoirs à calcium permettent aussi d'effectuer des relargages dans le cytoplasme dans certains cas de transduction de signal (lors du stress de froid par exemple [Knight *et al.*, 1996]). Chez les plantes, des organites sont déjà bien identifiés pour avoir un rôle de réservoir de calcium : il s'agit du réticulum endoplasmique, des mitochondries et des chloroplastes [Bush, 1995]. Mais la vacuole est, de part sa taille et sa capacité, le réservoir majeur des cellules végétales et même si le rôle exact de ces compartiments capables de stocker le calcium n'est pas encore vraiment approfondi, la vacuole joue sûrement un rôle central dans l'effet tampon du calcium et de sa biodisponibilité [Miller *et al.*, 1990].

Pour maintenir le gradient de concentration du calcium entre le cytoplasme et le milieu extérieur ou les compartiments réservoirs (qui ont évidemment des capacités de stockage limitées), il faut un efflux du calcium hors de la cellule contre son gradient électrochimique. Le rapport des concentrations du calcium entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule est d'environ 10^{-4} et de plus, la différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule est généralement de -150 mV ce qui donne une différence de potentiel électrochimique de l'ordre de 50 kJ.mol^{-1} de calcium transportée de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur. Cela signifie que le maintien d'une très faible concentration en calcium dans le cytosol (si on fait évidemment abstraction des effets de réservoir des organites et de fixation du calcium par les protéines de la famille des calmodulines) ne peut être dû qu'à un transport actif du calcium vers le milieu extérieur. Cet efflux est bien entendu assuré par des pompes à calcium dépendantes de l'ATP ou par des cotransports couplés avec des protons. Par contre, les influx de calcium dans la cellule sont bien évidemment passifs et se produisent par l'intermédiaire de canaux spécifiques ou non.

1.4. Une régulation de la concentration calcique est nécessaire à la signalisation.

Les signaux calciques dans le cytoplasme peuvent être vus comme la résultante de deux fonctions opposées : les influx et les efflux dans et hors du cytoplasme des cellules (Figure 5). En effet, on peut considérer que dans la dynamique des signaux calciques, les efflux et les influx sont les déterminants principaux même si les organites et les molécules capables de fixer le calcium peuvent avoir une fonction modulatrice dans la structure de ces signaux. Les recherches actuelles ont permis de mettre en évidence des transporteurs de calcium au niveau de la membrane plasmique, du réticulum endoplasmique, des plastes et de la vacuole, qui peuvent avoir des rôles importants dans la forme et la structure des signaux calciques [Kreimer *et al.*, 1985 ; Johnson *et al.*, 1995 ; Santella and Carafoli, 1997].

Les systèmes de transports actifs qui permettent de modifier la concentration en calcium dans le cytoplasme ont trois principales fonctions courantes. Tout d'abord, ils permettent la restauration du niveau basal de la concentration en calcium du cytoplasme après une augmentation transitoire due à un influx de calcium lors de la transmission d'un signal cellulaire. Ensuite, ils transfèrent le calcium du cytoplasme vers les organites de stockage (réticulum endoplasmique, vacuole et plastes) pour pouvoir l'utiliser comme source régulée

de relargage. Enfin, ils alimentent les organites en calcium pour les besoins des processus biochimiques ; par exemple, le réticulum endoplasmique a besoin d'une forte concentration en calcium pour permettre l'excrétion des protéines dans le système de sécrétion [Rudolph *et al.*, 1989 ; Gill *et al.*, 1996].

En plus de ces fonctions nécessaires à la cellule, ces transporteurs actifs ont un rôle dans la structure des signaux calciques. Il a en effet été montré chez deux modèles expérimentaux non végétaux (*Xenopus* et *Dictyostelium*) qu'une augmentation de l'activité des pompes à calcium ou de leur concentration altère de manière significative la transduction des signaux [Camacho and Lechleiter, 1993 ; Cubitt *et al.*, 1998 ; Lechleiter *et al.*, 1998]. De même, la surexpression d'un antiport H^+/Ca^{2+} au niveau tonoplaste du tabac (CAX1 d'*Arabidopsis*) entraîne l'incapacité de la plante à réagir de façon normale au froid du fait de la modification de l'homéostasie du calcium cytoplasmique [Hirshi, 1999]. Les pompes à calcium et les transporteurs actifs secondaires ont donc certainement une importance dans la mise en place des signaux calciques même si cela n'a pas vraiment été mis en évidence chez les plantes.

1.4.1. Transports actifs primaires et secondaires.

Appartenant à la superfamille des ATPases de type P, les pompes à calcium utilisent directement l'ATP pour permettre la translocation des ions calcium. Deux familles de pompes à calcium chez les modèles animaux ont été cataloguées d'après les alignements de séquences [Axelsen and Palmgren, 1998] ainsi qu'en fonction de plusieurs critères permettant de distinguer les pompes de la membrane plasmique des ATPases à calcium présentes dans le réticulum endoplasmique : leurs localisations (membrane plasmique ou réticulum), leurs différentes sensibilités aux inhibiteurs (comme par exemple l'action spécifique de l'acide cyclopiazonique et de la thapsigargine pour les pompes du réticulum endoplasmique), et enfin la capacité des pompes du cytoplasme à être activées directement par la calmoduline [Evans and Williams, 1998]. De ces comparaisons ressortent deux familles : les types IIA (situé dans le réticulum endoplasmique), et IIB (localisé dans la membrane plasmique). Par homologie de séquences principalement, ces deux familles ont été retrouvées chez les plantes.

Plusieurs gènes codant des pompes à calcium de type IIA ont été clonés à partir de séquences animales chez les végétaux comme par exemple, LCA1 chez la tomate [Wimmers *et al.*, 1992], OCA1 chez le riz (*Oryza sativa* Calcium ATPase [Chen *et al.*, 1997]) et ECA1/ACA3 d'*Arabidopsis* (Réticulum Endoplasmique-type Calcium ATPase/*Arabidopsis* Calcium ATPase isoforme 3 [Liang *et al.*, 1997]). Même s'il a été prouvé que la protéine ECA1/ACA3 est bien située dans la membrane du réticulum endoplasmique, les autres pompes n'ont pas vraiment été localisées. Une étude par immunodétection de la protéine LCA1 a montré qu'elle pouvait se situer dans la membrane plasmique, le tonoplaste ou encore la membrane du réticulum endoplasmique, ce qui montre que la classification des pompes à calcium chez les végétaux n'est pas aussi évidente que chez les modèles animaux [Ferrol and Bennett, 1996].

De même, trois gènes végétaux codant des pompes à calcium de type IIB (donc situées dans la membrane plasmique chez les modèles animaux) ont été trouvés : ACA1 et ACA2 d'*Arabidopsis* [Huang *et al.*, 1993 ; Harper *et al.*, 1998] ainsi que BCA1 de *Brassica oleracea* [Malmstrom *et al.*, 1997]. Là encore, la classification utilisée pour les modèles animaux ne correspond pas car la localisation de BCA1 semble être vacuolaire [Huang *et al.*, 1993] et ACAP2 dans la membrane du réticulum endoplasmique [Harper *et al.*, 1998 ; Hong *et al.*, 1999]. Une autre différence notable est aussi apparue lors de la comparaison des séquences : le domaine probable d'auto-inhibition situé en C-terminal chez les systèmes animaux se retrouve en N-terminal chez les végétaux.

Les antiports proton/calcium permettent de faire baisser la concentration en calcium dans le cytoplasme grâce à la force protomotrice (le cytoplasme ayant un pH plus élevé que le milieu extérieur ou que les organites). Chez les plantes, la stœchiométrie de ces transporteurs est généralement de trois protons pour un calcium transporté [Blackford *et al.*, 1990]. Comme cela est très souvent le cas, le premier antiport proton/calcium à avoir été cloné et caractérisé au niveau biochimique provient d'*Arabidopsis*, il s'agit de CAX1p (pour Calcium eXchanger 1 ; [Hirshi *et al.*, 1996]) sans doute localisé dans le tonoplaste. Le gène correspondant a été isolé grâce à sa capacité de restaurer la croissance de levures mutantes n'exprimant pas de transporteurs de calcium vacuolaires. La caractérisation biochimique de ce transporteur a montré une capacité à transporter du calcium même à faible concentration (la constante de Michaelis étant environ de 13 μ M). Ces résultats ont confirmé les études de l'activité des antiports proton/calcium faites sur des vacuoles de racine d'avoine [Schumaker and Sze,

1986]. D'autres antiports proton/calcium ont été mis en évidence ailleurs que dans la membrane de la vacuole, comme la membrane plasmique [Kasai and Muto, 1990].

Chez la levure, le transporteur de calcium VCX1 est inhibé par la calcineurine (une phosphatase de la classe PP2B activée par le calcium) [Cunningham and Fink, 1996]. De même, chez les animaux, les pompes de type IIA et IIB sont régulées par les éléments de nombreuses voies de signalisation comme la calmoduline et les protéines kinases (CaMKII et protéine kinase C) [Carafoli, 1997 ; Stokes, 1997 ; Penniston and Enyedi, 1998]. Les pompes du réticulum endoplasmique peuvent être régulées aussi bien par des signaux provenant du cytoplasme que par une boucle de rétroaction sensible aux variations de la concentration de calcium dans la lumière du réticulum [Bhagal and Colyer, 1998 ; Mogami *et al.*, 1998]. Chez les végétaux, la seule preuve de régulation des pompes à calcium est l'activation de pompes de type IIB (ACA2 et BCA1) par le calcium ou la calmoduline ainsi que par l'inositol 1,4,5-triphosphate.

La colocalisation des transporteurs (comme CAX1) et des pompes à calcium (comme BCA1) dans le même organite pose la question d'un entrelacement des fonctions des transporteurs et des pompes mais actuellement, aucun élément de réponse ne vient expliquer cette multitude de protéines colocalisées et ayant les mêmes fonctions. Une hypothèse de cette colocalisation serait le fait que l'utilisation des transports actifs primaires et secondaires permet le réglage fin de la concentration cytosolique en calcium ainsi que la génération et la propagation des oscillations et des ondes de calcium ainsi que la perception de certains *stimuli* [Plieth, 1999].

1.4.2. Influx de calcium : les canaux perméables aux ions calcium.

Bien que des canaux perméables au calcium n'aient pas encore été caractérisés au niveau moléculaire chez les plantes, il a été montré que l'ajout d'un gène du blé, *lct1* (Low-affinity Cation Transporter 1) chez une levure mutante incapable de faire entrer le calcium dans le cytoplasme rétablit les influx de calcium [Schachtman *et al.*, 1997 ; Clemens *et al.*, 1998]. La séquence de la protéine LCT1 ne montre que peu d'homologie avec les canaux animaux ou bactériens, mais il semble que ce type de canal joue un rôle important dans l'assimilation et l'utilisation du calcium chez les végétaux. Des résultats obtenus par

approches biochimiques et électrophysiologiques ont permis d'obtenir des informations sur la perméabilité des membranes au calcium, ainsi que sur les propriétés pharmacologiques des canaux calciques, principalement au niveau de la membrane plasmique et du tonoplaste.

Il a déjà été recensé deux principales classes de canaux calciques dans la membrane plasmique [White, 1998]. La première classe, les canaux maxi-cation, contient des canaux peu sélectifs aux cations mais avec une grande conductance [White, 1993, 1994]. La seconde classe plus sélective mais avec une moins bonne conductance est la classe des canaux voltage dépendants [White, 1994 ; Pineros and Tester, 1995, 1997]. Ces deux classes de canaux ont été observées principalement dans les racines de céréales mais aussi dans des suspensions cellulaires de carotte, de persil [Thuleau *et al.*, 1993 ; Zimmerman *et al.*, 1997] ainsi que dans des cellules du mésophile et de racine d'*Arabidopsis* [Ping *et al.*, 1992 ; Thion *et al.*, 1996].

Un point commun entre la majorité des canaux calciques est la capacité d'être activé par la dépolarisation de la membrane plasmique. Cette capacité est même pensée comme essentielle dans la transduction des signaux [Ward *et al.*, 1995]. En effet, il a été montré une dépolarisation rapide de la membrane (moins d'une minute) se produisant après une irradiation par de la lumière bleue [Spalding and Cosgrove, 1989], une irradiation par de la lumière rouge [Ermolayeva *et al.*, 1996], la réception de facteurs de nodulation (Nod) [Ehrhardt *et al.*, 1992] et l'application d'éliciteurs fongiques [Kuchitsu *et al.*, 1993]. Cette dépolarisation permet sûrement l'activation des canaux à cations, ce qui entraîne une augmentation de l'activité des canaux calciques et donc un influx de calcium dans le cytoplasme [Cho and Spalding, 1996 ; Ermolayeva *et al.*, 1997]. D'autres facteurs comme des nutriments organiques ou inorganiques ont une action sur la polarisation de la membrane et donc sur la régulation de la perméabilité de la membrane au calcium. Il a aussi été montré que les interactions entre les microtubules et les canaux modifient l'activité des canaux vis-à-vis du calcium, ce qui prouve que ces derniers sont aussi contrôlés de façon non voltage-dépendante [Thion *et al.*, 1996].

D'autres approches ont aussi montré des influx du calcium dans le cytoplasme par des canaux d'une autre nature que précédemment. Pour les cellules de garde, l'acide abscissique induit des influx de calcium par activation de canaux non sélectifs et voltage-indépendants [Schroeder and Hagiwara, 1990 ; Thiel *et al.*, 1992]. Le flux ionique circulant dans ces canaux est bloqué par l'acide okadaïque (un inhibiteur de phosphatase), ce qui suggère une régulation

de certains canaux calciques par des phosphatases de type 1 ou 2A ainsi qu'une inhibition de l'activité par phosphorylation [Thiel and Blatt, 1994].

1.4.3. Les canaux endomembranaires.

Quatre différents types de canaux calciques endomembranaires ont été identifiés dans les membranes de la vacuole [Allen and Senders, 1997]. Deux types sont des canaux contrôlés par la fixation de ligands : l'inositol 1,4,5-triphosphate [Schumaker and Sze, 1987; Alexandre *et al.*, 1990] et le ribose adénosyl diphosphate cyclique [Allen *et al.*, 1995]. Chez les cellules animales, les récepteurs à ryanodine, dont les propriétés pharmacologiques ressemblent aux canaux ribose adénosyl diphosphate cyclique dépendants, permettent avec les canaux inositol 1,4,5-triphosphate dépendants de contrôler la mobilisation du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique [Muir and Sanders, 1996]. Des micro-injections de ribose adénosyl diphosphate cyclique ou d'inositol 1,4,5-triphosphate dans des cellules de garde ont révélé la capacité de ces deux molécules à entraîner une augmentation de la concentration cytosolique en calcium, démontrant ainsi que les canaux inositol 1,4,5-triphosphate dépendants et les canaux ribose adénosyl diphosphate cyclique dépendants sont bien exprimés de façon constitutive chez les plantes [Gilroy *et al.*, 1990 ; Leckie *et al.*, 1998]. Une autre propriété des canaux inositol 1,4,5-triphosphate dépendants et ryanodine dépendants est le fait qu'il soient activables aussi grâce à une augmentation de la concentration cytosolique en calcium. Ce phénomène étant appelé le relargage de calcium calcium-dépendant (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release) permet une amplification des signaux calciques reçus par la cellule [Taylor and Traynor, 1995]. Or, chez les cellules végétales, le phénomène de relargage de calcium calcium-dépendant n'a jamais été observé dans le cas des canaux ribose adénosyl diphosphate cyclique dépendants ou des canaux inositol 1,4,5-triphosphate dépendants malgré le fait que les pics, les bouffées ou les oscillations de calcium, qui sont des phénomènes nécessitant le relargage de calcium calcium-dépendant soient des observations courantes chez les plantes [Allen and Sanders, 1994 ; Leckie *et al.*, 1998].

Les deux autres types de canaux endomembranaires perméables au calcium sont tous deux voltage-dépendants, l'un contrôlé par une hyperpolarisation de la membrane [Johannes *et al.*, 1992 ; Gelli and Blumwald, 1993 ; Allen and Sanders, 1996], l'autre par une dépolarisation de la membrane [Ward and Schroeder, 1994 ; Schultz-Lessdorf and Hedrich,

1995 ; Allen and Sanders, 1996]. Les canaux contrôlés par dépolarisation sont aussi connus pour être activés par une concentration cytosolique en calcium proche de 600 nM ce qui fait d'eux des candidats potentiels pour le phénomène de relargage de calcium calcium-dépendant [Hedrich and Neher, 1987]. Mais des résultats contradictoires sur la probabilité d'ouverture des canaux sensibles à la dépolarisation ont montré que d'une part, plus la valeur de la différence de potentiel électrochimique du calcium était favorable à une sortie du calcium hors de la vacuole, plus cette probabilité est petite [Pottosin *et al.*, 1997] et que d'autre part, la présence d'ions Mg^{2+} dans le cytoplasme augmente cette probabilité [Cantu *et al.*, 1998], ce qui montre que l'étude des mécanismes de régulation des flux de calcium à travers les membranes est loin d'être terminée.

La vacuole, de part sa taille, semble jouer un rôle très important dans le stockage et le relargage du calcium dans les cellules végétales matures (la vacuole ne se formant que relativement tardivement dans l'évolution d'une cellule après division) [Marty, 1999]. Il semble quand même que la vacuole ne soit pas le seul compartiment cellulaire à pouvoir jouer un rôle dans les systèmes de signalisation liés au calcium. En effet, des mobilisations de calcium intracellulaires ont été imagées dans des tubes polliniques ainsi que dans des poils absorbants de racine, cellules où les vacuoles ne sont pas visibles [Ehrhardt *et al.*, 1996 ; Franklin-Tong *et al.*, 1996]. Un canal situé dans le réticulum endoplasmique de vrilles de *Brionica dioica* a été isolé et caractérisé. Il montre une activité mécanosensible, voltage-dépendante et est inhibé par le gadolinium (un inhibiteur de canaux mécanosensibles) [Klusener *et al.*, 1995]. Des relargages de calcium induits par l'inositol 1,4,5-triphosphate ont aussi été observés à la suite de fractionnement cellulaire sur gradient au niveau du réticulum endoplasmique, ce qui montre bien que cet organite joue aussi un rôle important dans la transduction des signaux calciques [Muir and Sanders ; 1997].

Les rôles physiologiques des canaux inositol 1,4,5-triphosphate dépendants et ribose adénosyl diphosphate cyclique dépendants ne sont actuellement pas vraiment connus mais des études ont montré que l'inositol 1,4,5-triphosphate a un rôle dans la fermeture des stomates [Gilroy *et al.*, 1990], la régulation osmotique [Srivastava *et al.*, 1989 ; Cho *et al.*, 1993], la modulation de la turgescence des cellules moteurs de feuilles par la lumière rouge [Kim *et al.*, 1996] et l'arrêt de la croissance du tube pollinique en cas de réponse d'auto incompatibilité [Franklin-Tong *et al.*, 1996]. En utilisant des micro-injections, il a été montré que l'acide abscissique régule la concentration de ribose adénosyl diphosphate cyclique et que ce dernier

joue un rôle régulateur au niveau de deux gènes induits lors de la réponse à l'acide abscissique. En effet, même si de nombreux événements liés à l'augmentation de la concentration de calcium cytosolique induisent l'activation de gènes, la réponse à l'acide abscissique est bloquée de façon sélective par un antagoniste du ribose adénosyl diphosphate cyclique, le 8-amino ribose adénosyl diphosphate cyclique, mais pas par l'héparine, antagoniste de l'inositol 1,4,5-triphosphate. Cela montre une importante spécificité des voies de signalisation : les canaux utilisent soit une réserve particulière de calcium, soit un relargage spécifique à partir de certains organites en fonction de la réponse [Wu *et al.*, 1997]. D'autres études ont montré que la fermeture des stomates induite par l'acide abscissique dépend aussi bien de l'inositol 1,4,5-triphosphate que du ribose adénosyl diphosphate cyclique et que cette réponse est seulement partiellement bloquée par des inhibiteurs d'adénosyl diphosphate ribosyl cyclase [Leckie *et al.*, 1998].

1.4.4. Les inhibiteurs de canaux calciques et les chélateurs de calcium.

Les inhibiteurs de canaux calciques ont souvent été utilisés pour démontrer l'implication des canaux calciques lors de la transduction des signaux [Polisensky and Braam, 1996]. Les inhibiteurs de canaux calciques ont toujours le gros défaut de ne pas être très spécifiques et donc peuvent entraîner des modifications cellulaires non voulues lors de leur utilisation. Dans la majorité des cas, les inhibiteurs de canaux calciques employés sont le lanthane (canaux du plasmalemme), le gadolinium (canaux mécanosensibles) et le rouge de ruthénium (canaux internes). Souvent utilisés à des concentrations de quelques millimolaires [Luit *et al.*, 1999 ; Knight *et al.*, 1996, 1997 ; Polisensky and Braam, 1996], ces inhibiteurs ont en plus de l'effet escompté des effets secondaires non négligeables comme le blocage des canaux anioniques [Lewis and Spalding, 1998], des canaux potassiques [Terry *et al.*, 1992], et la surexpression des gènes *TCH* dans les cellules non stimulées [Polisensky and Braam, 1996]. Le lanthane entraîne aussi des impulsions transitoires de calcium proportionnelles à la concentration de l'inhibiteur (Figure 6) ce qui est gênant dans le cas d'études de sommation de signaux ou de mise en mémoire [Plieth, 2001]. Une autre stratégie pour étudier les modifications induites par des diminutions locales de la concentration en calcium est l'utilisation de chélateurs comme l'EGTA ou le BAPTA (des molécules qui ne sont pas sensées traverser la membrane plasmique). L'utilisation de ces chélateurs permet d'appauvrir localement la concentration intracellulaire en calcium et de produire des effets proches de

ceux obtenus lors de la présence de gradients de calcium à l'intérieur des cellules. Une autre utilisation de ces chélateurs est le contrôle de la concentration en calcium d'un milieu de culture. En effet, l'ajout de ces molécules permet de dépleted complètement un milieu, ce qui n'est pas forcément le cas en utilisant simplement des éléments ne contenant pas de calcium.

1.5. Les cibles de la signalisation par le calcium.

Les effecteurs des voies de transduction des signaux calciques peuvent être classés en deux catégories : d'une part, les capteurs primaires sensibles au calcium comme les protéines kinases dépendantes du calcium (CDPK) et d'autre part, les substrats activés en aval qui représentent le dernier effecteur de la voie de signalisation. Les substrats en aval de la voie de signalisation peuvent être des canaux ioniques comme cela est le cas dans les cellules de garde où les canaux à anions sont activés lors de la fermeture des stomates, par la concentration cytosolique en calcium et aussi par phosphorylation [Schroeder and Keller, 1992 ; Schmidt *et al.*, 1995 ; Grabov and Blatt, 1997]. De même, les canaux contrôlés par dépolarisation sont aussi activés par le calcium, par le biais de la calmoduline [Bethke and Jones, 1994 ; Schultz-Lessdorf and Hedrich, 1995].

1.5.1. Protéines kinases dépendantes du calcium.

Le calcium n'est pas le seul messenger secondaire utilisé par les cellules végétales pour véhiculer une information. En effet, les métabolites contenant du phosphatidyl-inositol ont un turnover très rapide et sont souvent trouvés dans des voies de transduction. Les voies utilisant le phosphatidyl-inositol activent des phospholipases C qui permettent la libération de deux messagers qui sont le diacylglycérol et l'inositol 1,4,5-triphosphate. Des travaux sur la transduction des *stimuli* chez les plantes ont montré que les concentrations de diacylglycérol et d'inositol 1,4,5-triphosphate varient de façon transitoire durant les mouvements des feuilles [Bachmann *et al.*, 1996], quand les plantes sont soumises à la lumière [Becraft *et al.*, 1996] ou pendant des stress osmotiques [Binder *et al.*, 1994 ; Berberich and Kusano, 1997]. Comme il existe dans le règne animal des voies de transduction utilisant le couple phospholipides et protéines kinases C, des systèmes similaires ont été cherchés chez les végétaux. Des protéines capables d'être régulées à la fois par des phospholipides et par le calcium existent effectivement chez les plantes. Mais leurs structures sont différentes de celles de la famille

des protéines kinases C : les protéines végétales sont activées directement par le calcium sans avoir à utiliser la calmoduline. Ces protéines appelées protéines kinases dépendantes du calcium ou encore protéines kinases ayant un domaine C-terminal ressemblant à la calmoduline sont quasi spécifiques du monde végétal (on les trouve chez certains protozoaires) [Harper *et al.*, 1991 ; Suen and Choi, 1991 ; Zhao *et al.*, 1993]. Leurs structures contiennent un domaine N-terminal capable de lier le calcium, ce qui permet de réguler l'activité de la protéine. Ce domaine contient en général quatre sites *EF hand* qui permettent la fixation du calcium et qui sont très semblables à ceux de la calmoduline. Chez les plantes, des sous-familles de protéines kinases dépendantes du calcium ont été identifiées avec un ou plusieurs sites *EF hand* dégénérés, ce qui permet d'obtenir des protéines sensibles à différentes concentrations de calcium [Lindzen and Choi, 1995 ; Patil *et al.*, 1995]. Les protéines kinases dépendantes du calcium contiennent aussi un domaine d'auto-inhibition ainsi qu'un domaine à activité kinase. En plus de leur régulation par le calcium, certaines de ces protéines sont aussi régulées par les phospholipides et principalement celles qui sont associées à la membrane plasmique [Satterlee and Sussman, 1998 ; Szczegieliak *et al.*, 2000]. Les rôles de la régulation des protéines kinases dépendantes du calcium par le diacylglycérol et l'inositol 1,4,5-triphosphate (ou les phospholipides en général) ne sont pas vraiment connus mais des protéines régulées par les phospholipides ont été mises en évidence chez *Amaranthus tricolor* [Breviario *et al.*, 1995], *Oryza sativa* [Chang, 1996], *Brassica campestris* [Chang *et al.*, 1993] et *Zea mays* [Cho *et al.*, 1991 ; Chang *et al.*, 1992 ; Cho *et al.*, 1994].

Les protéines kinases dépendantes du calcium sont plus connues pour leur capacité à répondre à une augmentation de la concentration en calcium dans le cytoplasme. Chez *Arabidopsis* ainsi que chez le maïs, plusieurs dizaines de protéines kinases dépendantes du calcium différentes ont déjà été identifiées [Hrabak *et al.*, 1996]. Des protéines exprimées chez *E. coli* [Hrabak *et al.*, 1996] ont montré que le calcium pouvait augmenter jusqu'à cent fois l'activité kinase lors de l'ajout de calcium exogène. Certaines protéines kinases dépendantes du calcium présentent aussi des possibilités d'autophosphorylation au niveau de résidus sérine et thréonine [Putnam-Evans *et al.*, 1986]. Certaines cibles de ces protéines sont connues : phosphorylation d'une pompe à protons des racines d'avoine [Schaller and Sussman, 1988], de la protéine intrinsèque du tonoplaste (α -TIP) [Johnson and Chrispeels, 1992], de la nitrate réductase [Bachmann *et al.*, 1996], des canaux chlorure de la vacuole de cellule de garde [Pei *et al.*, 1996], mais malgré tout, le rôle des protéines kinases dépendantes

du calcium dans la transduction des signaux environnementaux n'est pas encore élucidé [Sheen, 1996].

La localisation des protéines kinases dépendantes du calcium est souvent proche de la membrane et il a été montré que ces protéines s'associaient avec les filaments d'actine [Putnam-Evans *et al.*, 1989]. Comme les filaments d'actine sont déjà connus pour être sensibles au calcium par l'intermédiaire de phosphorylations, les protéines kinases dépendantes du calcium ont peut être un rôle dans la régulation de la structuration des filaments d'actine et donc dans le contrôle du cytosquelette de la cellule et des flux cytoplasmiques.

Les substrats des protéines kinases dépendantes du calcium ne sont pas encore parfaitement connus, mais plusieurs études basées sur des test biochimiques *in vitro* ont permis d'identifier comme substrats potentiels les canaux à chlorure et potassique dans les cellules de garde [Pei *et al.*, 1996 ; J. Li *et al.*, 1998a], le canal à noduline [Lee *et al.*, 1995], la saccharose phosphate synthase [McMichael *et al.*, 1995], la EF1- α /phosphatidyl-inositol 4-kinase [Yang and Boss,1994], la pompe à protons de la membrane plasmique [Lino *et al.*, 1998 ; Camoni *et al.*, 1998], la nitrate réductase [Bachmann *et al.*, 1996] et les facteurs de transcription de type bZIP [Meshi *et al.*, 1998]. Mais prouver que l'activité d'un substrat est bien régulée par une protéine kinase dépendante du calcium spécifique *in vivo* reste encore à faire pour mieux appréhender le rôle des protéines kinases dépendantes du calcium dans la transduction des signaux cellulaires.

Contrairement à l'énorme quantité d'isoformes de protéines kinases dépendantes du calcium présente chez les plantes, il est remarquable de voir la pauvreté de gènes codant des homologues de protéines calmoduline dépendantes ou de protéines kinases C, ce qui semble appuyer l'idée que la grande majorité des événements de phosphorylation régulés par le calcium se produisent par le biais des protéines kinases dépendantes du calcium [Satterlee and Sussman, 1998]. Les différentes isoformes de protéines kinases dépendantes du calcium semblent réguler des voies de signalisation distinctes : par exemple, seulement deux à huit isoformes induisent l'activation du promoteur spécifique de la réponse à l'acide abscissique HVA-1 [Sheen, 1996]. De même, d'autres études ont montré la spécificité de certaines isoformes pour certains substrats [Lee *et al.*, 1998]. De plus, les différentes isoformes de protéines kinases dépendantes du calcium ne sont pas activées à la même concentration de

calcium cytosolique, ces seuils d'activation différents permettant une différenciation dans les voies de signalisation. Pour appuyer ce système de séparation des voies de transduction, des protéines kinases dépendantes du calcium ont été identifiées dans différents compartiments mais aussi, soit libres dans le cytosol, soit fixées ou associées à la membrane [Roberts and Harmon, 1992].

1.5.2. Phosphatases et Phospholipases.

Les phosphatases semblent être aussi un type de capteur primaire sensible au calcium. Les courants internes de potassium dans les cellules de garde, qui sont fortement diminués pendant la fermeture des stomates, sont inhibés par la calcineurine (une protéine phosphatase de type 2B) et activés par des antagonistes de cette protéine, des immunosuppresseurs [Luan *et al.*, 1993]. De même, les canaux contrôlés par dépolarisation de la membrane, sans doute impliqués dans les phénomènes de relargage de calcium calcium-dépendant, sont aussi régulés négativement par la calcineurine, ce qui peut constituer une rétroaction pour éviter un déversement trop important de calcium de la vacuole vers le cytoplasme, ou encore être un système de régulation de la fréquence des oscillations de calcium cytosolique [Allen and Sanders, 1995 ; McAinsh and Hetherington, 1998]. Une autre indication sur le fait que le calcium influe sur l'activité de la calcineurine a été trouvée chez *Arabidopsis* : le gène *sos3* code un homologue de sous unité de la protéine calcineurine B de la levure. Les mutants d'*Arabidopsis* sur le gène *sos3* sont hypersensibles à la concentration en sodium et le phénotype normal est presque rétabli si la concentration en calcium est augmentée [Liu and Zhu, 1997, 1998]. Comme les stress osmotiques sont connus pour induire de rapides changements de la concentration cytosolique en calcium, il est possible que la protéine exprimée par le gène *sos3* soit le capteur primaire sensible au calcium dans la voie de transduction des stress osmotiques dus aux sels, mais pas dans le cas des stress hydriques qui entraînent aussi des variations de concentration des ions.

Le fait que les plantes possèdent une activité phospholipase C dépendante du calcium, spécifique des phosphoinositides, suggère un rôle de l'inositol 1,4,5-triphosphate dans le relargage de calcium calcium-dépendant car le fait que l'inositol 1,4,5-triphosphate entraîne la libération de calcium dans le cytoplasme déclenche la production d'inositol 1,4,5-triphosphate [Huang *et al.*, 1995]. Le clonage de gènes de phospholipases C dépendantes du calcium

spécifiques des phosphoinositides chez les plantes a montré que ces protéines étaient bien activées par le calcium et relativement proches des isoformes de phospholipases C δ des mammifères [Kopka *et al.*, 1998]. Une autre preuve de la participation des phospholipases C phosphoinositide spécifiques dépendantes du calcium dans la voie de transduction des signaux calciques est que les inhibiteurs de phospholipases C phosphoinositide spécifiques dépendantes du calcium entraînent la disparition des oscillations de calcium dans le tube pollinique en réponse à l'acide abscissique [Franklin-Tong *et al.*, 1996 ; Staxen *et al.*, 1999]. Dans ces deux exemples, il semble que le calcium code lui-même la dynamique de la propagation de son propre signal, de son amplification et de sa régulation.

1.6. La spécificité des signaux calciques.

L'implication du calcium dans pratiquement toutes les transductions de signaux chez les végétaux pose la question de la spécificité du signal. En effet, comment un seul messager peut-il véhiculer autant d'informations différentes et induire des réponses spécifiques et proportionnelles à l'intensité du *stimulus* environnemental reçu ? L'amplitude, la fréquence, la durée, la localisation à l'intérieur de la cellule et les interactions avec les autres composants cellulaires peuvent être des éléments de contrôle des signaux véhiculés par le calcium [McAinsh *et al.*, 1997 ; Malhó *et al.*, 1998 ; McAinsh and Hetherington, 1998].

Chez les cellules animales, les réponses par modification de l'amplitude de la durée et de la localisation des signaux calciques ont déjà été bien étudiées. L'amplitude et la durée des signaux induisent chez le lymphocyte B une activation différentielle de facteurs de transcription [Dolmetsch *et al.*, 1997]. Des modifications de la fréquence des pics induits par le calcium dans des cellules nerveuses entraînent une différenciation des cellules [Gu and Spitzer, 1995]. De même, la fréquence de pics de calcium détermine le degré de transcription de gènes par l'intermédiaire de facteurs nucléaires dans les lymphocytes T [Li *et al.*, 1998b ; Tang and Othmer, 1995 ; Berridge, 1997]. Des changements de la concentration de calcium dans le noyau de cellules pituitaires de souris induisent des modifications de l'expression de gènes *via* l'adénosine monophosphate cyclique, alors que des variations de calcium dans le cytoplasme ne changent rien [Hardingham *et al.*, 1997]. Enfin, le calcium peut directement agir sur un répresseur de transcription chez l'homme sans même passer par des cascades de phosphorylations [Carrión *et al.*, 1999].

1.6.1. Réponses calciques transitoires.

Des preuves de l'influence des signaux calciques sur l'expression des gènes chez les plantes sont relativement rares. Par contre, les indications sur l'emploi du calcium dans la transduction du signal dans des cas de réponse à des stress environnementaux sont nombreuses : augmentations rapides de la concentration cytosolique en calcium en réponse au toucher ou à un choc de froid dont la provenance est la vacuole et le milieu extérieur [Knight *et al.*, 1991, 1996], des augmentations transitoires de différentes durées en réponse à un stress oxydatif [Price *et al.*, 1994], à des éliciteurs [Knight *et al.*, 1991], à la systémine [Moyen *et al.*, 1998] et aux traitements hypo-osmotiques [Tazawa *et al.*, 1995 ; Taylor *et al.*, 1996 ; Takahashi *et al.*, 1997a].

La plus simple des hypothèses pour expliquer la proportionnalité des réponses induites par les flux de calcium est que ces flux ont des intensités variables et proportionnelles à l'intensité du *stimulus* reçu. Dans des cellules de tabac ou d'*Arabidopsis*, des mesures de la latence entre la réception du *stimulus* et les influx de calcium, la phase d'augmentation du signal, et la durée de l'augmentation de la concentration cytosolique en calcium lors de l'application de onze *stimuli* différents dans les mêmes conditions, ont montré que chaque *stimulus* induit une réponse calcique caractéristique qui lui est propre (Figure 7) [Malhó *et al.*, 1998 ; Plieth, 2001]. Par exemple, le temps de latence entre l'application d'un stress de toucher (ou le vent) est imperceptible, la phase d'augmentation de la concentration cytosolique inférieure à une seconde et la durée du pic de quinze secondes environ, alors que pour une réponse à un choc hypo-osmotique, la phase d'attente est de trente secondes, l'augmentation de soixante secondes et la totalité du signal de cent cinquante secondes. L'intensité de l'élévation transitoire de la concentration en calcium après un choc hypo-osmotique semble être proportionnelle à l'amplitude des différences de concentrations des éléments du milieu de culture lors de l'application du choc [Takahashi *et al.*, 1997a]. Dans les cellules de tabac, un choc hypo-osmotique montre une élévation biphasique du calcium cytosolique, une première phase lente et de faible amplitude, suivie d'une élévation plus importante et plus rapide. Ces deux phases dépendent de la présence de calcium dans le milieu extracellulaire et montrent une certaine sensibilité aux inhibiteurs de pompes à protons du tonoplaste et de protéines kinases, ce qui suggère que les formes des signaux calciques sont contrôlées et régulées de façon complexe. La première phase correspond à un influx de

calcium provenant du milieu extracellulaire alors que la seconde phase semble plus provenir de relargages de calcium à partir des réservoirs internes [Cessna *et al.*, 1998]. Ces données suggèrent aussi l'intervention de mécanismes de phosphorylations indépendants du calcium (car se produisant antérieurement aux influx) dans les systèmes de perception des stress osmotiques : les variations de concentration cytosolique en calcium ne sont donc pas toujours le messager secondaire dans la transduction des signaux environnementaux chez les plantes. D'autres expériences menées chez *Arabidopsis* montrent que l'amplitude des élévations de calcium lors de stress hydriques et oxydatifs est corrélée avec l'ordre de l'application de ces stress, ce qui fait émerger une notion de mémoire des signaux reçus et d'adaptabilité des cellules [Knight *et al.*, 1997, 1998].

Des interrelations encore plus complexes semblent exister entre les modifications transitoires de la concentration cytosolique en calcium et les réponses induites en aval de la transduction chez les plantes. Un stress osmotique généré par du mannitol et un stress osmotique généré par une modification de la concentration des sels du milieu de culture induisent tous deux un influx de calcium dans le cytoplasme d'une amplitude et durée similaire, mais une expression différente du gène *p5cs* qui code une protéine intervenant dans la synthèse de la proline [Knight *et al.*, 1997]. Cela entraîne l'idée que la voie de transduction par le calcium n'est pas la seule pour pouvoir discriminer ces deux signaux. Chez le soja, en réponse à une irradiation à la lumière rouge, le phytochrome contrôlant l'expression du gène codant la chalcone synthase est régulé positivement par le guanidine monophosphate cyclique et négativement par l'ensemble calcium/calmoduline, alors que dans le cas de rayonnements ultra violets, il est régulé positivement par le couple calcium/calmoduline [Frohmeyer *et al.*, 1998]. L'explication de ces effets contradictoires du système calcium/calmoduline dans l'expression du même gène dans la même cellule provient peut être du fait que ces deux signaux liés au calcium n'ont pas la même forme temporelle.

1.6.2. Les oscillations de calcium et les pics répétitifs.

Plusieurs types de cellules végétales répondent à des stress environnementaux par des élévations répétitives ou encore des oscillations de la concentration cytosolique en calcium [Subbaiah *et al.*, 1994 ; McAinsh *et al.*, 1995 ; Ehrhardt *et al.*, 1996 ; Bauer *et al.*, 1997, 1998 ; Schonknecht *et al.*, 1998]. Mais l'observation des variations ou des oscillations de la

concentration en calcium ne prouve pas que celles-ci correspondent effectivement à un codage de l'information et ne résultent pas seulement de la perturbation de l'homéostasie du calcium. Des réponses induites par des oscillations ont été effectivement identifiées dans quelques cas : des élévations répétitives ont lieu dans la réponse aux facteurs de nodulation [Ehrhardt *et al.*, 1996], les gènes d'anoxie sont exprimés après des pics répétitifs de calcium dans les racines d'*Arabidopsis* en anaérobiose [Subbaiah *et al.*, 1994], des oscillations dans la pointe de tube pollinique contrôlées par un gradient de calcium sont corrélées avec la croissance de celui-ci. Des oscillations induites par la concentration du calcium extracellulaire et l'acide abscissique ont lieu dans les cellules de garde. La fréquence et l'amplitude des oscillations de calcium influencent l'ouverture des stomates. Aussi bien l'amplitude que la dynamique de ces oscillations sont dépendantes de la concentration externe en calcium : sur un milieu de forte concentration en calcium (1 mM), les élévations de concentration cytosolique en calcium sont augmentées de façon homothétique d'un facteur un demi (aussi bien en intensité qu'en durée) [McAinsh *et al.*, 1995 ; Staxen *et al.*, 1996].

Un modèle permettant la génération de différents modèles d'oscillations a été proposé avec l'introduction de régulation par des phosphatases dépendantes du calcium et des protéines kinases calcium indépendantes. Les modifications de phosphorylations des molécules permettant les influx et efflux (c'est-à-dire les transporteurs et les canaux calciques) de calcium conduisent à transformer les caractéristiques des oscillations de calcium [Goldbeter *et al.*, 1990 ; McAinsh and Hetherington, 1998].

1.6.3. Les signaux calciques spatialement localisés.

Un autre mécanisme pouvant expliquer la spécificité des signaux calciques nécessite la localisation spatiale dans des régions sub-cellulaires des signaux (Figure 8). Des signaux calciques répétitifs induits par les facteurs de nodulation ont été localisés dans la région nucléaire de cellules de poils absorbants de racines [Ehrhardt *et al.*, 1996], ce qui montre une séparation spatiale avec les signaux apicaux utilisés lors de la croissance des poils absorbants. L'utilisation de l'æquorine dirigée vers différents compartiments cellulaires a révélé des oscillations circadiennes du calcium dans les chloroplastes et le cytoplasme après un transfert des plantes de l'obscurité à la lumière [Johnson *et al.*, 1995]. Une autre expérience menée

chez le tabac a montré une élévation prolongée de la concentration calcique après un choc chaud mais pas de modification au niveau des chloroplastes [Gong *et al.*, 1998].

Chez les cellules animales, il a été mis en évidence des propagations d'ondes de calcium dans des cas de réponse à des *stimuli*. D'après Jaffe [1995], les ondes de calcium s'initialisent à un endroit bien précis de la cellule et se propagent dans la cellule de façon entretenue par les différents compartiments intracellulaires qui libèrent ou pompent le calcium de façon synchrone. C'est seulement chez le *Fucus* que des ondes similaires ont été observées : un stress hypo-osmotique induit dans les cellules du rhizoïde une augmentation transitoire de la concentration cytosolique du calcium qui se propage dans la cellule. Cette onde de calcium naît au niveau de l'apex du rhizoïde et se déplace de façon entretenue grâce à des relargages provenant de réserves intracellulaires sous apicales, à une vitesse de 5 à 10 $\mu\text{m/s}$ [Taylor *et al.*, 1996]. Quelques autres ondes de calcium ont été observées dans des tubes de pollen de *Papaver* et dans des cellules de garde où des courants de calcium centripètes ont été caractérisés [Grabov and Blatt, 1998]. Dans le cas des cellules animales, l'entretien des ondes de calcium provient principalement du réticulum endoplasmique. La présence dans les cellules végétales d'une ou plusieurs vacuoles pouvant représenter jusqu'à 90 % du volume cellulaire peut-elle empêcher la formation de ces ondes de calcium ? En effet, les seuls cas où ces ondes ont été observées chez les végétaux sont des cellules où la vacuole est quasi inexistante. La topologie des cellules végétales est telle que le cytoplasme se présente plus comme une structure bidimensionnelle que tridimensionnelle (dans le cas des cellules animales). En effet, le cytoplasme est rejeté le long de la membrane plasmique (et donc de la paroi cellulaire) en formant une fine couche en périphérie de la cellule, le centre de celle-ci étant généralement occupé par les vacuoles. C'est cette différence d'agencement au sein des cellules végétales qui pourrait entraîner l'absence des ondes de calcium chez les plantes. Les cellules végétales ont donc peut-être évolué en privilégiant un autre moyen de discriminer les signaux calciques, grâce à des libérations de calcium à partir de plusieurs origines cellulaires ou à partir de certains organites [Sanders *et al.*, 1999]. En effet, les flux de calcium successifs à un choc de froid ou hydrique proviennent simultanément de la membrane plasmique (origine extracellulaire) et des vacuoles [Knight *et al.*, 1991, 1997] alors que dans le cas d'un stress oxydatif, le calcium libéré dans le cytoplasme semble provenir directement du cytoplasme (relargage provenant de molécules capables de fixer le calcium) [Price *et al.*, 1994].

1.6.4. Gradients de calcium dans les systèmes à croissance apicale.

Une croissance apicale dans des directions déterminées par des gradients de calcium a été décrite chez différents types de tubes polliniques [Rathore *et al.*, 1991 ; Miller *et al.*, 1992 ; Franklin-Tong 1997], les poils absorbants de racine [Hermann and Felle, 1995 ; Felle and Hepler ; 1997 ; Wymer *et al.*, 1997] et les rhizoïdes des algues [Bronlee and Wood, 1986 ; Brownlee and Pulsford, 1988 ; Shaw and Quatrano, 1996 ; Taylor *et al.*, 1996]. Que ce soit au niveau de poils absorbants ou de tubes polliniques (figure 9), le calcium au niveau de l'extrémité en croissance peut atteindre des concentrations de l'ordre de quelques micromolaires. Des tubes polliniques d'*Agapanthus undulatus* peuvent être orientés lors de leur croissance en fonction d'élévations localisées de la concentration en calcium dans le tube pollinique (par exemple par photorelargage dans le cytoplasme de calcium piégé) [Malhó *et al.*, 1994, 1995 ; Malhó and Trewavas, 1996]. Des pulsations de la concentration cytosolique en calcium au niveau des extrémités en croissance ont été corrélées avec des oscillations de la vitesse de croissance [Messerli and Robinson, 1997], ce qui laisse envisager que la vitesse de croissance est régulée par la fréquence et l'intensité des oscillations de calcium [Holdaway-Clarke *et al.*, 1997]. Des mesures (réalisées à l'aide de microélectrodes sélectives) des variations de la concentration de calcium du milieu avoisinant l'extrémité d'un tube pollinique ont montré que les influx de calcium vers le tube sont en opposition de phase avec les élévations de calcium lors des oscillations. Le calcium utilisé pour les oscillations ne provient donc pas du milieu extérieur directement mais d'une source intracellulaire, les influx de calcium servant peut-être à remplir les réservoirs internes après l'oscillation. Comme on ne trouve pas de vacuole dans les systèmes en croissance, et que le réticulum endoplasmique n'est pas très concentré à l'apex, il semble que ce soit la paroi qui joue un rôle dans la biodisponibilité du calcium lors des oscillations [Lancelle and Hepler, 1992 ; Holdaway-Clarke *et al.*, 1997]. Pour les tubes polliniques, ces oscillations de calcium restent un peu énigmatiques étant donné que la croissance des tubes peut très bien se produire sans l'intervention d'oscillations de calcium [Holdaway-Clarke *et al.*, 1997 ; Messerli and Robinson, 1997].

La mise en évidence de canaux calciques permettant des influx de calcium ainsi que le maintien du gradient de calcium à l'extrémité des tubes polliniques n'a pas encore été réalisé à cause de la difficulté d'effectuer des mesures en Patch-Clamp. Mais des mesures à l'aide

d'électrodes vibrantes spécifiques au calcium ont tout de même montré des influx de calcium de façon préférentielle au niveau des apex de poils absorbants de racine [Hermann and Felle, 1995 ; Jones *et al.*, 1995]. L'ajout de verapamil (un inhibiteur de canaux calciques de la membrane plasmique) dans le milieu environnant de poils absorbants entraîne la dissipation du gradient de calcium apical ainsi que l'arrêt de la croissance, ce qui montre que des canaux calciques sont bien nécessaires pour maintenir le gradient de calcium [Wymer *et al.*, 1997]. De même chez le *Fucus*, des influx de calcium sont nécessaires au maintien du gradient apical [Taylor *et al.*, 1996]. Le gradient de calcium apical semble de plus correspondre à la présence d'actine et de calmoduline au niveau de l'apex du rhizoïde [Henry *et al.*, 1996 ; Love *et al.*, 1997], l'actine servant vraisemblablement à permettre un rapprochement entre la membrane plasmique et la paroi cellulaire. Des expériences sur la polarisation des œufs de *Fucus* ont montré une forte accumulation de calcium au niveau du pôle rhizoïde, avant la formation de la cellule rhizoïde et de la cellule thalle [Berger and Brownlee, 1993], cette augmentation ayant lieu avant la fixation de l'axe polaire (définissant la première division cellulaire) [Pu and Robinson, 1998].

L'origine du gradient de calcium dans les extrémités en élongation n'est pas encore bien comprise et différentes expériences montrent que son rôle n'est pas non plus évident à comprendre : le gradient de calcium ne se met pas en place pas immédiatement au début de la formation de la cellule qui produit le poil absorbant ou le tube pollinique. De plus, si le fait de modifier la concentration locale de calcium cytosolique, de façon à la rendre asymétrique (par l'emploi de ionophores ou au contraire de chélateurs), entraîne une modification de la direction de la croissance du tube pollinique, il n'en est rien pour le poil absorbant. Celui-ci semble en effet poursuivre sa croissance en fonction d'un axe prédéterminé inscrit dans l'architecture du cytosquelette et une modification asymétrique de la concentration en calcium entraîne simplement une modification de la direction qui est tout de suite rattrapée [Miller *et al.*, 1996 ; Wymer *et al.*, 1997 ; Bibikova and Gilroy, 1997 ; Jiang *et al.*, 1997]. En effet, la croissance des poils absorbants semble être dirigée de façon orthogonale à l'axe de la racine correspondante, ce qui entraîne la nécessité de signaux capables de diriger et surveiller cette croissance.

1.7. Le calcium : une molécule de signalisation ubiquiste ?

Mais il reste un doute sur tous ces phénomènes utilisant le calcium. Est-ce que les modifications transitoires de la concentration cytosolique en calcium qui sont enregistrées dans de nombreux cas correspondent vraiment à des signaux et ne sont pas simplement le reflet de modifications cellulaires ? En effet, même si dans de nombreux cas, des impulsions de la concentration en calcium sont enregistrées après l'administration d'un *stimulus* à une plante, il reste de nombreux autres cas où aucune preuve ne corrobore ces observations. De plus, rien ne prouve que ces impulsions soient nécessaires pour produire une réponse chez la plante. Des signaux différents produisent des réponses calciques différentes, ce qui peut permettre un codage de l'information pour la transduction et la réponse cellulaire ; mais il semble que les modifications de concentration en calcium soient plus liées à la forme du *stimulus* (comme par exemple la dérivée dT/dt où T est la température) qu'à la nature du signal. Il est d'ailleurs possible de générer des oscillations de calcium à l'intérieur d'algues en ajoutant de la caféine au milieu de culture (Figure 10). De même, deux signaux différents peuvent générer la même signature de calcium (mannitol et sels). Le calcium n'a pas d'action spécifique comme peuvent l'avoir les hormones, et une variation de concentration n'a peut être pas grand-chose à voir avec la signalisation [Plieth, 2001]. En fait, il est bien connu que le calcium est une molécule capable de stabiliser une membrane altérée ainsi que les faisceaux de structure à l'intérieur du cytoplasme. Le fait de relarguer du calcium dans la cellule après un stress est bénéfique car peut permettre de maintenir la cohésion de la cellule en cas de stress vraiment important ou tout simplement d'augmenter la concentration en calcium de façon préventive. Malgré tous ces arguments contre le calcium comme second messager quasi ubiquiste chez les végétaux, il est quand même troublant de voir combien les cellules végétales ont développé des systèmes de contrôle très précis de la concentration en calcium aussi bien au niveau temporel que spatial, ainsi que de nombreuses molécules (et principalement protéines) directement régulées par le calcium. Si le calcium est effectivement un messager cellulaire, il ne peut pas véhiculer à lui tout seul toutes les informations reçues par la cellule et ne peut pas non plus induire toutes les réponses cellulaires.

II. Les systèmes de transduction des signaux non directement régulés par le calcium.

Le calcium n'est pas la seule espèce chimique à pouvoir transmettre un signal à l'intérieur d'une cellule végétale. Même si le calcium semble être une voie de signalisation obligatoire pour la cellule lors de la transmission d'un *stimulus*, il reste encore beaucoup de plantes chez qui des augmentations transitoires de calcium n'ont pas été montrées. Par analogie avec les systèmes animaux et bactériens, d'autres voies de transduction de signal ont été cherchées chez les plantes. Ainsi, les systèmes à deux composants que l'on croyait propres aux systèmes microbiens ont été trouvés chez les végétaux. De même, les voies de transductions basées sur les protéines kinases (et plus particulièrement les MAPK pour *Mitogen Activated Protein Kinase*), ont aussi été mises en évidence lors de la perception et transmission de *stimuli* dans les cellules végétales. Les MAPK semblent être, comme l'est le calcium, une voie de signalisation quasi obligatoire pour les cellules car des MAPK activées après différents stress ont été trouvées dans de nombreux cas.

Les connaissances sur d'autres systèmes de transmission des signaux fondés sur d'autres méthodes que l'intervention de messagers spécifiques comme les protéines kinases ou le calcium sont en train d'émerger. Ainsi, il semble que des phénomènes électriques et hydrauliques sont capables de traverser une plante pour véhiculer une information. De même, les modifications de la structure même de la cellule végétale peuvent permettre le passage d'informations relatives à des *stimuli*.

II.1. Les Mitogen Activated Protein Kinases.

II.1.1. Les différentes MAP kinases.

Les plantes répondent aux *stimuli* extérieurs en mettant en place toute une machinerie moléculaire et cellulaire complexe. Les *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPKs) sont des éléments clé de ce système de réponses : elles interviennent dans la transduction d'un signal lors d'un stress, au cours du cycle cellulaire, et au niveau du contrôle de la croissance (Tableau 3). La voie des MAPKs fait intervenir de nombreuses molécules dont les principales

sont les MAPKs, les MAPKKs (MAPK kinases), et les MAPKKKs (MAPKK kinases) [Widmann *et al.*, 1999 ; Ligterink and Hirt, 2000].

Les MAPKs appartiennent à la grande famille des serine/thréonine protéines kinases. L'analyse cristallographique de la plupart des MAPKs révèle une grande similitude dans leur structure tridimensionnelle, à savoir une structure en double lobe où le site actif se trouve à l'interface des deux lobes [Zhang *et al.*, 1994]. La boucle d'activation qui forme l'ouverture du site actif est un des plus importants et le moins stable des éléments de la structure secondaire des MAPKs [Zhang *et al.*, 1995]. Cette boucle contient le motif de double phosphorylation TxY (Thréonine-x-Tyrosine), spécifique de ces MAPKs [Payne *et al.*, 1991 ; Gartner *et al.*, 1992]. La phosphorylation de la thréonine et de la tyrosine de ce motif est nécessaire pour l'activation complète des MAPKs.

Les MAPKKs sont des protéines kinases à double spécificité qui activent les MAPKs en phosphorylant les résidus thréonine et tyrosine du motif TxY de ces dernières. Les MAPKKs sont elles mêmes activées par la phosphorylation de deux résidus serine et thréonine conservés [Alessi *et al.*, 1994 ; Zheng and Guan, 1994]. Chez la plupart des MAPKKs, ces acides aminés conservés possèdent le motif S/TxxxS/T. Rossomando *et al.* [1994] ont également démontré qu'outre l'activation des MAPKKs *via* la double phosphorylation précédemment décrite, la phosphorylation d'autres résidus peut réguler négativement l'activité des MAPKKs. Les MAPKKs ont une grande spécificité puisqu'elles n'ont pas d'autres substrats connus que les MAPKs [Seger *et al.*, 1992]. De plus, les MAPKKs n'interviennent normalement que dans une ou deux cascades distinctes de MAP kinases [Robinson and Cobb, 1997], c'est pourquoi, il semblerait qu'elles soient le point de convergence des cascades de MAP kinases en intégrant différents signaux induits dans une voie donnée (Figure 11).

Les MAPKKKs peuvent être classées en quatre grandes familles : la famille des MEKK/STE11 kinases, la famille des Raf kinases, la famille des MLK kinases, et la famille des Mos kinases [Widmann *et al.*, 1999]. La structure des différentes MAPKKKs est très diversifiée, jusqu'à leurs motifs de régulation qui peuvent être différents d'une MAPKKK à l'autre. Parmi ces différents motifs de régulation figurent les domaines homologues à la pleckstrine (domaine PH), les *Src homology 3* (domaine SH3) riches en proline, les motifs doigts zinc, les fermetures éclair à leucine, les sites de liaison des protéines G et de multiples

sites de phosphorylation sur tyrosine et sur sérine/thréonine [Garrington and Johnson, 1999]. Du fait de leurs structures variées, les MAPKKKs peuvent être activées par différents mécanismes comme la phosphorylation par une MAPKKK kinase et une protéine kinase C (PKC), ou par interaction avec les protéines G de la famille Ras et Rho ou encore par activation directe par le biais des systèmes à deux composants [Fanger *et al.*, 1997 ; Wurgler-Murphy and Saito, 1997]. C'est cette hétérogénéité tant au niveau structural qu'au niveau de la régulation caractéristique des MAPKKKs qui confère aux cascades des MAP kinases une flexibilité suffisante pour répondre à un large panel de *stimuli*. Ainsi, contrairement aux MAPKKs qui, de par leur très grande spécificité de substrat ne peuvent intervenir le plus souvent que dans une voie donnée de MAP kinases, une même MAPKKK peut se retrouver impliquée dans plusieurs voies différentes de MAP kinases [Fanger *et al.*, 1997 ; Gustin *et al.*, 1998], voire même activer d'autres voies de protéines kinases [Lee *et al.*, 1997a] (Figure 11).

En aval de la cascade des MAP kinases, la transduction du signal donne lieu à différentes réponses cellulaires. Les MAPKs peuvent être transportées vers le noyau cellulaire pour phosphoryler et par là même activer des facteurs de transcription spécifiques. Elles peuvent également rester dans le cytoplasme pour phosphoryler des protéines associées au cytosquelette, ou encore des enzymes comme les protéines kinases, les phosphatases, et les phospholipases. La phosphorylation de ces différents substrats ne peut se faire que sur des résidus sérine ou thréonine immédiatement suivis d'une proline [Gonzalez *et al.*, 1991].

II.1.2. Rôles de la voie des MAP kinases chez les végétaux.

Les plantes sont exposées à différentes formes de stress mécaniques comme le toucher, le vent, et la pluie. Ces stress sont connus pour induire chez les végétaux diverses réponses physiologiques qui, pour la plupart d'entre elles, consistent en une croissance non homogène, en une réduction du taux de croissance et en un épaississement de la paroi cellulaire.

Une stimulation mécanique des feuilles d'*Arabidopsis* entraîne une accumulation des transcrits des gènes codant une MAPK et une MAPKKK (*AtMPK3* et *AtMEKK1*, respectivement) [Mizoguchi *et al.*, 1996]. Cette réponse au niveau de la transcription est rapide et transitoire avec des différents niveaux d'ARNm commençant à augmenter 5 à 10 minutes après le toucher et atteignant un maximum environ 20 minutes après ce même

toucher. Ces résultats mettent donc en évidence l'implication de la voie des MAP kinases dans la transmission d'un *stimulus* mécanique.

Les connaissances sur le rôle des MAP kinases dans la transduction du signal suite à un stress mécanique ont été renforcées par la mise en évidence de l'activation de SAMK (*stress-activated MAPK*) chez la luzerne dans la minute suivant une stimulation mécanique des feuilles [Bögre *et al.*, 1996].

Un choc, une blessure engendrée par un herbivore ou l'attaque par un agent pathogène, induit toute une série de réponses englobant principalement l'activation des gènes impliqués dans la guérison et l'autodéfense. La guérison d'une blessure fait intervenir tout un ensemble de gènes impliqués dans le cycle et la différenciation cellulaire, alors que l'autoprotection est assurée par l'expression de gènes codant des protéines de réponses à un agent pathogène (PR) et des inhibiteurs de protéases (PIN). Il semblerait que les inhibiteurs de protéases protègent les végétaux contre les insectes et les herbivores en diminuant la digestibilité et la valeur nutritionnelle des protéines des feuilles [Bowles, 1993].

L'acide jasmonique et le méthyl jasmonate (considérés comme des hormones végétales impliquées dans les réponses qui suivent une attaque) sont des médiateurs importants dans la signalisation d'une blessure. Leur action est à la fois locale et systémique [Seo *et al.*, 1997]. Comparée à la réponse systémique, dont deux médiateurs sont la systémine et l'acide jasmonique, beaucoup de choses restent encore à découvrir quant à la perception première de la blessure. De nombreux travaux montrent que les MAP kinases sont impliquées dans la transduction du signal en réponse à une blessure. Seo *et al.* [1995] ont montré qu'une blessure au niveau des feuilles de plant de tabac entraîne une accumulation des transcrits et l'activation de WIPK (*wound-induced protein kinase*) à la fois de façon locale et de façon systémique. L'accumulation rapide des ARNm *WIPK* montre qu'il s'agit là d'une réponse précoce.

La protéine kinase SAMK, très apparentée à WIPK, est également activée à la suite d'une blessure [Bögre *et al.*, 1997]. L'activation de SAMK, dont la cinétique est semblable à celle de WIPK, peut être détectée dès la première minute suivant une blessure au niveau des feuilles de luzerne. L'activation de SAMK est un processus post-traductionnel mais la transcription ainsi que la traduction *de novo* de facteurs protéiques, est nécessaire pour son

inactivation. MP2C, une phosphatase de luzerne de type PP2C, est l'un de ces facteurs protéiques. [Meskiene *et al.*, 1998]. Il semble probable que le gène *SAMK* soit la cible directe de la voie des MAP kinases activée par une blessure. En effet, alors que l'activation de *SAMK* apparaît dans la minute qui suit ce stress, l'accumulation des ARNm *SAMK* n'intervient que 20 minutes après.

Chez le tabac, suite à une blessure, Zhang et Klessig [1998a] ont mis en évidence qu'outre *WIPK*, une autre MAPK, *SIPK* (*salicylic acid-induced protein kinase*), est également activée. Cependant, Zhang et Klessig [1998a] n'ont pu observer, comme pour *WIPK*, une accumulation des ARNm *SIPK* suite à la blessure.

Afin de mieux cerner le rôle spécifique des MAPKs ainsi que leur(s) cible(s) potentielle(s) en aval, l'équipe de Sano [1994 ; 1996] a transformé des plants de tabac en les faisant surexprimer le gène *WIPK*. Sano *et al.* [1994 ; 1996] ont montré que chez certains mutants, dont le gène endogène *WIPK* ne s'exprime pas, une blessure n'entraîne ni l'activation de MAPK, ni l'accumulation des transcrits des gènes *PI-II* inductibles par une blessure et par l'acide jasmonique, et des gènes *PR-I* de protéine basique. Bien qu'aucune augmentation des quantités de l'acide jasmonique et du méthyl jasmonate ne soit observée, ces plantes présentent une synthèse accrue de l'acide salicylique ainsi qu'une accumulation des ARNm *PR-I* et *PR-2* codant des protéines acides (ce type de réponse ne s'observe normalement qu'après une attaque par un agent pathogène). Ces observations indiquent que l'accumulation du méthyl jasmonate et de l'acide salicylique sont deux voies antagonistes l'une de l'autre [Sano *et al.*, 1994-1996]. Les plantes surexprimant *WIPK* présentent une accumulation constitutive des ARNm *PI-II*, ainsi qu'une activation de *WIPK*. De plus, les quantités de l'acide jasmonique et du méthyl jasmonate sont de trois à quatre fois plus élevées que chez le tabac non modifié [Seo *et al.*, 1999]. Ces résultats démontrent clairement que *WIPK* joue un rôle dans la production des jasmonates. Le mécanisme par lequel *WIPK* induit l'accumulation de l'acide jasmonique et du méthyl jasmonate demeure encore inconnu. Cependant, L'équipe de Bergey [1996] a proposé une similitude potentielle avec le mécanisme par lequel sont produit les prostaglandines chez les mammifères. Les prostaglandines sont des molécules de signalisation intervenant dans la réponse à un stress inflammatoire. De plus, la structure chimique des prostaglandines est similaire à celle des acides jasmoniques. Le stress inflammatoire chez les mammifères est signalé par l'activation de MAPK qui phosphorylent ensuite une phospholipase cytoplasmique A2 (cPLA2) [Lin *et*

al., 1993]. La cPLA2 coupe les phospholipides et libère ainsi des acides gras tel que l'acide arachidonique qui sera plus tard transformé en prostaglandines. Ainsi, par analogie avec la synthèse des prostaglandines, l'un des substrats de WIPK pourrait être une enzyme similaire à cPLA2, libérant dans ce cas l'acide linoléique, précurseur dans la production de jasmonates. En fait, la blessure entraîne chez les végétaux l'activation de phospholipases [Lee *et al.*, 1997b]. Non seulement les jasmonates, mais encore leur précurseur qu'est l'acide linoléique, pourraient intervenir en tant que second messenger dans la signalisation d'une blessure puisque les longues chaînes d'acides gras poly-insaturés tel que l'acide linoléique inhibent fortement MP2C, un régulateur négatif de la voie de SAMK chez la luzerne [Baudouin *et al.*, 1999]. Un tel mécanisme pourrait fonctionner comme un rétrocontrôle positif de la voie des phospholipases induite par une blessure, assurant ainsi la régulation en amont de SAMK indépendamment de la stimulation engendrée par une blessure du système MAPK (Figure 12).

Outre les MAPKs, la MAPKK d'*Arabidopsis* AtMEK1 ainsi que son homologue chez la tomate LeMEK1 semblent également jouer un rôle dans la réponse à une blessure [Morris *et al.*, 1997 ; Hackett *et al.*, 1998]. La quantité des ARNm *AtMEK1* augmente 6 heures après blessure des feuilles d'*Arabidopsis*. L'activation tardive de la transcription de *AtMEK1* rend peu vraisemblable que AtMEK1 soit la MAPKK en amont de la voie des kinases induite par une blessure. AtMEK1 doit intervenir dans d'autres processus comme l'initiation du cycle cellulaire. Un tel rôle pourrait expliquer l'expression d'AtMEK1 dans les régions méristématiques [Morris *et al.*, 1997].

Les végétaux doivent faire face à des changements radicaux des conditions abiotiques environnementales. Ces stress abiotiques incluent les basses températures, la sécheresse et le stress osmotique.

AtMEK1 et *AtMPK3* ne sont pas seulement induits transcriptionnellement à la suite d'une stimulation mécanique. Ils le sont aussi suite à un stress hydrique [Mizoguchi *et al.*, 1996]. L'ARNm du gène *AtPK19* codant un homologue de kinase ribosomale S6 s'accumule simultanément sous les mêmes conditions de stress [Mizoguchi *et al.*, 1996]. Il a été montré que les kinases ribosomales S6 sont phosphorylées et activées par les MAPKs chez la plupart des mammifères. Ces derniers résultats pourraient laisser supposer l'existence d'une voie similaire chez *Arabidopsis*, dans laquelle AtPK19 pourrait être phosphorylée et par là même activée par AtMPK3. Ce rôle joué par AtMPK3 chez *Arabidopsis* lors d'un stress hydrique

concorde avec les résultats obtenus par l'équipe de Jonak [1996]. Cette équipe a montré que, chez la luzerne, lorsque celle-ci est soumise à la sécheresse, la protéine SAMK qui est un homologue extrêmement proche de AtMPK3, présente également une régulation positive de son propre gène et est également activée post-traductionnellement. Toutefois, aucune augmentation de la quantité de la protéine SAMK n'a pu être observée suite à une déshydratation [Jonak *et al.*, 1996].

De nombreuses études ont également montré que le choc de froid a un impact important sur l'état de phosphorylation de nombreuses protéines. L'importance du rôle joué par les protéines kinases dans la médiation du signal suite à un stress hypothermique est renforcée par la découverte selon laquelle les inhibiteurs de kinases sont capables d'inhiber de façon remarquable la tolérance à la congélation induite par le froid [Monroy *et al.*, 1993]. L'équipe de Monroy [1998] a également mis en évidence que l'activité de la protéine phosphatase 2A (PP2A) est régulée négativement suite à un choc de froid. Cette découverte fait ressortir le rôle majeur des protéines kinases dans la transduction du signal suite à un stress hypothermique. *AtMEKK1*, *AtMPK3*, *AtPK19*, et *SAMK* réagissent au stress froid de la même manière qu'au stress hydrique [Jonak *et al.*, 1996 ; Mizoguchi *et al.*, 1996]. *AtMAP3Kβ3*, gène codant une MAPKKK d'*Arabidopsis*, présente également une accumulation de son transcrite à la suite d'un stress hypothermique [Jouannic *et al.*, 1999]. En contradiction avec ces résultats, Harding et Wolniak [1998] ont montré que, chez le maïs dont les racines avaient subi un choc de froid, le niveau du transcrite de *ZmMEK1*, codant une MAPKK, est substantiellement diminué.

Chez les végétaux supérieurs, les MAPKs interviennent également dans la transduction du signal suite à un stress osmotique. Un stress hyper-osmotique peut entraîner l'activation de kinases apparentées aux MAPKs chez le tabac [Usami *et al.*, 1995 ; Tena and Renaudin, 1998]. Récemment, l'équipe de Munnik [1999] a montré que, chez la luzerne, des concentrations de sels comprises entre 100 et 500 mM entraînaient l'activation de la voie de SIMK (*salt stress-induced MAPK*). De manière surprenante, des concentrations plus élevées de sels n'activaient non pas SIMK mais une kinase de 35 kDa. Ces travaux révèlent la existence probable de deux osmosenseurs chez la luzerne, un pour des pressions osmotiques modérées, l'autre pour des pressions osmotiques élevées. Chez la levure, au moins trois senseurs pour le stress hyper-osmotique, dont SLN1, ont été mis en évidence. L'osmosenseur SLN1 est un système de régulation à deux composants qui perçoit des concentrations salines

comprises entre 100 et 600 mM [Maeda *et al.*, 1995]. SLN1 active la voie de la MAPK HOG1 chez la levure. Récemment, Urao *et al.* [1999] ont identifié chez *Arabidopsis* une homologue de SLN1. Cette dernière protéine est capable de fonctionner comme un osmosenseur chez la levure et peut par là même agir comme un complément chez les cellules de levure déficientes en SLN1.

Une autre voie MAPK est également impliquée dans la transduction du signal suite à un stress hypo-osmotique. L'équipe de Takahashi [1997b] a fait subir des stress hypo-osmotiques à des cellules de tabac cultivées en suspension. Ces chercheurs ont ainsi pu mettre en évidence l'activation chez ces cellules de trois kinases phosphorylant la MBP de 50, 70, et 80 kDa. La protéine kinase de 50 kDa présente toutes les caractéristiques d'une MAPK. Elle utilise MBP comme substrat et est phosphorylée sur un résidu tyrosine lors de l'activation.

Une étude récente a pu mettre en évidence l'activation de deux protéines de 46 et 50 kDa en réponse à un stress hypo-osmotique chez le tabac. Ces deux protéines présentent toutes les caractéristiques des MAPKs [Cazale *et al.*, 1998]. La kinase de 50 kDa est identique ou extrêmement proche de NtF4, protéine connue pour être activée lors de la phase d'hydratation du pollen [Wilson *et al.*, 1997]. Il faut que l'activation de NtF4 est liée à la réhydratation des grains de pollen tout en étant indépendante de la germination de ces derniers, deux possibilités restent plausibles. La première est que l'activation de NtF4 pourrait avoir une fonction spécifique dans la germination du pollen. La deuxième est que l'activation de NtF4 pourrait être une réponse face au stress engendré suite au gonflement du pollen lors de sa réhydratation [Wilson *et al.*, 1997].

Une autre voie de signalisation utilisant aussi les mécanismes de phosphorylation est connue chez les plantes. Il s'agit d'un système composé de deux modules interagissant ensemble et que l'on retrouve chez les procaryotes et les végétaux (mais pas les animaux). Ces systèmes sont appelés systèmes à deux composants.

II.2. Les histidines kinases (systèmes à deux composants).

Les protéines kinases des végétaux peuvent être divisées en trois principaux groupes : les sérines/thréonines protéines kinases (*Mitogen activated protein kinase kinase kinase*,

protéine kinases dépendantes du calcium), les tyrosines protéines kinases comme les *mitogen activated protein kinase* (provenant certainement d'un ancêtre commun avec le premier groupe) et enfin les histidines protéines kinases qui constituent un groupe que l'on retrouve aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Les histidines protéines kinases font partie d'un système de transduction appelé système à deux composants (*two-components system*), dont le principe de base est une protéine avec un domaine récepteur et un domaine de phospho-transfert ainsi qu'une protéine possédant un domaine accepteur et appelée régulateur de réponse. Ce système repose donc sur deux protéines, l'une généralement membranaire avec un domaine de phosphorylation cytoplasmique et l'autre capable d'induire une réponse particulière.

La protéine récepteur est capable de s'autophosphoryler sur un résidu histidine du domaine protéine kinase et donc de s'autoréguler. Quand une molécule signal (comme une hormone végétale par exemple) vient se fixer sur le domaine récepteur, le domaine kinase est alors activé et transfère le groupement phosphate de l'histidine à un résidu aspartate de la protéine de régulation de réponse : cette ensemble est donc aussi appelé phosphorelais histidine-aspartate. Une fois la protéine de régulation de réponse activée, elle va à son tour induire une réponse (comme l'activation de voie de MAPK) [Parkinson and Kofoed, 1992 ; Appleby *et al.*, 1996 ; Mizuno, 1998 ; Sakakibara *et al.*, 2000]. Une des caractéristiques du système à deux composants est de ne pas induire une amplification du signal comme cela est le cas pour les cascades de MAPK, ce qui nécessite que le signal reçu ait une intensité et une durée suffisantes.

Des protéines histidines kinases ont été clonées chez les plantes (Tableau 4) comme *Arabidopsis* [Chang *et al.*, 1993 ; Hua *et al.*, 1995 ; Kakimoto, 1996 ; Hua *et al.*, 1998 ; Sakai *et al.*, 1998], la tomate [Payton *et al.*, 1996 ; Lashbrook *et al.*, 1998] et *Rumex palustris* [Vriezen *et al.*, 1997]. Une particularité des végétaux est d'y trouver des systèmes à deux composants constitués protéine unique ayant le rôle de récepteur et de régulateur de réponse comme c'est le cas pour le récepteur à éthylène d'*Arabidopsis* ETR1. De même, il a été trouvé chez *Arabidopsis* une troisième composante qui intervient dans le contrôle des systèmes à deux composants, il s'agit d'une histidine phosphatase capable de réguler l'activité de plusieurs systèmes [Miyata *et al.*, 1998 ; Suzuki *et al.*, 1998 ; Imamura *et al.*, 1999]. L'évolution a donc doté les végétaux de systèmes de communication à deux composants ainsi

que de dérivés de ces systèmes constitués d'une protéine (le système bactérien étant simplement toujours constitué de deux protéines).

Les systèmes à deux composants sont impliqués dans plusieurs voies de transduction des signaux environnementaux chez les végétaux ; actuellement deux voies de transduction de phytohormones et une pour le stress osmotique ont été étudiées.

Il existe une famille de récepteurs à l'éthylène chez *Arabidopsis* composée de cinq protéines ETR1, ETR2, EIN4, ERS1 et ERS2. Ces récepteurs ont une activité histidine kinase mais aussi un domaine régulateur de réponse contenant un résidu aspartate. Une fois le domaine de réponse activé, il y a activation de la protéine CTR1 qui est une *mitogen activated protein kinase kinase kinase*, et donc activation d'une cascade de kinase. Les récepteurs semblent avoir des répartitions différentes selon les tissus ainsi que des niveaux de sensibilité différents, ce qui permet de réguler de plusieurs façons le signal éthylène [Bleecker, 1999].

Les cytokines permettent la régulation de nombreux processus comme la division cellulaire, la dormance apicale, la photosynthèse, la sénescence des feuilles et la recherche et l'utilisation des nutriments [Schmülling *et al.*, 1997]. Même si les effets des cytokines commencent à être connus au niveau cellulaire, notamment l'activation de certains gènes, seules quelques données montrent que les systèmes à deux composants sont utilisés dans les voies de transduction cellulaire. La voie de l'azote inorganique régulée par les cytokines est pour le moment la seule voie à avoir été étudiée. En présence d'azote dans le milieu environnant les racines, il y a émission de cytokines vers les feuilles pour mettre en place la machinerie biochimique capable d'utiliser ce nutriment (activation de gènes comme celui de l'acide ribonucléique polymérase I [Gaudino and Pikaard, 1997], de la cycline δ [Soni *et al.*, 1995], de l'anhydrase carbonique [Sugiharto *et al.*, 1992], et de la Rubisco [Lerbs *et al.*, 1984]). Une dizaine de régulateurs de réponse impliqués dans la voie de transduction des cytokines ont été identifiés mais seul un récepteur à cytokines, cloné chez *Arabidopsis*, présente effectivement une activité histidine kinase [Kakimoto, 1996].

Les seuls travaux effectués pour rechercher des systèmes à deux composants impliqués dans le contrôle de la pression osmotique portent sur l'homologie de séquence entre un gène de la levure codant un osmosenseur et le gène d'*Arabidopsis athk1* ayant une activité histidine kinase [Urao *et al.*, 1999].

II.3. Transmissions hydrauliques et électriques.

Si la transmission des signaux cellulaires se produit principalement grâce au calcium et aux différentes protéines kinases, la communication dans la plante entière peut se produire selon plusieurs voies. La voie principale est hormonale et peut utiliser les systèmes vasculaires pour se propager. Cette voie a été déjà très longuement étudiée et de nombreuses hormones sont déjà bien caractérisées (éthylène, acide abscissique, acide jasmonique, systémine et autres phytohormones). Une autre voie nettement moins étudiée chez les végétaux est la transmission des signaux induits par des blessures par des voies hydrauliques et électriques. Par exemple, chez *Vitis vinifera*, une brûlure sur l'extrémité d'une feuille entraîne l'apparition de deux signaux de nature différente qui vont traverser pratiquement la plante entière : premièrement, un signal hydraulique mesurable au niveau de la tige des feuilles par une augmentation transitoire du diamètre de celles-ci et deuxièmement, un signal électrique mesurable par des électrodes [Mancuso, 1999]. Ces deux signaux sont de nature fondamentalement différente et ont des caractéristiques spécifiques. Les signaux hydrauliques, appelés potentiels de variation, ont une amplitude (environ 40 mV) et une vitesse de propagation (environ 3 mm/s) qui diminuent avec l'augmentation de la distance du point de blessure à celui de la mesure. Sous une humidité relative de 100 %, le signal disparaît, ce qui tend à prouver sa composante hydraulique (les potentiels de variation étant des ondes hydrauliques se produisant vraisemblablement dans le xylème). Les variations de pression hydraulique créées par les mouvements d'eau génèrent aussi des signaux électriques, probablement consécutifs à des influx de calcium au niveau des cellules, dus à l'ouverture de canaux mécanosensibles à cause de contraintes imposées à la membrane plasmique [Ramahaleo *et al.*, 1996 ; Stakovic *et al.*, 1997]. Ces signaux électriques générés au niveau des cellules peuvent peut être jouer un rôle dans la transmission de l'information du stress à toutes les cellules de la plante.

Les autres signaux (appelés potentiels d'action) qui traversent la plante lors de la perception d'un *stimulus* de blessure sont de nature électrique et se propagent de façon entretenue par des mécanismes dépendant de l'ATP puisqu'ils disparaissent sous une atmosphère d'azote (en condition d'anoxie, il y a disparition de l'activité des pompes dépendantes de l'ATP). La vitesse de propagation dans la plante (environ 100 mm/s) et

l'amplitude du signal (environ 40 mV) sont constantes dans toutes les parties de la plante. Ces signaux diffèrent des potentiels de variation par quatre points : ils ne peuvent pas traverser les tissus morts, ils existent même si l'atmosphère est saturée d'eau, aucune variation de diamètre des tiges de la plante n'est enregistrée, et enfin l'amplitude et la vitesse de propagation sont constantes [Mancuso, 1999].

Les rôles de ces deux voies de signalisation de nature différente dans la plante entière sont encore mal connus, mais il semble plus que probable que le fait d'informer toute la plante d'une attaque (herbivores par exemple) ou d'un stress lésant permet de générer des réponses adaptées, une plante n'étant pas un simple agencement de cellules qui réagissent séparément aux *stimuli* mais bien une entité avec des moyens de signalisation cohérents et des stratégies de réponse.

III. La mémorisation des signaux environnementaux chez les plantes.

Dans leur milieu naturel, les plantes sont soumises à de nombreux stress biotiques ou abiotiques. Ces différents *stimuli* peuvent intervenir à n'importe quel moment de la vie de la plante et souvent simultanément. Il semble évident que les végétaux ne font pas que répondre simplement à un *stimulus* d'une façon préétablie par l'organisme (génétiquement par exemple) mais sont capables de s'adapter et de modifier leurs réponses en fonction de leur vécu (c'est-à-dire des *stimuli* déjà rencontrés). Cette adaptation nécessite une fonction d'enregistrement des *stimuli* déjà perçus et une possibilité de modifier les réponses cellulaires suite à ces enregistrements. Chez *Arabidopsis*, des modifications de la réponse calcique suite à un stress osmotique sont visibles, grâce au système *æquorine*, si les plantules ont subi au préalable des stress oxydatifs ou osmotiques [Knight *et al.*, 1997]. Cela signifie que les informations relatives à un même *stimulus* peuvent être véhiculées de façon différente en fonction de l'histoire de la plante (des *stimuli* déjà reçus). Les expériences menées sur ce modèle ont montré que si le stress précédant est un stress oxydatif, la réponse calcique consécutive au stress osmotique est plus faible, alors que l'inverse se produit lorsqu'il s'agit d'un stress osmotique précédant le deuxième stress osmotique. La plante est donc capable de stocker une information et de modifier sa réaction aux stress suivants. De plus, il a été montré que ce système d'intégration des signaux est proportionnel à l'intensité du stress déjà subi au préalable, ce qui nécessite un système de mémoire cellulaire complexe avec la possibilité d'intégrer les signaux dans le temps.

III.1. Exemples de mémorisations des signaux environnementaux.

Actuellement, quatre exemples indiquent que les plantes sont capables de mémoriser un signal pendant plusieurs jours et de ne produire la réponse à ce signal qu'en cas de rappel produit par un autre phénomène.

III.1.1. La modification de la croissance symétrique des bourgeons

axillaires chez *Bidens pilosa* L.

Lorsque de jeunes plantules de *Bidens pilosa* L. sont encore au stade de la croissance et que les seules feuilles sont les cotylédons (environ trois semaines de culture), le fait de couper le bourgeon apical entraîne la levée de la dominance apicale et la croissance des bourgeons axillaires (situés au niveau des cotylédons). Cette croissance est symétrique, c'est-à-dire que de manière statistique, il n'y a aucune croissance préférentielle d'un bourgeon axillaire par rapport à l'autre [Desbiez *et al.*, 1984 ; Thellier *et al.*, 2000]. Par contre, si on applique des blessures à l'aide d'une aiguille sur l'un des cotylédons avant la levée de la dominance apicale, il y a disparition de la croissance symétrique au profit, en grande majorité, de la croissance du bourgeon axillaire opposé au cotylédon blessé (Figure 13). Ce phénomène ne se produit qu'en cas de la levée de la dominance apicale, car dans le cas contraire, si la plante n'est pas décapitée, la croissance continue normalement malgré les blessures [Desbiez *et al.*, 1984, 1987a, 1991c, 1994]. Cette information de modification de la croissance symétrique peut être stockée dans la plante pendant plusieurs jours. En effet, si le *stimulus* de blessure est appliqué à l'un des cotylédons et que l'apex n'est coupé que quatorze jours plus tard, il n'y a aucun affaiblissement de la croissance préférentielle du bourgeon axillaire opposé [Desbiez *et al.*, 1984], ce qui montre qu'une information peut rester stockée puis être rappelée par un autre événement. Mais un autre facteur semble aussi avoir une importance capitale dans la rupture de la croissance symétrique des bourgeons axillaires de *Bidens*. En effet, pour que les bourgeons se développent de façon asymétrique, il faut que les plantules soient cultivées sur un milieu ioniquement très pauvre (0.1mM de KCl) sans quoi cette rupture ne se produit pas. De même, l'ajout de chélateur de calcium dans le milieu de culture augmente considérablement l'effet d'asymétrie de croissance ce qui semble montrer que le calcium joue un rôle dans la révélation du stress subi au niveau des cotylédons [Desbiez *et al.*, 1987a]. De plus, il a été montré que la rupture de la symétrie de croissance est proportionnelle à l'intensité du stress subi par le cotylédon (plus le nombre de piqûres est important, et plus le bourgeon axillaire opposé à ce cotylédon démarre le premier sa croissance).

III.1.2. La modification de la croissance de l'hypocotyle de *Bidens pilosa* L. et de la tomate.

Il a été montré qu'une légère blessure (de petites piqûres appliquées avec une pointe de verre émoussée) infligée sur l'un ou les deux cotylédons produit une diminution significative du taux d'allongement de l'hypocotyle de *Bidens* [Desbiez *et al.*, 1987b, 1991a, 1991b] ou de tomate [Lefèvre *et al.*, 1993] mais seulement quand les plantules ont été cultivées sur un milieu nutritif dilué et non pas quand elles ont été cultivées sur un milieu standard. Un signal d'inhibition de croissance pourrait donc être exprimé par les plantes blessées seulement dans des conditions ioniques appropriées. De même, le stockage du signal a été montré. Par exemple, quand les cotylédons de plantules de *Bidens* (âgées de 6 jours) cultivées sur un milieu nutritif ont été piquées, aucune inhibition significative de la croissance d'allongement de l'hypocotyle n'est enregistrée, mais quand les plantes stressées ont été transférées sur un milieu contenant de l'eau désionisée le 7ème ou le 8ème jour, alors l'inhibition de croissance a immédiatement eu lieu [Desbiez *et al.*, 1987b, 1991b]. Avec des jeunes plants de tomate de 8 jours, les expériences semblables ont montré qu'un signal d'inhibition de croissance pourrait rester stocké dans les plantes, sans réduction de son intensité, avant l'application des conditions ioniques permettant son expression [Lefèvre *et al.*, 1993].

III.1.3. La thigmomorphogénèse de la bryone.

La thigmomorphogénèse est une réponse par modification de la croissance d'une plante en réponse aux *stimuli* mécaniques externes [Jaffe, 1973]. Par exemple un frottement doux de l'entre-nœud terminal de *Bryonia* cause une inhibition sévère de son allongement. Parmi les mécanismes biochimiques sous-jacents, le métabolisme de l'éthylène et un certain nombre d'activités peroxydase liées au métabolisme de la lignine sont particulièrement modifiés [Boyer *et al.*, 1979, 1983 ; de Jaegher *et al.*, 1985]. Par exemple, l'activité peroxydase contre la syringaldazine est plus importante dans les entre-nœuds stimulés que dans ceux non stimulés [Bourgeade *et al.*, 1989] et peut ainsi être employée pour tracer l'expression de la stimulation mécanique de la plante. Il a été observé que cette activité peroxydase était relativement stable au niveau des entre-nœuds non stimulés et dans les cals produits à partir de ces entre-nœuds, alors que la même activité était approximativement deux fois plus élevée dans des entre-nœuds frottés et dans les deux premières générations de cals

produits à partir de ce dernier. L'activité a ensuite diminué progressivement au cours de repiquages successifs pour atteindre le niveau d'activité des échantillons non stimulés. Ces expériences montrent qu'un signal généré par la stimulation mécanique peut être stocké dans l'entre-noeud et dans les cals qui en dérivent pendant une durée importante avant de disparaître.

III.1.4. Induction des méristèmes épidermiques chez le lin.

Plus récemment [Verdus *et al.*, 1996, 1997 ; Thellier *et al.*, 1997], il a été montré dans notre laboratoire qu'il est possible d'induire la formation de méristèmes (Figure 14) dans l'épiderme de l'hypocotyle de plantules de lin (*Linum usitatissimum* L., var Ariane) sous l'effet de deux *stimuli*, l'un mécanique et l'autre, une déplétion transitoire (typiquement deux jours) de la concentration de calcium dans le milieu de culture. Pour cela, le milieu de culture est remplacé par un milieu dans lequel tout le calcium a été substitué par du potassium (ce qui n'entraîne qu'une augmentation modérée de la concentration de cet élément, déjà abondant dans le milieu), la concentration des autres ions, en particulier celle des ions métabolisés étant maintenue constante. Un tel traitement n'affecte pas de façon visible à l'œil nu l'aspect des plantes qui sont parfaitement saines et ont une vitesse de croissance identique à celle d'un témoin n'ayant pas subi de déplétion en calcium. Cependant, des observations microscopiques montrent que se développent dans l'épiderme de l'hypocotyle, des méristèmes qui peuvent évoluer vers des bourgeons. Les méristèmes se forment à partir de la base de l'hypocotyle puis vers l'apex, tout en restant produits dans la moitié (le plus souvent le tiers) inférieure de l'hypocotyle. Cette production est déclenchée par la déplétion en calcium (sans déplétion le phénomène n'existe pas) et elle s'échelonne sur plusieurs jours ; elle se produit tout au long de l'année et est soumise à un rythme saisonnier. Les premières divisions cellulaires amorçant les méristèmes ont lieu dans des cellules épidermiques ordinaires, dans la partie basique de l'hypocotyle. Les pseudo poils et les cellules stomatales ne se sont jamais divisés, mais la formation de méristème arrive fréquemment dans le voisinage proche de stomates. L'état à quatre cellules qui est facilement identifié par l'observation par microscopie photonique est l'état du premier développement du méristème pris en considération. Le modèle d'induction des méristèmes épidermiques permet de révéler si une plante a subi un stress (Figure 15, courbe a). En effet, sans stress, la déplétion en calcium ne produit pas de méristèmes (Figure 15, courbe d). De plus, le fait d'appliquer plusieurs stress successifs avant la déplétion en

calcium augmente la quantité de méristèmes produits, si bien qu'il semble que les plantules de lin peuvent stocker de façon additive un signal et ne produire la réponse qu'une fois que la plantule a été « sollicitée » par la déplétion. Les autres avantages de ce modèle sont la mise en œuvre très simple des études. En effet, il suffit de soumettre des plantules de lin à un stress, de révéler ce stress à l'aide de la déplétion en calcium et enfin de poursuivre la croissance jusqu'à l'apparition des méristèmes. Cette mise en œuvre simple a d'ailleurs permis de mettre en évidence l'additivité de stress de nature différente (mécanique et hydrique) au niveau de la production des méristèmes, l'effet saisonnier sur cette production ainsi que la mémorisation des *stimuli* pendant plusieurs jours avant leur expression [Verdus *et al.*, 1997]. En effet, comme le montre la figure 15, le signal perçu par les plantules de lin (le stress de repiquage) peut être révélé par la déplétion calcique plusieurs jours (ici, 4 et 8 jours) après l'application du *stimulus*. Cette expérience prouve que le lin est capable de stocker une information pendant plusieurs jours sans aucune perte de signal, ce qui nécessite un système de « mémorisation » des *stimuli* perçus (Figure 15, courbes b et c).

III.2. Le stockage de l'information.

Dans ces exemples, il est frappant de constater que le statut ionique du milieu de culture joue un rôle non négligeable dans le rappel des *stimuli* stockés par la plante. Le fait de diminuer de façon transitoire la concentration en calcium dans le milieu de culture aurait une action d'hypersensibilisation de la plante aux *stimuli* [Plieth, 2001], ce qui entraîne que tous les stress subis avant la déplétion sont alors exprimés par la plante d'une façon beaucoup plus importante que la normale. De plus, Verdus *et al.* [1997] ont montré que la production de méristèmes épidermiques chez le lin était importante si le *stimulus* mécanique était appliqué quelques heures après le début de la déplétion jusqu'à deux jours après cette déplétion. Cela montre bien que la déplétion en calcium met la plantule de lin dans un état permissif où la production de méristèmes est possible, alors que naturellement un tel stress ne modifie pas la croissance. La déplétion en calcium semble donc entraîner une période d'hypersensibilité pendant laquelle tout *stimulus* est amplifié et produit un effet quasi similaire à l'effet d'un stress lésant grave (comme l'ablation d'un cotylédon). Du fait que le calcium a un rôle de protecteur de la membrane plasmique, le dérèglement de l'homéostasie du calcium intracellulaire induit par la déplétion en calcium est sans doute la cause de cette hypersensibilité. Puisqu'un signal reçu peut être exprimé par une plante plusieurs jours

seulement après son administration tant que le phénomène de révélation n'a pas été appliqué, il semble évident que les plantes ont développé un système de stockage de l'information ainsi que d'intégration des signaux reçus (les différents stress étant souvent additionnés lors des réponses). On a proposé des mécanismes de stockage impliquant des kinases capables de s'autophosphoryler pour produire un commutateur moléculaire qui peut stocker indéfiniment une information, malgré le turnover des molécules constituant ce commutateur [Lisman, 1985]. Un mécanisme semblable, impliquant un commutateur constitué de kinases dépendantes du calcium, a été suggéré par Trewavas [1986] pour expliquer la maintenance à long terme de la dormance des graines. Chez les plantes, les protéines kinases dépendantes du calcium sont impliquées dans les premiers événements de transduction de signal et ont une capacité d'autophosphorylation [Roberts and Harmon, 1992]. Enfin, des modèles de mémorisation impliquant des protéines kinases animales ainsi que des phosphatases au niveau du cerveau commencent à être de plus en plus détaillés et impliquent plusieurs dizaines de type de protéines à la place de deux comme cela est le cas pour les modèles de commutateurs de Lisman et Trewavas [Micheau and Riedel, 1999].

D'autres découvertes qui peuvent expliquer le stockage d'un signal concernent l'implication possible de la paroi cellulaire comme un réservoir pouvant contenir l'information stockée déterminant le destin de cellule pendant le développement de la plante [Roberts, 1994 ; Brownlee and Berger, 1995]. La validité d'une telle hypothèse est soutenue par des expériences utilisant la microchirurgie laser lors du développement de zygotes de *Fucus* [Berger *et al.*, 1994]. Après l'ablation de la cellule rhizoïde dans un embryon à deux cellules, les divisions cellulaires successives du thalle initial produisent une cellule fille en contact avec la paroi résiduelle de la cellule rhizoïde supprimée, ce qui aboutit à la dédifférenciation de cette cellule fille en une cellule rhizoïde. Un mécanisme possible pour le stockage du signal pourrait être la modification de la matrice extracellulaire et de ses composants par des activités enzymatiques. Si ces activités enzymatiques sont sous contrôle ionique, la fréquence et la durée des mouvements ioniques, associés à la perception des différents *stimulus*, produiraient alors différentes modifications de la matrice extracellulaire, permettant finalement à la plante de produire une réponse appropriée, liée aux *stimuli* environnementaux qu'elle a reçus.

Un autre support possible de l'information reçue peut aussi être l'ADN. En effet, les plantes disposent d'un génome énorme (environ dix fois plus grand que celui des

mammifères) dont la partie codante est très faible (quelques % seulement). Des études ont montré que le taux de méthylation des cytosines est de l'ordre de 30 % en moyenne pour les plantes. Ces méthylations de cytosines joueraient un rôle dans l'extinction de certains gènes [Meyer, 1999], dans la régulation de la totipotence des cellules [Lambé *et al.*, 1997], ainsi que dans la structure tridimensionnelle de l'ADN [Thorne, 1998]. Des expériences menées sur des cellules de pomme de terre cultivées dans un milieu normal ou dans un milieu riche en sels ont montré que les cellules adaptées aux grandes concentrations de sels avaient un degré de méthylation des cytosines de 16 % supérieur aux cellules non adaptées [Sabbah *et al.*, 1995]. La méthylation de l'ADN pourrait donc aussi jouer le rôle de support de l'information (information qui de plus, serait susceptible de se transmettre pendant plusieurs générations, comme cela est le cas dans l'exemple des cals de bryone).

Enfin, il ne peut être exclu que le stockage d'un signal ne correspond pas à la modification d'une ou quelques espèces moléculaires, mais implique plutôt un changement de la connectivité d'un réseau complexe de processus (c'est-à-dire la modification des rapports fonctionnels entre les molécules) arrivant probablement dans les différents compartiments de la cellule et même dans des cellules et des tissus différents. L'information stockée alors serait un état global de la plante et le stockage des signaux environnementaux une propriété intégrative de la plante [Verdus *et al.*, 1997].

IV. Effets des rayonnements électromagnétiques à une puissance non thermique sur les organismes vivants.

Les rayonnements électromagnétiques font partie de notre environnement quotidien. Depuis le champ électromagnétique terrestre aux réseaux hertziens, les ondes électromagnétiques sont omniprésentes pratiquement à toutes les fréquences. Il est bien connu que les rayonnements électromagnétiques influent sur les organismes même à des seuils non thermiques [Bertheaud *et al.*, 1975 ; Golant *et al.*, 1994]. Est-ce que ces interactions ne sont que des modifications aléatoires des composants du vivant, ou bien existe-t-il une cohérence dans les relations matière vivante – ondes électromagnétiques ?

IV.1. Mesure des champs électromagnétiques et action sur les constituants biologiques.

Dès que l'énergie d'un champ électromagnétique reçue par un corps, de nombreux facteurs influencent la nature des effets potentiels des ondes sur les organismes vivants. Plus l'énergie reçue augmente, plus le risque d'apparition de pathologie augmente. Pour certaines fréquences, l'impact éventuel dépend de la nature de l'onde (pulsée ou non). La forme, la taille et la composition du corps interviennent aussi dans la détermination de la quantité d'énergie absorbée (dès lors il est normal que les expériences réalisées sur des petits animaux (des rats par exemple) ne soient pas transposables sans discernement à l'homme, d'où la prudence avec laquelle il faut interpréter les résultats et le risque de certaines affirmations basées uniquement sur des études en laboratoire). Les phénomènes de résonance doivent aussi être pris en compte dans les effets potentiels des ondes électromagnétiques : par résonance, on entend la petite quantité d'énergie fluctuante qui, en s'additionnant en phase avec des énergies existantes, amplifie considérablement les effets initiaux. La résonance explique aussi des phénomènes d'antenne : ainsi certains rapports entre taille du sujet et taille de la longueur d'onde sont favorables au transfert d'énergie entre les rayonnements et l'organisme vivant.

Les ondes électromagnétiques sont susceptibles d'engendrer de nombreux effets cellulaires comme des modifications de perméabilité membranaire. Nos cellules sont limitées par des membranes peu perméables aux molécules hydrophiles. Certaines protéines

(perméases, pompes, canaux, etc.) règlent ces échanges entre l'intérieur des cellules et le milieu extracellulaire. Le fonctionnement de ces protéines peut être influencé par des champs électromagnétiques [Liburdy and Penn, 1984 ; Allis and Sinha, 1981 ; 1982]. De même, les phospholipides semblent être sensibles aux ondes électromagnétiques, ce qui entraîne des modifications de leurs alignements au sein des membranes cellulaires [Bond and Wyeth, 1986 ; 1987 ; Liburdy and Penn, 1984 ; Liburdy, 1986]. Les ondes électromagnétiques peuvent aussi entraîner des modifications de la structure de certaines enzymes provoquant ou inhibant des réactions chimiques [Robertson and Astumian, 1990 ; Chiabrera *et al.*, 1984]. Ces ondes peuvent provoquer une production de radicaux libres même pour des radiations non-ionisantes [Steiner and Ulrich, 1989; McLauchlan and Steiner, 1991].

IV.1.1 Evaluation de l'exposition à un rayonnement électromagnétique.

Pour tester expérimentalement un mécanisme d'interaction, l'étape préliminaire est l'évaluation des intensités électriques et magnétiques des champs, ainsi que celle de la densité électromagnétique *in situ* (dosimétrie). Au niveau macroscopique, les générateurs de champs externes et les systèmes d'exposition sont très bien caractérisés quand ils fonctionnent dans un milieu comme l'air ou des solutions pures. Mais quand un échantillon biologique, un spécimen de tissu, une culture de cellules ou n'importe quel milieu biologique est soumis à un rayonnement électromagnétique, la mesure ou le calcul des paramètres réels des champs devient très difficile. Des mesures directes [Pilla *et al.*, 1983] sont seulement possibles dans un nombre limité de cas, à cause de la complexité des membranes, du nombre de composés différents et des tailles impliquées. Un calcul théorique est la seule approche fiable dans le cas d'organes vivants. Les méthodes de mesures sont bien établies, parce qu'elles reposent sur les équations classiques de Maxwell et sur l'observation qu'à l'échelle microscopique, les composés biologiques se comportent de façon linéaire, s'ils sont exposés à des champs de faibles intensités [Fricke, 1953; Grodzinsky, 1983; Schwan, 1985]. *In vivo*, des mesures de champs ont été réalisées sur des animaux, mais elles sont limitées par leur nature invasive [Stuchly and Stuchly, 1985]. Extrapoler des mesures effectuées sur des tissus morts aux conditions existant *in vivo* a été possible dans quelques cas, comme pour le tissu osseux [Kosterich *et al.*, 1983, 1984]. De nouvelles approches sont à l'étude, basées sur des techniques non invasives dans lesquelles des systèmes vivants sont soumis à l'action d'un

champ électromagnétique approprié. La tomographie à potentiel appliqué [Berntsen and Bach Andersen, 1991] et la tomographie de diffraction des micro-ondes sont actuellement à l'étude [Caorsi *et al.*, 1991; Hagman and Levin, 1990] et plus particulièrement les techniques fondées sur les transformés de Fourier [Broquetas *et al.*, 1991; Bolomey *et al.*, 1991]. Ces méthodes qui doivent être améliorées ont une importance primordiale pour la caractérisation *in vivo* de tissus biologiques, pour certaines applications comme la mesure de l'hyperthermie et la création de directives pour les normes de sécurité. Malheureusement, ces méthodes de mesures des rayonnements électromagnétiques ne sont pas applicables à tous les composés biologiques ni à l'ensemble du domaine des fréquences intéressantes.

IV.1.2. Actions des champs électromagnétiques sur les constituants biologiques.

Au niveau cellulaire et subcellulaire, l'interaction entre les cellules et un champ électromagnétique s'exerce sur les charges électriques libres du système biologique. Il est important de souligner que les forces agissant sur ces charges dépendent seulement du champ électromagnétique (la somme des champs endogènes et exogènes) et des caractéristiques électriques de la particule chargée (atome ou molécule) ; par contre, la dynamique de ces particules (vibrations, déplacements, rotations) dépend aussi d'autres propriétés (la masse, le type de particule : atomique ou moléculaire, liaisons chimiques).

Les mécanismes d'interaction au niveau microscopique dépendent essentiellement de l'ensemble des charges de la particule impliquée, c'est-à-dire si elle est unipolaire (positive ou négative) ou si sa charge est dipolaire (la charge totale est neutre). Dans des systèmes biologiques, les charges unipolaires sont principalement des ions, tandis que les autres sont essentiellement des molécules d'eau et des protéines neutres. Des atomes et des molécules avec ces deux sortes de charges peuvent exister dans un système biologique : par exemple, des protéines acides et basiques peuvent avoir, et une charge dipolaire et des caractéristiques unipolaires. La cellule elle-même peut être vue comme une particule dipolaire dans certains cas.

La quantité énorme de données expérimentales sur les effets biologiques des rayonnements de faible intensité doit être corroborée par les modèles physiques qui

permettent d'interpréter les expériences au niveau microscopique. Un tel besoin devient plus urgent à cause de l'augmentation des expositions aux rayonnements électromagnétiques. Dans l'étude de l'interaction des champs électromagnétiques avec les systèmes vivants, la conclusion principale qui peut être tirée est que la cellule est le site primaire d'interaction. La plupart des effets cités dans la littérature se réfèrent aux changements du comportement de la cellule en termes de changements de sa structure, de sa réponse aux *stimuli* électriques ou chimiques, dans la capacité de croissance cellulaire.

IV.1.3. Perturbation des mesures de champs électromagnétiques en laboratoire.

On peut remarquer que les expériences sur les cultures de cellules *in vitro* ont en général négligé le fait que tous les incubateurs disponibles dans le commerce produisent des champs électromagnétiques dus aux systèmes de chauffage et aux échanges gazeux à programmation électronique dont sont équipés les incubateurs [Liburdy *et al.*, 1993]. Des variations considérables existent, selon les types d'incubateurs sur le marché. Des champs magnétiques fluctuants sont générés durant l'action momentanée des bobines de commande des vannes de gaz des incubateurs et durant les impulsions passagères de chauffage du système thermostatique à eau maintenant la température dans l'enceinte de l'incubateur. De plus, quelques incubateurs ont des panneaux de portes chauffés électriquement. Tous ces champs ont une fréquence de 50/60 Hz (réseau électrique) et / ou des composantes à extrêmement basses fréquences. Leurs profils varient significativement au cours du temps. Un autre problème significatif réside dans le fait que ces champs alternatifs peuvent rayonner selon des configurations spatiales variables au sein de l'incubateur. La plupart, sinon tous les incubateurs, ont leur équipement de programmation électronique monté sur le plan supérieur de l'incubateur. Les cultures de cellules placées sur les plateaux supérieurs sont exposées à des champs plus importants que celles qui sont placées sur les plateaux inférieurs. Il faut donc rester conscient des risques d'artéfacts expérimentaux dus à ces champs générés par les instruments de laboratoire.

IV.2. Exemples d'effets des rayonnements électromagnétiques à une puissance non thermique.

Un grand nombre d'études des effets des rayonnements électromagnétiques sur les organismes vivants (et principalement dans le domaine des micro-ondes) ont été faites. Seuls quelques exemples seront détaillés dans différentes gammes de fréquence des rayonnements électromagnétiques non ionisants.

IV.2.1. Effets des rayonnements à très basse fréquence.

L'équipe de Liburdy a montré que les champs à extrêmement basses fréquences influencent l'activation des enzymes, l'expression des gènes, la synthèse des protéines et la prolifération cellulaire [Liburdy *et al.*, 1993 ; Liburdy, 2000 ; Losher and Liburdy, 1998]. Les champs électromagnétiques à extrêmement basses fréquences semblent modifier des éléments de la transduction des signaux localisés sur la membrane cellulaire, et influencent ainsi les événements à l'intérieur de la cellule *via* une cascade de transduction [Liburdy *et al.*, 1993]. Toutes les études concernant l'interaction des champs électromagnétiques à extrêmement basses fréquences avec les cellules vivantes aboutissent au concept de l'existence de cascades de transduction de signaux. Il s'agit là d'un mécanisme dont la plausibilité est évidente. Liburdy *et al.* ont mené plusieurs expérimentations selon des méthodologies différentes. Elles mettent en évidence des réponses cellulaires aux champs électromagnétiques à extrêmement basses fréquences, à partir des phénomènes au niveau de la membrane cellulaire, tels des flux d'ions calcium [Liburdy, 1999 ; 2000], jusqu'aux effets indirects comme l'activation des gènes, la prolifération cellulaire et en fin de parcours, la cancérogenèse [Losher and Liburdy, 1993]. Les résultats de recherches effectuées sur les modifications de concentration en calcium indiquent que des augmentations de concentration de calcium et de pH intracellulaires sont toutes deux amplifiées durant la transduction des signaux, en présence de champs électromagnétiques à extrêmement basses fréquences [Yost and Liburdy, 1992 ; Walleczek and Liburdy, 1990].

En plus des modifications de concentration en calcium, les auteurs ont étudié sur des lymphocytes de thymus de rat les taux de transcription et de traduction du gène *c-myc*. Les résultats indiquent de façon indiscutable une augmentation de 4 fois la concentration en ARN

messenger ainsi qu'en protéine c-MYC lors de l'exposition aux champs électromagnétiques d'une fréquence de 60 Hz [Liburdy *et al.*, 1993]. Cela montre que les effets des champs électromagnétiques à extrêmement basses fréquences sur les deux processus de transduction de signaux (influx calcique et augmentation du taux de c-MYC et de son ARNm) sont liés. En se basant sur le rôle du calcium dans la cascade de transduction de signaux, les auteurs apportent une preuve réelle de l'existence d'un mécanisme d'interaction dans lequel les champs électromagnétiques à extrêmement basses fréquences déclenchent l'influx calcique au niveau de la membrane cellulaire et conduisent à des modifications de la transduction des signaux.

IV.2.2. Effets du champ magnétique terrestre.

Les recherches les plus intensives de l'influence des champs magnétiques sur l'orientation animale ont été effectuées chez les oiseaux. Les oiseaux sont capables d'utiliser le champ magnétique de la Terre pour s'orienter en se référant à l'angle de déclinaison plutôt que la polarité du champ. Il semble que le pigeon voyageur peut déterminer sa position géographique en employant une carte de double coordonnée dans laquelle au moins une des deux coordonnées est magnétique. Néanmoins, le résultat de toutes ces expérimentations est incertain parce que la recherche de récepteurs magnétiques chez l'animal a jusqu'ici échoué. Une hypothèse valable est que des mécanismes de perception pourraient être basés sur la force liée à $\mathbf{v} \times \mathbf{B}$.

Les requins et les raies emploient des récepteurs électriques (*ampullae* de Lorenzini) pour détecter la force magnétique mais, dans tous les autres organismes la recherche des mécanismes sensoriels de réception a échoué. Certaines bactéries aquatiques sont une exception (par exemple *Aquaspirillum*) qui présentent un comportement de magnéto-tactisme quand elles se déplacent le long des lignes de force géomagnétiques. Chaque bactérie contient une chaîne protéique contenant environ vingt domaines de cristaux de magnétite (Fe_3O_4) qui opèrent comme un dipôle magnétique biologique. Des domaines de magnétite ont été trouvés chez les abeilles, les chauves-souris et dans quelques cellules humaines [Kirschwink *et al.*, 1985, Kirshwink, 1992] mais jusqu'à présent aucun mécanisme ne peut expliquer comment cette magnétite pourrait fournir à l'animal une boussole. Phillips et Borland [1992] proposent

un mécanisme de boussole magnétique dépendant des photorécepteurs de l'animal capables de réagir au champ magnétique terrestre ($5 \cdot 10^{-5}$ T).

IV.2.3. Effets des micro-ondes sur les organismes vivants.

Plusieurs types de réactions physiologiques de micro-organismes ou d'organismes pluricellulaires ont été mis en évidence à la suite d'une irradiation à des micro-ondes d'une puissance non thermique (Tableau 5). Par exemple, à une fréquence de 41 GHz, les micro-ondes modifient la croissance de la levure *Saccharomyces cerevisiae* [Grundler and Kaiser, 1992], ou encore la croissance d'*E. coli* à des fréquences de 66, 71 et 73 GHz (Figure 16) [Berteaud *et al.*, 1975 ; Webb and Booth, 1969], les micro-ondes induisent la synchronisation des divisions cellulaires de la levure *S. carlbergensis* [Golant *et al.*, 1994], ainsi que l'induction du prophage λ (un virus d'*E. coli*) [Webs, 1979].

Parmi les générateurs de micro-ondes, les téléphones portables (GSM) sont des émetteurs à 900 MHz et 1800 MHz à une puissance de 2 W avec une largeur de bande autour de l'onde porteuse de 20 MHz. Etant donné les polémiques qui existent autour des effets de ces générateurs de micro-ondes, plusieurs études scientifiques ont été menées à ce sujet.

Des expériences portant sur des sujets humains ont montré que l'exposition de l'hémisphère droit du cerveau au champ électromagnétique d'un téléphone cellulaire GSM pendant 35 minutes provoque une augmentation de l'activité sympathique de l'intérieur vers la périphérie avec une augmentation de la pression sanguine au repos de 5 à 10 mm de mercure (donc de une demie à une unité de tension artérielle). Cette augmentation est vraisemblablement due à une vasoconstriction. La régulation de la pression sanguine régie par l'arc baroréflexe (réflexe répondant à une surpression) n'était pas influencée durant les tests standard de la fonction autonome [Braune *et al.*, 1998]. Si aucune conclusion n'est tirée de cette expérience, il faut souligner le fait que le rayonnement électromagnétique d'un téléphone portable produit un effet sur l'homme.

L'équipe du professeur Bastide a déjà montré que l'exposition continue d'embryons de poules aux champs électromagnétiques émis par des postes de télévision et par des moniteurs vidéo d'ordinateurs augmentait le nombre de morts parmi les embryons [Youbicier-

Simo, 1997]. Une autre étude encore non publiée mais qui a défrayé la chronique est une reproduction de ce protocole mais en utilisant un téléphone portable (Bosch, Cartel SL 2G2, Germany). Cette étude a été effectuée pour estimer les effets des champs électromagnétiques émis par des téléphones cellulaires sur le développement d'embryons de poules. Deux groupes de 60 œufs chacun ont été mis en incubation (21 jours à $38 \pm 1^\circ \text{C}$, à 45-55 % d'humidité, dans l'obscurité permanente) dans les conditions d'exposition électromagnétique suivantes : groupe témoin (sans téléphone) ; groupe exposé (24 h / 24 h d'exposition à un téléphone cellulaire en fonction et placé face vers le bas, à 10 mm au dessus des œufs). Le téléphone cellulaire utilisé irradie dans la bande des fréquences radio 900 MHz à une puissance de 2 W. La mortalité des embryons a été évaluée en mirant les œufs et en chiffrant les embryons morts par intervalles de 2 jours, depuis l'état embryonnaire du 3ème jour jusqu'à l'état embryonnaire du 13ème jour puis en ouvrant ensuite les œufs non éclos à partir du 20^{ème} jour. Dans le groupe exposé, l'exposition aux champs électromagnétiques était accompagnée d'une augmentation de la perte d'embryons durant toute la période d'incubation, tandis que des variations perceptibles dans le groupe témoin se produisaient principalement à la fin de l'incubation. De plus, le taux total moyen de mortalité pour les expériences était 6 fois plus élevé dans le groupe exposé aux champs électromagnétiques que dans les groupes témoins comparés (72,3 % contre 11,9 %). La distribution des embryons morts dans les groupes exposés était essentiellement restreinte à une zone se situant autour de la source de champs électromagnétiques (ici, le téléphone cellulaire), ce qui contraste avec la distribution éparse dans les groupes témoins. Ces expériences démontrent que l'exposition aux radiations électromagnétiques émises par les téléphones cellulaires augmente la mortalité lors du développement embryonnaire.

Ces expériences menées avec des téléphones portables ne prouvent aucunement un quelconque danger pour l'homme lors de leur utilisation. En effet, même si la mortalité d'embryons de poule augmente au cours d'une irradiation continue par les micro-ondes, aucune de ces conclusions ne peut être transposée à l'homme sans prudence.

IV.3. Théorie des interactions entre les ondes électromagnétiques et le vivant.

Le fait que de nombreuses expériences d'exposition d'un organisme à des ondes électromagnétiques montrent qu'il y a des effets biologiques (même s'ils ne sont pas toujours reproductibles) rend nécessaire la compréhension des interactions entre les rayonnements et les constituants des êtres vivants. Que des ondes électromagnétiques modifient, en fonction de leur longueur d'onde et de leur puissance, des composés organiques est parfaitement accepté, mais que les effets de ces rayonnements déclenchent des voies de transduction de signaux environnementaux, comme cela est le cas pour les rayonnements à très basse fréquence, fait naître une interrogation sur les systèmes de perception des organismes. Comment des cellules peuvent-elles subir des modifications cohérentes qui activent les voies de transduction des signaux environnementaux lors d'une exposition à une onde électromagnétique ? La probabilité que la longueur d'onde reçue par une cellule corresponde exactement à la fréquence absorbée par une molécule de signalisation est faible, et étant donné la largeur du spectre des micro-ondes, il est troublant de remarquer que ces effets sont tout de même souvent mis en évidence par les expériences. Des théories ont été élaborées pour expliquer comment les cellules vivantes peuvent réagir de manière cohérente aux ondes électromagnétiques.

IV.3.1. La théorie du Champ L (L-Field).

Benoît et Biat-Chrétien [Allix, 1852] ont cherché à mettre en évidence l'existence de relations à distance chez les animaux, en utilisant des escargots. Après s'être procurés 52 escargots, ils ont formé 26 couples pour créer des liens de complicité entre deux escargots. Sur chaque paire, ils ont écrit une lettre de l'alphabet, deux A, deux B, etc. Un jeu d'escargots étiqueté a été envoyé en Amérique et l'autre conservé à Paris. A un moment défini, à Paris, une décharge électrique a été appliquée à un escargot, par exemple un escargot du couple E. Simultanément l'autre escargot E en Amérique a réagi en montrant une sorte de comportement irrégulier. Plusieurs escargots ont été choqués et il était ainsi possible de transmettre un message simple par « le télégraphe d'escargot » aussi appelé Boussole Pasilalinique Sympathique. Cette expérience n'a jamais été acceptée par la communauté scientifique.

A la suite de nombreuses expérimentations qui corrélaient des champs électriques naturels avec le développement et la régénération de certains organismes, Lund [1947] montra que des champs électromagnétiques externes peuvent modifier la morphogenèse de ces organismes. La théorie du Champ L (ou L-Field pour Life-Field) [Burr and Northrop, 1937] vient du fait que des champs électromagnétiques naturels existent dans tous les organismes et peuvent être un facteur clé dans la morphogenèse. Le Champ L peut contenir des informations nécessaires pour permettre la formation d'une structure tridimensionnelle dans les êtres vivants. Ce champ a d'abord été formulé en tant que gradients de potentiels ou de courants chimiques, ce qui correspond au point de vue de la physique à des champs électromagnétiques. Les réponses cellulaires modifient sans cesse ces champs électromagnétiques internes et la réciproque est vraie dans cette théorie [Burr and Northrop, 1939].

Dans sa grande généralité, la théorie du Champ L fait ressortir l'importance de la communication électromagnétique entre les cellules, aussi bien en terme de champs électriques qu'en terme de rayonnements électromagnétiques. Les champs électromagnétiques sont alors considérés comme fondamentaux et essentiels dans le contrôle et les processus de l'organisation cellulaire des systèmes biologiques. Pour le moment, les seules investigations possibles sont des mesures externes de champs, des différences de potentiel, et l'étude des effets produits lors de l'application d'un champ externe. Le but de cette théorie est de développer des modèles informatiques, fondés sur les possibilités de mesures actuelles, pour mathématiser les champs électromagnétiques naturels à l'intérieur d'une cellule vivante. Larter et Ortoleva [1981] ont déjà proposé un modèle capable de décrire des mécanismes du développement précoce faisant intervenir les systèmes de stockage d'une information, la conservation ou la rupture de la symétrie, et les mécanismes non-linéaires impliqués dans un système auto-organisé par l'action d'ondes électromagnétiques.

Pour étayer cette théorie, Burr trouva de nombreuses corrélations entre des processus biologiques (ovulation, cancer, développement...) et des modifications spécifiques des caractéristiques électriques des organismes [Burr *et al.*, 1937 ; Burr and Hovland, 1937 ; Burr *et al.*, 1938c]. Burr formula alors le concept du Champ L en des termes de différences de potentiels. Le développement d'électrodes vibrantes permit la mesure de champs électriques extrêmement faibles, en temps réel, sur des systèmes biologiques, ce qui permit de faire

évoluer la théorie [Northrop and Burr, 1937 ; Burr, 1944]. Burr énonce la théorie du Champ L de cette façon : « *The fundamental basis of this theory is that the pattern of organization of any biological system is established by complex electro-dynamical field which is in part determined physico-chemical components and which in part determines the behaviour and orientation of those components. This field is electrical in the physical sense* ». Cette théorie sera ensuite reprise par Jaffe en 1981 pour une formulation plus moderne au vu des progrès des mesures et l'augmentation des données expérimentales à ce sujet.

A partir de cette théorie, des expériences ont été menées sur le rôle des champs électromagnétiques internes dans les phénomènes de régénération [Kurtz and Schrank, 1955 ; Smith, 1979 ; Borgens *et al.*, 1979c,d], de développement des embryons [Nuccitelli, 1986], et dans l'apparition des cancers [Burr *et al.*, 1940 ; Langman and Burr, 1949 ; Yamasaki *et al.*, 1995]. De ces données expérimentales, il ressort que les champs bioélectromagnétiques peuvent être un support de l'information indispensable à la vie. Mais actuellement, aucune preuve directe de l'existence d'un champ bioélectromagnétique ayant un rôle primordial dans le déroulement de la vie n'a pu être apportée.

IV.3.2. la théorie de l'excitation cohérente de Fröhlich.

Contrairement à la théorie précédente, la théorie de l'excitation cohérente est fondée sur des modèles physiques très bien connus et transposés aux cellules vivantes. Cette théorie énonce que les composants d'une cellule vivante peuvent, dans certaines conditions, se comporter comme des ensembles complexes de façon cohérente (c'est-à-dire que les mouvements des molécules ne correspondent plus simplement aux mouvements dus aux effets thermiques) faisant apparaître des structures dont les oscillations sont en phase [Fröhlich, 1968]. Concrètement, si on considère un ensemble de molécules (par exemple des protéines) dans une cellule vivante, ces molécules peuvent avoir des comportements correspondant à ceux de dipôles. Sous l'influence d'un champ électromagnétique (externe ou interne) ou d'une autre forme d'énergie (thermique par exemple), ces dipôles vont se mettre à osciller. Dans certains cas, énergétiquement favorables, les dipôles vont vibrer en phase et il est alors possible de considérer que les champs électromagnétiques créés par n dipôles (d'après la loi de Lorentz) ne sont plus qu'un seul champ n fois plus important correspondant à un seul dipôle. Ainsi, une organisation cohérente de l'excitation des molécules se met en place à un

niveau d'équilibre différent de celui correspondant aux vibrations thermiques des molécules. Ce nouvel état d'équilibre présente une excitation cohérente, et a la faculté de stocker l'énergie non plus sous forme de chaleur, mais sous forme d'une onde vibratoire. Cet état des molécules en phase est favorisé par le champ électrique de la membrane (environ 10^5 V/cm) et la présence de liaisons hydrogènes qui sont des dipôles liés aux molécules. Les calculs de Fröhlich ont montré que cet état d'excitation cohérente se produit aux alentours des fréquences de 10^9 à 10^{11} Hz, ce qui correspond au domaine des micro-ondes [Fröhlich, 1968].

L'état d'excitation cohérente des molécules biologiques n'est possible que pour certaines conditions énergétiques. Ainsi, si l'énergie apportée au système est insuffisante, les molécules vont se comporter comme dans le cas de l'agitation due à la température. De même, si l'énergie apportée au système est trop importante, ce même état est de nouveau obtenu. Par contre, si l'énergie du système correspond à une valeur comprise entre ces deux états, la formation de l'état d'excitation cohérente est alors possible. Dans cet état, les molécules en phase n'ont plus vraiment d'identités électromagnétiques propres et se comportent comme un seul et même ensemble. Pour faire une analogie, cet état correspond au phénomène de condensation de Bose-Einstein pour les particules quantiques. Lorsque les molécules biologiques sont en phase, des phénomènes de résonance peuvent se produire, ce qui donne naissance à un champ électromagnétique complexe d'une forte intensité (proportionnelle au nombre de molécules en phase) contenant des harmoniques. Fröhlich considère alors que cet état est tout à fait capable de correspondre à une source d'information pour les cellules vivantes, ce qui permet par exemple l'émergence et la cohésion de structures tridimensionnelles dans les cellules. Cet état d'excitation cohérente est vu comme un phénomène naturel au sein des cellules vivantes qui d'ailleurs émettent dans certain cas des ondes électromagnétiques dans le domaine des micro-ondes [Fröhlich, 1978].

Les effets à des niveaux non thermiques des rayonnements électromagnétiques externes sur les cellules vivantes sont alors compréhensibles grâce à cette théorie [Fröhlich, 1980]. En effet, si une cellule contenant des molécules n'étant pas à l'état d'excitation cohérente reçoit des ondes électromagnétiques à la fréquence correspondant à celle de l'excitation des molécules, l'état de ces molécules peut se modifier et devenir cohérent, ce qui modifie obligatoirement la structure cellulaire et donc le comportement de la cellule (la synchronisation de la croissance de la levure peut s'interpréter sur cette base [Golant *et al.*, 1994]). De même, si une cellule contient déjà une structure cohérente et que cette structure

reçoit une énergie de vibration en phase trop importante (même si l'effet est non thermique), la structure va alors disparaître, ce qui modifie aussi la cellule et donc son comportement.

Cette théorie fondée sur de nombreux calculs ainsi que des études expérimentales importantes est parfois acceptée dans le monde scientifique, car elle permet d'interpréter les effets des rayonnements électromagnétiques de puissance extrêmement faible, sur les organismes, et fait émerger la notion d'une interdépendance entre l'état d'excitation des molécules cellulaires (c'est-à-dire le champ électromagnétique d'une cellule) et le comportement de cette cellule, comme par exemple, son activité enzymatique [Fröhlich, 1975]. Cette théorie permet aussi d'associer une notion de « mémoire » à un champ électromagnétique cellulaire. En effet, quand une structure est dans un état d'excitation cohérente, la « mémoire » est en position 1 et quand cette structure cohérente disparaît, la « mémoire » est en position 0. Cette idée pourrait fort bien expliquer les phénomènes de mémorisation de certains organismes.

Deuxième Partie

Méthodes expérimentales

Résultats et Discussion

I. Matériels et méthodes.

I.1. Conditions de culture des plantes.

Deux espèces de plantes ont été utilisées lors de ces études : *Linum usitatissimum* var. Ariane et *Arabidopsis thaliana*.

Les conditions de culture pour les plantules de lin sont détaillées dans le Matériels et Méthodes des **Publications 1, 3 et 4**. Brièvement, les plantules de lin sont cultivées sur une grille de nylon (recouverte éventuellement d'une gaze inerte dans le cas de la culture de plantes pour l'extraction de protéines) placée dans une boîte de culture en polystyrène cristal de façon à permettre le contact des plantules avec un milieu de culture liquide pour plante supérieure (milieu normal, Annexe 1). Chaque boîte contient environ 150 plantules de lin. Le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours. Après six jours de culture (trois à l'obscurité correspondant à la germination et trois en lumière continue dans une chambre de culture à 22°C) les plantules sont soumises aux différents *stimuli* (§ I.2). Pour les analyses par 2-DE, seuls les hypocotyles ont été prélevés à -20°C après congélation des plantes dans l'azote liquide, la gaze facilitant la récupération de l'hypocotyle congelé. Pour la production de méristèmes après stimulation, les plantes sont soumises à une déplétion calcique par substitution du milieu normal par un milieu sans calcium (Annexe 1) pendant 48 h (ou 72 h pour l'imagerie SIMS). Après ce temps les plantes sont à nouveau cultivées sur un milieu normal. Les détails figurent dans le matériels et méthodes des **Publications 3 et 4** et le paragraphe § I.2.

Des boîtes de Pétri contenant des filtres sans cendre et stérilisés ont été imbibées avec du milieu de culture normal (identique à celui utilisé pour les plantules de lin) et des graines d'*Arabidopsis thaliana* stérilisées (à l'alcool et l'eau de Javel) ont été déposées après imbibition. Après une croissance de trois semaines, les plantules ont été soumises à un *stimulus* : choc de froid ou irradiation (voir **Publication 5**).

1.2. Application des différents stimuli.

1.2.1 Stimuli appliqués au lin pour l'analyse protéomique.

Les effets de différents types de *stimuli* ont été étudiés par analyse protéomique de l'hypocotyle de lin. Il s'agit : 1) de *stimuli* mécaniques administrés sous forme d'un stress de repiquage ou d'une blessure légère produite par compression de l'hypocotyle, 2) d'un choc de froid (**Publications 1 et 3**) et 3) d'une irradiation par des micro-ondes à des niveaux non thermiques (**Publication 3**). Nous avons également étudié les changements du protéome de l'hypocotyle de lin induits par la déplétion calcique du milieu de culture (en condition de stress minimum), l'EGTA et le lanthane.

Pour le stress de repiquage, les plantules âgées de six jours sont transférées une à une, (en les saisissant avec précaution au niveau de la crosse hypocotylaire) d'une boîte à une autre. Pour l'extraction des protéines, les plantules sont laissées dans cette deuxième boîte pendant des temps s'échelonnant de une minute à deux heures, de façon à obtenir une cinétique. Les plantules sont ensuite congelées une à une (c'est-à-dire dans le même ordre que lors de l'application du *stimulus*) dans l'azote liquide et stockées à -80°C jusqu'à l'extraction des protéines. Pour la production des méristèmes les plantules sont laissées en place pendant environ 3 semaines. Le stress de compression de l'hypocotyle est effectué de la même manière que le *stimulus* de repiquage sauf qu'au moment du transfert d'une boîte de culture à l'autre, les plantules sont comprimées au niveau de l'hypocotyle entre le pouce et l'index pour produire un stress lésant. Dans cette dernière étude, la récolte des plantes a uniquement été effectuée dix secondes et dix minutes après le stress.

Pour le choc de froid, les grilles de nylon portant les plantules sont transférées avec précaution de leur boîte à une autre boîte contenant le milieu de culture refroidi à 4°C ; elles y sont laissées pendant une minute. Les grilles sont ensuite replacées sur une boîte contenant un milieu à 22°C. Celles destinées au comptage des méristèmes y sont laissées. Celles destinées à l'analyse protéomique sont reprises et immergées dans l'azote liquide à différents temps pour obtenir une cinétique (**Publication 1**).

L'effet d'une irradiation de 2 heures par des ondes électromagnétiques de fréquence 900 MHz provenant d'un téléphone portable (Nokia 7110 ; **Publication 3**) a été étudié sur des plantules de lin âgées de 6 jours. L'irradiation a été réalisée en disposant le téléphone portable au dessus d'une boîte de plantules (voir le Matériels et Méthodes de la **Publications 3**). Les plantules ont ensuite été récoltées et congelées dans l'azote liquide (**Publication 3**).

Nous avons étudié les changements du protéome de l'hypocotyle de lin induits par : 1) une déplétion calcique de 12 h, 2) l'EGTA et 3) le lanthane. Pour la déplétion calcique, les grilles portant des plantules non stimulées sont transférées sur une boîte contenant un milieu de culture sans calcium (mais de même force ionique et de même osmolarité pour ne pas induire de choc osmotique, Annexe 1). Elles y sont laissées pendant 12 heures avant d'être récoltées et congelées dans l'azote liquide. Les plantules congelées sont stockées à -80°C en attendant leur utilisation. Pour l'étude des effets sur le protéome de l'EGTA et du lanthane, les grilles portant les plantules sont transférées d'une cuve contenant le milieu de culture normal à une cuve contenant le milieu de culture sans calcium additionné d'EGTA 2,33 mM ou bien contenant un milieu de culture sans phosphate additionné de lanthane 10 μ M (voir Annexe 1). Après trois heures, les plantules sont transférées sur un milieu normal pour, soit continuer la croissance pendant dix minutes, soit subir un choc de froid comme décrit précédemment et être récoltées au bout de neuf minutes après l'application du choc de froid.

Enfin des plantules de lin ont été cultivées pour les mesures de l'activité kinase de l'extrait protéique brut. Les graines sont mises à germer pendant trois jours à l'obscurité puis la croissance des plantules est poursuivie pendant trois jours en lumière continue. Les plantules sont congelées 5, 10 et 20 minutes après le début de l'application d'un stress de repiquage (voir ci dessus) ou sans avoir subi de stress (témoin négatif). Les hypocotyles sont prélevés sur les plantules congelées et on procède à l'extraction des protéines comme décrit au § I.4.3.

I.2.2. Stimuli appliqués au lin pour la production de méristèmes épidermiques.

Les stress (repiquage ou choc de froid) sont réalisés 2 jours après le passage à la lumière des plantules. Pour le stress de repiquage, chaque plantule est saisie au niveau du

nœud cotylédonnaire et sa racine est enfilée dans une maille de la grille d'une deuxième boîte jusqu'au niveau du collet.

Pour le choc de froid, une boîte avec son couvercle, contenant un litre de milieu de culture mais sans plante, est préalablement refroidie au réfrigérateur à 4°. La boîte refroidie est rapidement amenée dans la chambre de culture à côté d'une boîte contenant les plantes à stresser. La grille portant les plantules est saisie avec ses cônes et placée dans la boîte refroidie pendant 1 minute (la boîte est immédiatement refermée avec son couvercle). La grille est ensuite rapidement replacée sur sa boîte d'origine à 22°C. Le double choc de froid correspond à la même opération répétée deux fois avec un laps de temps de 60 minutes entre les deux opérations.

Un deuxième type de choc de froid a été utilisé : une descente lente en température. Le deuxième jour après la mise à la lumière une boîte à la température de la salle de culture est placée pendant 24h dans un réfrigérateur à 3°C. Le refroidissement du milieu de culture de 23°C à 3°C se produit en à peu près 6 heures. La boîte est ensuite replacée dans la salle de culture jusqu'à la fin de l'expérience. Les plantules restent sur le milieu normal 2 jours puis subissent 2 jours de déplétion calcique suivi de 3 semaines de culture sur le milieu normal.

Les effets des inhibiteurs de canaux calciques (Lanthane et Rouge de Ruthénium) et d'un chélateur de calcium (EGTA) ont été étudiés en fonction : 1) de la concentration de ces substances, 2) du type de *stimulus* appliqué (choc de froid, double choc de froid et descente lente en température), 3) de l'ordre d'application et 4) du temps d'exposition des plantes à ces substances, 5) des laps de temps entre l'application d'un *stimulus* et l'ajout d'inhibiteurs dans le milieu de culture. Les différentes combinaisons réalisées sont rassemblées dans le Tableau 6. De même, pour vérifier si l'information produite par un choc de froid est stockée dans les plantules de lin comme cela est le cas lors du stress de repiquage, certains lots de plantules ont été stimulés puis placés sur milieu normal pendant deux jours avant la déplétion calcique.

Les effets d'une irradiation dans le domaine des micro-ondes à des puissances non thermique ont été étudiés à l'aide de l'induction des méristèmes épidermiques. Deux sources de rayonnements ont été utilisées, d'une part le téléphone portable à 900 MHz (**Publication 3**) et d'autre part l'oscillateur de Gunn à 105 GHz (**Publication 4**). Tous les détails concernant l'application de ces deux *stimuli* se trouvent dans ces deux publications.

1.2.3. Stimuli appliqués à Arabidopsis pour l'analyse protéomique.

Des plantules d'*Arabidopsis thaliana* sauvage ont été cultivées pendant 3 semaines afin d'obtenir une quantité de protéines suffisante pour l'étude de l'effet sur le protéome d'un choc de froid et d'un rayonnement électromagnétique à 900 MHz. Des filtres sans cendre et stérilisés à sec sont disposés dans des boîtes de Petri stériles en plastique et imbibés avec du milieu de culture normal (identique à celui utilisé pour les plantules de lin). Des graines d'*Arabidopsis thaliana* stérilisées (à l'alcool et l'eau de Javel) sont ensuite distribuées à la surface des filtres. Après une croissance de trois semaines, les plantules sont soumises à une irradiation de 2h par des ondes électromagnétiques à 900 MHz (comme décrit au § I.2.1 pour le lin) ou à un choc de froid. L'application du choc de froid a été réalisée en plaçant les boîtes de Petri sur de la glace dans une enceinte à 4°C pendant une minute. Les boîtes de Petri sont ensuite remises à la température de 22°C pendant neuf minutes. Pour la récolte des plantes, les boîtes ont été directement congelées dans l'azote liquide et la partie supérieure des plantules d'*Arabidopsis* a été prélevée (hypocotyles et cotylédons) pour constituer la matière fraîche à analyser (**Publication 5**).

1.3. Production et comptage des méristèmes épidermiques.

La déplétion calcique est effectuée par changement du milieu de culture normal par un milieu sans calcium (Annexe 1) pendant 2 jours. Après retour sur le milieu normal, 10 plantules sont prélevées au hasard dans chaque lot de plantules tous les jours de la première semaine puis 3 fois par semaine ensuite. Les hypocotyles sont conservés quelques jours dans de l'alcool à 50% ; après dissolution de la chlorophylle, ils sont observés au microscope photonique. Un léger écrasement de l'hypocotyle est nécessaire pour pouvoir observer les méristèmes sur toute la surface de l'épiderme [Verdus *et al.*, 1997]. La cinétique de production de méristèmes représente généralement un ensemble de 10 à 15 points, chaque point représentant une moyenne de 10 plantules analysées. Les courbes de production de méristèmes obtenues sont intégrées en fonction du temps pour pouvoir calculer des valeurs moyennes de production de méristèmes sur lesquelles l'effet des incertitudes expérimentales est amoindri. Cette procédure permet facilement de comparer sur la production de méristèmes l'effet des différents *stimuli* (repiquage, descente en température, choc de froid ou double choc de froid) et de l'administration d'inhibiteurs de canaux calciques ou de chélateur du

calcium. Le protocole de l'induction des méristèmes épidermiques chez le lin est résumé au Tableau 7.

1.4 Extractions des protéines.

Plusieurs types d'extraits protéiques sont nécessaires pour être compatibles avec les techniques électrophorétiques ou l'étude de l'activité tyrosine-kinase en solution. Ainsi, pour une électrophorèse monodimensionnelle, l'échantillon protéique doit contenir du SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), pour une électrophorèse bidimensionnelle, l'échantillon protéique doit être en conditions dénaturantes mais sans modification des charges des protéines, et enfin, pour l'activité kinase en solution, les protéines doivent être en solution dans un tampon permettant de conserver une activité enzymatique.

1.4.1. Extraits protéiques pour l'électrophorèse bidimensionnelle.

Les extraits protéiques utilisables pour l'électrophorèse bidimensionnelle ont été obtenus, quelle que soit la plante utilisée (*Linum usitatissimum* ou *Arabidopsis*) en utilisant le protocole d'extraction décrit sur la Figure 17 (ce protocole est détaillé dans la **Publication 1**). Brièvement, les morceaux de plantules congelées (hypocotyles pour le lin, hypocotyles plus cotylédons pour *Arabidopsis*) sont broyés dans un mortier refroidi à l'azote liquide. Le broyat obtenu est mis en suspension dans un mélange β -mercapto-éthanol, acide trichloracétique dans de l'acétone (Annexe 2) pour permettre la précipitation des protéines et l'élimination de l'échantillon des pigments et tanins [Granier, 1988 ; Damerval *et al.*, 1986]. Après deux lavages (Annexe 2) et centrifugation, les culots contenant les protéines sont séchés sous vide à -20°C puis remis en suspension dans le tampon d'extraction (Annexe 2). Ce tampon contient de l'urée pour dénaturer les protéines, du CHAPS (détergent) et du DTE pour les solubiliser, du PVPP pour précipiter les polysaccharides ; le pH du tampon est basique pour éviter les interactions protéines-acides nucléiques [Rabilloud, 1996]. Enfin, l'extrait protéique est ultra-centrifugé pour permettre la précipitation des grosses molécules d'acides nucléiques. L'évaluation de la concentration en protéine dans l'extrait obtenu est réalisée par dosage de Bradford avec une gamme étalon de BSA dans le même tampon.

1.4.2. Extraits protéiques pour l'électrophorèse monodimensionnelle.

Les extraits protéiques utilisés pour l'électrophorèse monodimensionnelle doivent être obtenus dans un tampon Tris-HCl contenant du SDS. Pour cela les fragments de plantules sont broyés et traités à l'acétone comme précédemment, mais après séchage sous vide, les culots sont directement repris dans un tampon pour SDS-PAGE [Laemmli, 1970] qui permet de dénaturer les protéines. Avant de réaliser les dépôts lors de l'électrophorèse, les extraits protéiques sont mis à bouillir pendant dix minutes dans le tampon pour parfaire la dénaturation avant la migration.

1.4.3. Extraits protéiques pour la mesure de l'activité tyrosine-kinase en solution.

Les hypocotyles congelés sont broyés dans un mortier refroidi à l'azote liquide, puis la poudre obtenue est solubilisée dans le tampon d'échantillon (Annexe 2). La solution est agitée une heure sur glace puis centrifugée 20 minutes à 10000 rpm à 4°C. L'extrait protéique provenant du surnageant est concentré sur Centricon 10000 (Amicon) pour obtenir un échantillon à 0,5 mg/mL conservé à -80°C avant le test d'activité.

1.5. Séparations électrophorétiques.

Le principe de la focalisation isoélectrique est de faire migrer sous l'influence d'un champ électrique des protéines dans un support contenant un gradient de pH immobilisé jusqu'à ce que ces protéines atteignent leur point isoélectrique. La focalisation isoélectrique est une séparation des protéines dénaturées en présence d'urée en fonction de leur charge globale. Si, dans le support, le pH local est différent du point isoélectrique d'une protéine, celle-ci se déplace dans le champ électrique jusqu'à atteindre une zone de pH où la charge globale de la protéine est nulle (la protéine est alors à son point isoélectrique). En effet, si la protéine est chargée négativement (pH plus élevé que son point isoélectrique), le potentiel électrique étant positif du côté acide du support de séparation (champ électrique dirigé des zones acides vers les zones basiques du support), elle se déplace vers l'anode et donc vers une zone de pH plus acide jusqu'à son point isoélectrique. Si par contre la protéine est chargée

positivement, le déplacement a lieu vers la cathode et donc vers un pH plus basique, d'où une focalisation des protéines vers leur point isoélectrique.

Les migrations électrophorétiques en conditions dénaturantes permettent de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire : c'est le principe *Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE [Laemmli, 1970]. En effet, les protéines dénaturées fixent à saturation des molécules de SDS et sont donc chargées négativement. Elles peuvent ainsi migrer dans le champ électrique appliqué au gel grâce à un générateur électrique. Le gel de polyacrylamide ralentit les protéines en fonction de l'encombrement de celles-ci (donc en fonction de leur masse moléculaire). Plus la protéine a une forte masse moléculaire, plus elle est retenue dans les mailles du gel de polyacrylamide et donc migrera peu.

L'électrophorèse bidimensionnelle est la résultante du couplage de ces deux techniques : les protéines sont d'abord séparées sur un support très étroit en fonction de leurs points isoélectriques puis dans une dimension orthogonale à la première en fonction de leurs masses par la technique SDS-PAGE. Le résultat est une carte protéique où chaque « spot » obtenu correspond à une (des) protéine(s) de point isoélectrique et de masse moléculaire donnés.

1.5.1. Electrophorèse monodimensionnelle.

Des protéines chargées négativement en présence de SDS, après dénaturation au β -mercapto-éthanol, migrent dans un champ électrique vers l'anode en fonction de la masse de la molécule. Le système utilisé est le Modular mini-Protean II system de Bio-Rad avec des gels de polyacrylamide de 10 % pour le gel de résolution et de 6 % pour le gel de tassement. Les conditions de migration sont : 5 mA par gel pendant 30 minutes puis 10 mA par gel pendant une heure.

1.5.2. Electrophorèse Bidimensionnelle.

Le protocole utilisé est décrit dans la **Publication 1**. La première dimension est une focalisation isoélectrique qui se fait avec des Immobilines DryStrips 4-7, 5-8 ou 3-10 (Bio-

Rad) qui sont des gels de polyacrylamide à 4 % à gradient de pH immobilisé dont l'échelle est linéaire. Pour introduire l'échantillon à analyser dans le gel, les bandelettes sont mises à réhydrater une nuit dans la cassette de réhydratation de Pharmacia (Figure 18) avec 500 μ L d'échantillon dilué dans le tampon de réhydratation (Annexe 2). Le dépôt de l'échantillon est ainsi facilité et bien contrôlé. En fonction du but recherché, on dépose 50 μ g de protéine pour imager une carte protéomique au nitrate d'argent ou pour une analyse de phosphorylation par la méthode SIMS, 250 μ g pour effectuer un transfert sur membrane de PVDF et une analyse par immunodétection ou 500 μ g pour un microséquençage par la méthode d'Edman [1950] ou pour réaliser une analyse en MALDI-TOF.

La première dimension est réalisée avec le système Multiphor II et des Immobilines DryStrips Kit de Pharmacia (Figure 19). Les conditions de migration sont, à une température de 18°C, une tension initiale de 50 V puis une montée progressive jusqu'à 3500 V sans jamais dépasser 0.05 mA par bandelette. La migration se poursuit à 3500 V jusqu'à obtenir un produit (volt)x(heures) égal à 100 kVh. En fin de migration, les bandelettes sont, soit utilisées pour la deuxième dimension, soit congelées à -80°C entre deux feuilles de plastique.

Pour la migration selon la deuxième dimension, les protéines contenues dans les bandelettes (précipitées à leur point isoélectrique) doivent être remises en solution, dénaturées et chargées négativement par du SDS : il s'agit de la rééquilibration (Figure 20). Pour cela, les bandelettes sont incubées 15 minutes dans le tampon de rééquilibration 1 (Annexe 2) qui permet, grâce au DTE qu'il contient, d'éliminer les liaisons hydrogènes puis 15 minutes dans le tampon de rééquilibration 2 (Annexe 2) dont l'iodoacétamide sature les groupements -SH, ce qui réduit les ponts disulfures. La migration proprement dite s'effectue de façon similaire à celle utilisée pour les gels monodimensionnels. Pour préparer les gels de polyacrylamide à 10 % et réaliser la migration, on utilise le système PROTEAN II xi Cells de Bio-Rad (Figure 21). Les bandelettes sont déposés en haut du gel entre les deux plaques de verre et immobilisés avec de l'agarose (Annexe 2). Les tampons de migration utilisés sont différents entre l'anode et la cathode (Annexe 2) et les conditions électrophorétiques sont : 50 minutes à 10 mA par gel puis 4h30 à 20 mA, la température est de 10°C.

En fonction de l'utilisation projetée du gel obtenu, ce dernier sera, soit coloré au nitrate d'argent (Annexe 3) d'après le protocole modifié de Oakely [1980], soit soumis à une

procédure de transfert des protéines sur une membrane de PVDF pour permettre d'autres analyses.

1.5.3. Transfert des protéines sur membrane de PVDF.

Afin de pouvoir effectuer une immunodétection des protéines phosphorylées ou encore de réaliser un séquençage par la méthode d'Edman, les protéines séparées par électrophorèse bidimensionnelle doivent être transférées sur une membrane de PVDF. Pour cela, à la fin de la séparation électrophorétique, les gels sont incubés quinze minutes dans le tampon de transfert (Annexe 2). Ils sont ensuite placés dans le système de transfert semi sec de Pharmacia à l'intérieur de la cuve Multiphor II contre la membrane de PVDF (Bio-Rad) entre plusieurs feuille de papier absorbant contenant le tampon de transfert ce qui constitue la réserve du tampon. Les conditions de transfert sont de 0.8 mA/cm² de gel pendant deux heures. A la fin du transfert la membrane de PVDF est lavée à l'eau distillée puis séchée à l'air à température ambiante pour permettre la fixation des protéines. Une fois sèche, la membrane est prête pour être utilisée pour l'immunodétection des protéines phosphorylées ou bien pour le séquençage.

1.6. Séquençage N-terminal.

Les protéines transférées sur membrane de PVDF sont colorées au bleu de Coomassie. Les zones de la membrane contenant les protéines à séquencer sont découpées. Le séquençage N-terminal des protéines est effectué selon la technique de dégradation d'Edman [1950] à l'aide d'un microséquenceur (Procise 492, Perkin Elmer Applied Biosystems). Les séquences trouvées sont recherchées dans les bases de données Swiss-Prot, EMBL, GenBank, TrEMBL et NCBI pour permettre l'identification des protéines.

1.7. Détection d'activité kinase.

Deux techniques différentes ont été utilisées pour réaliser la détection d'activité kinase. L'une en solution, spécifique de l'activité tyrosine kinase et l'autre sur gel, moins spécifique mais qui apporte une information sur la masse et le point isoélectrique des protéines kinases.

1.7.1. Détection d'activité tyrosine kinase en solution.

La détection d'activité tyrosine-kinase globale dans un extrait protéique a été réalisée grâce au *Protein Tyrosine Kinase Assay Kit* de Calbiochem. Son principe est le suivant (Figure 22) : l'extrait protéique à analyser est ajouté à de l'adénosine triphosphate dans des cuves de microtitration contenant un substrat potentiel de tyrosine kinase immobilisé au fond des cuves. Le substrat qui se trouve phosphorylé est, après lavage, incubé avec un anticorps anti-phosphotyrosine couplé à la peroxydase. La révélation se fait grâce à l'ajout de tetraméthylbenzidine qui produit une couleur bleue proportionnelle à l'activité kinase initialement présente. La réaction est ensuite stoppée par addition d'acide sulfurique qui jaunit le milieu réactionnel de la cuve. La lecture de la coloration est faite sur un Microreader 3550 de Bio-Rad à 450 et 595 nm. Pour quantifier l'activité enzymatique, on utilise un témoin positif (Abl tyr-kinase enzyme) permettant la détermination de l'activité en nombre de μmol de substrat transformé par minute (UI).

1.7.2. Détection d'activité kinase sur gel.

La détection d'activité kinase sur gel est une technique dont le principe est simple mais de mise en œuvre délicate. Il suffit en principe de renaturer des protéines à l'intérieur d'un gel comportant un substrat des kinases et d'utiliser de l'ATP marqué pour réaliser la phosphorylation. Ainsi les protéines kinases marquent le substrat à l'endroit où elles ont migré apportant ainsi une information sur leurs masses et sur leur point isoélectrique si l'expérience est réalisée par électrophorèse bidimensionnelle [Droillard *et al.*, 2000].

Le protocole utilisé ici est dérivé de celui décrit par Zhang and Klessig [1997] et inspiré des modifications apportées par différents travaux sur les protéines kinases végétales [Hoyos and Zhang, 2000 ; Mikołajczyk *et al.*, 2000 ; Novikova *et al.*, 2000]. Après une séparation électrophorétique en condition monodimensionnelle ou bidimensionnelle, les gels polymérisés en présence de MBP (Protéine Basique de la Myéline) à 0,5 mg/mL sont lavés 3 fois 30 minutes dans le tampon de lavage (Annexe 2), puis la renaturation des protéines dans le gel est effectuée pendant 18 heures à 4°C (3 bains de 6 heures) dans la solution de renaturation (Annexe 2). La réaction qui constitue la fixation de phosphates marqués au phosphore 32 (ATP- γ ³²P) est réalisée à température ambiante pendant une heure (Annexe 2).

La réaction est alors arrêtée par 5 lavages successifs pour enlever les molécules d'ATP marquées n'ayant pas réagi avec la MBP. Les gels sont ensuite séchés et la radioactivité introduite dans les gels est imagée par PhosphoImager (Bio-Rad). Les bandes ou spots ainsi révélés représentent donc des protéines ayant une activité kinase et principalement MAP Kinase car la MBP est considérée comme un substrat préférentiel des MAPK.

1.8. Analyse des images obtenues par électrophorèse bidimensionnelle.

Les images obtenues après coloration des gels au nitrate d'argent ou dans les procédures d'immunodétection, sont numérisées par transmission à l'aide d'un scanner UMAX avec une résolution de 300 points par pouce. Elles sont ensuite analysées avec le logiciel Melanie III dédié à l'analyse de gels de 2-DE. Comme les systèmes de comparaison automatiques d'images contenues dans le logiciel n'ont pas donné de résultats satisfaisants, nous avons développé une méthode alternative de comparaison, fondée sur des analyses statistiques du « bruit de fond » (incertitude) associé soit à la mesure des variations de pI soit à celle des variations d'intensité des « spots » (**Publication 1**). Toutes les études portant sur l'analyse des modifications du protéome de lin ou *d'Arabidopsis* à la suite de l'application des différents *stimuli* ont été réalisées par cette nouvelle méthode. Les gels sont balisés avec 50 protéines pivots dont les coordonnées (pI, Mw) ne se modifient pas sensiblement à la suite des différents *stimuli*. Cette attribution de pivots est bien entendu arbitraire, mais contribuera à la détermination de la variabilité de la méthode 2-DE. Une fois ces pivots définis, les coordonnées et l'intensité du « spot » d'une vingtaine d'autres protéines également considérées comme ne subissant aucune variation sont calculées et comparées. Ceci permet de mesurer un bruit de fond inhérent à la technique ; le détail de la procédure est contenu dans le **Publication 1**. Ainsi une variation de point isoélectrique inférieure à 0.02 unité est considérée comme non significative. De même, une augmentation de l'absorbance relative de moins de 0.066 est aussi considérée comme non significative. Pour rendre les observations encore plus fiables, il faut que la modification d'un « spot » (en fonction des critères précédents) se retrouve dans plus de 80% des répliques des manipulations effectuées (c'est-à-dire que pour un échantillon ayant donné lieu à deux images, les variations doivent être les mêmes sur les deux images).

1.9. Comparaison d'empreintes de protéine obtenues par spectrométrie de masse.

La production de l'empreinte d'une protéine obtenue à partir de la digestion de celle-ci par la trypsine et de son spectre MALDI-TOF permet de comparer deux protéines supposées identiques. Ainsi, un décalage de point isoélectrique d'une protéine sur deux gels de 2-DE peut, soit signifier qu'une même protéine a subi une modification post-traductionnelle, soit que la dégradation d'une protéine (par action d'une protéase, par exemple) a permis l'apparition d'une autre protéine de masse et point isoélectrique relativement similaires (d'autres interprétations sont évidemment possibles). Pour lever cette ambiguïté, la réalisation d'une digestion enzymatique partielle de la protéine contenue dans les deux « spots » voisins sur le gel et la comparaison des spectres obtenus par spectrométrie de masse est une méthode très efficace. La digestion enzymatique par la trypsine ainsi que la réalisation d'un spectre MALDI-TOF ont été effectuées comme décrit dans Shevchenko *et al.*, [1996] et Moritz *et al.*, [1996]. Le protocole est détaillé dans la figure 23 ainsi que le principe de la spectrométrie de masse en temps de vol.

1.10. Détection par la méthode SIMS de l'état phosphorylation de protéines après séparation électrophorétique.

Une approche innovante pour détecter les modifications de phosphorylation des protéines après séparation électrophorétique est possible en utilisant la technologie SIMS (Secundary Ion Mass Spectrometry). Un analyseur ou microscope SIMS est un instrument pouvant analyser par spectrométrie de masse et imager la surface d'un échantillon. La Figure 24 (dont proviennent les numéros en italiques) contient le schéma de principe d'un microscope SIMS. Des canons à ions (1, 2) permettent de produire un faisceau d'ions Cs⁺ ou O₂⁺. Ces ions (en vert sur la figure) appelés ions primaires sont accélérés de façon à leur communiquer une énergie de l'ordre de 10 keV et dirigés vers la surface d'un échantillon placé sur le porte échantillon (5) dans un vide poussé (10⁻⁸ mm de mercure). La surface bombardée a un diamètre de 50 à 250 µm. Sous l'impact des ions primaires les couches atomiques les plus superficielles de l'échantillon sont pulvérisées (Figure 25). Une fraction de la matière pulvérisée est constituée d'ions positifs ou négatifs : ce sont les ions secondaires.

Ces derniers sont caractéristiques de la composition de l'échantillon. Ils sont triés par un spectromètre de masse (10-14). A la sortie du spectromètre de masse (14) les ions d'une masse donnée sont sélectionnés et utilisés pour construire une image à l'aide de lentilles électrostatiques de projection (15) associées à un système de formation d'images (17, 18).

Lorsqu'un « spot » se déplace vers un point isoélectrique plus bas sur un gel d'électrophorèse bidimensionnelle, il y a une forte probabilité pour que la protéine correspondante ait subi une modification post-traductionnelle qui soit une phosphorylation. Comme les systèmes de reconnaissance par immunodétection des résidus phosphorylés (cf. § I.6) peuvent conduire à des faux-négatifs (épitopes masqués par exemple par des glycanes), à un signal trop faible pour être détecté, ou à une non détection parce que le (ou les) résidu(s) phosphorylé(s) ne sont pas un épitope de l'anticorps utilisé (anticorps anti-phosphotyrosine alors que la phosphorylation a lieu sur un résidu sérine, thréonine, histidine ou asparagine). La mise au point d'une autre méthode d'identification de l'état de phosphorylation des protéines s'avère utile. Afin de pouvoir mettre en évidence une différence de phosphorylation entre deux états différents d'une même protéine sur un gel, il suffit en principe d'analyser la composition en phosphore de ces deux états par microscopie SIMS et de les comparer. La mise au point d'un protocole adapté est décrite dans la **Publication 2**. Brièvement, il consiste à découper un fragment de gel contenant le spot (ou une bande) à analyser, le déshydrater et l'inclure dans un monomère polymérisable. Après polymérisation une coupe semi-fine (environ 1 µm d'épaisseur) réalisée avec un ultramicrotome Leica Ultracut S est rendue adhérente à la surface d'un support métallique poli et analysée (phosphore et azote) par la méthode SIMS avec des ions primaires Cs⁺. Nous avons mis au point une méthode originale et simple de déshydratation-inclusion fondée sur l'utilisation exclusive de monomères méthacryliques (Hydroxy-Ethyl-MethAcrylate/Ethylene-Glycol-DiMethAcrylate) et de Résine histologique LR White (London Resin). Les détails se trouvent dans la **Publication 2**.

II. Résultats et discussion

II.1. Modifications du protéome de l'hypocotyle de lin à la suite de stimuli mécaniques.

II.1.1. Stimulus mécanique non lésant.

Comme le montrent les travaux de Verdus *et al.*, [1997], les hypocotyles de lin peuvent produire des méristèmes épidermiques à la suite d'un stress mécanique si les plantules sont ensuite soumises à une déplétion calcique du milieu de culture pendant deux jours. Nous avons essayé de mieux comprendre les mécanismes biochimiques impliqués dans ce phénomène.

Les analyses par électrophorèse 2-D des modifications du protéome de l'hypocotyle de lin à la suite d'un *stimulus* mécanique non lésant (stress de repiquage) ont mis en évidence deux protéines dont le point isoélectrique est abaissé moins de dix minutes après le début de l'application du stress (Figure 26). Ces deux protéines, Toucher1 et Toucher2 ont respectivement des masses de 57 et 51 kDa. D'autres protéines semblent affectées, mais les observations correspondantes sont peu reproductibles. Il n'est pas impossible que cette mauvaise reproductibilité provienne de la difficulté d'appliquer un stress de même intensité à toutes les plantules au moment du repiquage (cette difficulté est largement surmontée dans le cas de l'application d'un stress de froid, cf. plus bas § II.2).

Afin de vérifier que les deux spots de pI différents que l'on attribue à la protéine Toucher1 correspondent bien à la même protéine, on a réalisé une analyse par MALDI-TOF du produit de la digestion trypsique des spots excisés du gel à 10 et 60 minutes (temps pour lesquels les pI valent respectivement 6,14 et 6,17). L'analyse des spectres de la Figure 27 indique une identité de plus de 70 % entre les différents pics obtenus, ce qui montre qu'il s'agit effectivement de la même protéine mais dans deux états différents.

Ces deux expériences montrent donc que ces protéines de l'hypocotyle de lin sont modifiées de façon post-traductionnelle à la suite d'un *stimulus* de repiquage. Dans le cas de Toucher1 et de Toucher2, les deux protéines ont des comportements similaires, à savoir une modification du point isoélectrique vers une valeur plus basse. L'hypothèse d'une phosphorylation des protéines Toucher1 et Toucher2 dans les minutes qui suivent semble la plus plausible.

Pour compléter ces observations, nous avons analysé la protéine Toucher1 par spectrométrie de masse d'ions secondaires (SIMS) pour tenter de mettre en évidence une phosphorylation. L'emploi d'anticorps anti-phosphotyrosine a donné des résultats non reproductibles et contradictoires malgré les nombreuses répliques ; ces résultats ne seront pas discutés dans ce mémoire. Cette nouvelle méthode d'analyse de l'état de phosphorylation d'une protéine nous a permis de confirmer que l'abaissement transitoire du pI de la protéine Toucher1 correspond bien à une phosphorylation. Le principe de la méthode et le détail des expérimentations figurent dans la **Publication 2**.

Enfin, nous avons cherché à mettre en évidence une modification d'activité tyrosine kinase induite par un *stimulus* mécanique non lésant (stress de repiquage). La cinétique étudiée de 0 à 20 minutes montre une importante augmentation de l'activité tyrosine kinase en moins de cinq minutes à la suite de l'application du *stimulus* (Figure 28). Le maximum mesuré se situe 5 minutes après le stress et diminue ensuite progressivement. Ces observations sont cohérentes avec la détection à des temps courts de protéines nouvellement phosphorylées comme Toucher1 et vraisemblablement Toucher2 ; elles sont également en accord avec les travaux de Mizoguchi *et al.*, [1996] dont les cinétiques de détection d'activité MAP kinase sont très similaires.

Toutes ces données réunies semblent prouver, même si ces résultats restent encore relativement préliminaires, qu'il y a modification du protéome de l'hypocotyle de lin à la suite d'un *stimulus* de repiquage et que parmi ces modifications, on trouve des phosphorylations transitoires corrélées à l'apparition d'une activité tyrosine kinase dans les minutes qui suivent l'administration du stress mécanique.

II.1.2. Compression lésante de l'hypocotyle.

Lorsque des plantules de lin sont soumises à une compression lésante de l'hypocotyle, il y a, après une déplétion calcique, une production de méristèmes épidermiques beaucoup plus importante qu'en cas de stress non lésant. Nous avons donc voulu savoir si dans ce cas aussi, des modifications du protéome de l'hypocotyle étaient détectables. La Figure 29 illustre les modifications observées 5 et 10 minutes après la compression des hypocotyles. Trois protéines sont modifiées ; d'abord la protéine Toucher1 qui est donc aussi bien affectée par un *stimulus* mécanique non lésant que par un stress de compression lésant ; cette protéine a probablement un rôle dans la perception ou la transduction des informations générées par des *stimuli* mécaniques. Les deux autres protéines modifiées à la suite de la compression de l'hypocotyle, Toucher3 (33 kDa) et Toucher4 (31 kDa) se comportent de façon similaire : elles apparaissent sur les cartes protéiques entre 5 et 10 minutes après l'application du stress. Une durée de dix minutes est courte pour une néosynthèse protéique (sauf peut être en cas de régulation traductionnelle). L'apparition de ces deux spots pourrait provenir, soit de modifications post-traductionnelles de protéines de masses identiques, soit de dégradation de protéines de masse différentes.

II.2. Production de méristèmes chez le lin et modifications du protéome du lin et d'Arabidopsis à la suite d'un choc de froid.

II.2.1. Effets d'un choc de froid.

Le choc de froid est un *stimulus* facile à mettre en œuvre et permet la production d'échantillons homogènes dont les résultats d'analyse sont plus reproductibles que ceux obtenus à la suite d'un stress mécanique. Comme pour le stress de repiquage, nous avons voulu connaître les modifications du protéome de l'hypocotyle de lin. Les résultats obtenus par l'analyse protéomique sont présentés dans la **publication 1**. Brièvement, le choc de froid entraîne la modification d'au moins sept protéines dans les deux heures qui suivent l'administration du stress. Parmi ces sept protéines : 1) trois (CSA, CSB et CSC) présentent une diminution apparente de pI compatible avec une phosphorylation, 2) trois autres (CSD, CSE et CSG) correspondent à des spots qui apparaissent en moins d'une minute et

disparaissent entre une et deux heures, phénomène compatible avec une modification post-traductionnelle ou une dégradation et 3) une (CSF) correspond à un spot qui apparaît au bout de trente minutes, durée compatible avec une néosynthèse protéique. Parmi ces protéines, pour des raisons peu claires, une seule a donné un résultat lors du séquençage N-terminal par la méthode d'Edman, il s'agit de CSE. La recherche dans les bases de données indique qu'il pourrait s'agir de la saccharopine déshydrogénase (EMBL : M34929), enzyme qui intervient dans le métabolisme de la lysine. Il faut cependant noter que CSE serait alors apparentée non pas à une enzyme végétale (la masse des saccharopine déshydrogénases végétales étant proche de 110 kDa) mais à une enzyme de la levure (*Yarrowia lipolytica*). Ceci jette quelque doute sur la détermination de la nature de CSE et éclaire les difficultés d'identification des protéines d'un organisme dont le génome est très mal connu (voir discussion de la **Publication 1**).

Afin de mettre en évidence des activités protéines kinases à la suite du choc de froid, nous avons réalisé un test d'activité kinase sur gel (cf. § I.7.2). La figure 30 montre les résultats obtenus en séparant sur un même gel (SDS-PAGE) d'une part des protéines extraites d'hypocotyles de lin à différents temps après le choc de froid et d'autre part 6 extraits protéiques d'oursin connus pour présenter une activité kinase [Chiri, communication personnelle] et utilisés comme témoins positifs. Les quantités de protéines déposées sont les mêmes pour chaque piste comme le montre la coloration argentique (Figure 30). Aucune activité kinase n'a été détectée chez le lin alors que, comme attendu, elle est clairement visible chez les témoins. Les causes de l'absence de signal chez le lin peuvent être multiples. La renaturation des protéines s'est peut être mal produite pendant la manipulation. Ceci pourrait être lié à la forte teneur en glycanes des protéines végétales. Cependant de nombreux travaux déjà réalisés sur les plantes ont permis de révéler des activités kinase sur gel [Droillard *et al.*, 2000 ; Hoyos and Zhang, 2000 ; Mikołajczyk *et al.*, 2000 ; Novikova *et al.*, 2000]. La cause de nos échecs (2 manipulations) est peu claire ; peut être l'activité MBP-kinase est-elle trop faible pour être détectée chez le lin avec ce protocole ?

II.2.2 Effets des inhibiteurs de canaux calciques et d'un chélateur de calcium.

Le modèle de l'induction des méristèmes épidermiques permet de mettre en évidence l'historique des *stimuli* reçus par des plantules de lin. D'après les travaux réalisés précédemment au sein du laboratoire [Verdus *et al.*, 1996 ; 1997], la production des méristèmes épidermiques ne se produit que si les plantules sont soumises à une déplétion calcique temporaire du milieu de culture (deux jours). Des plantules stressées ou non ne subissant pas de déplétion calciques ne produisent pratiquement pas de méristèmes (Tableau 8). De même, si des plantules subissent une déplétion calcique sans avoir été stressées, la production de méristème reste basale, c'est-à-dire qu'elle correspond au bruit de fond dû à la manipulation des plantules lors des changements de milieu de culture (Tableau 8). C'est pour l'application d'un stress de repiquage qu'on obtient la production maximum de méristèmes relativement à celle déclenchée par un autre type de *stimulus* comme un choc de froid. La cinétique de production des méristèmes obtenue avec ce *stimulus* est représentée figure 31 (voir aussi l'introduction bibliographique § III.1.4). Comme expliqué dans le Matériels et Méthodes (§ I.3), nous caractériserons ces cinétiques par la production moyenne de méristèmes en trois semaines. Ceci permettra de comparer les résultats obtenus dans diverses conditions expérimentales à ceux obtenus après un stress de repiquage (les manipulations ayant été effectuées soit en parallèle soit dans la même période de l'année). Les résultats seront exprimés en pourcentage par rapport à la production de méristèmes après un stress de repiquage (Tableau 8). Le nombre de méristèmes produits après une déplétion calcique sans stress autre que le renouvellement du milieu de culture donne un pourcentage de 9 %. On estimera que les pourcentages compris entre 0 et 10 % correspondent au bruit de fond de la manipulation.

Pour déterminer si la modification de l'homéostasie du calcium intracellulaire provoque des perturbations lors de la perception, la transduction ou le stockage d'un signal généré par un *stimulus*, nous avons réalisé plusieurs expériences en présence d'inhibiteurs de canaux calciques (lanthane et rouge de ruthénium) ou d'un chélateur de calcium (EGTA). Du fait que le lanthane précipite en présence de phosphates inorganiques, nous l'avons administré dans un milieu de culture sans phosphate (annexe 1). Nous avons vérifié que l'absence de phosphate dans le milieu de culture pendant une période de 24 heures n'induit pas la

formation de méristèmes après une déplétion calcique (Tableau 8). Nous avons également vérifié qu'après un stress de repiquage et une culture de 24 heures sur un milieu sans phosphate, la production de méristèmes est pratiquement nulle (Tableau 8). Enfin, pour vérifier si le lanthane n'a pas d'effets toxiques pour le lin, un lot de plantules a été mis en présence de lanthane 10 μ M pendant 24 heures puis a subi une déplétion calcique de deux jours. Le pourcentage de méristèmes produit est un peu inférieur à 10 %, ce qui est comparable au bruit de fond. Le milieu lanthane (milieu de culture sans phosphate avec du lanthane à 10 μ M, Annexe 1) n'a donc pratiquement aucun effet sur le déroulement normal de l'induction et de la production des méristèmes. Le rouge de ruthénium s'utilise à l'obscurité ; nous avons vérifié que la mise à l'obscurité des plantes en l'absence et en présence de rouge de ruthénium ne provoque pas, après une déplétion calcique, une production de méristèmes chez des plantes non stimulées.

Trois types de *stimuli* non lésants ont été étudiés : une descente lente en température, un choc de froid et un double choc de froid. La descente lente en température consistant à placer une boîte de culture à 4°C pendant 24 heures est perçue comme un *stimulus* par les plantules de lin. En effet, le pourcentage de production des méristèmes est de 39 % (Tableau 8, expérience DLT). Le choc de froid (les plantules sont transférées brutalement d'un milieu de culture à 22°C à un milieu à 4°C pendant une minute) donne un pourcentage de 88 %, ce qui est presque aussi important que les témoins de repiquage (Figure 31). Le double choc de froid (c'est-à-dire un choc de froid d'une minute, suivi d'un laps de temps d'une heure à 22°C puis un deuxième choc de froid) induit la production de méristèmes à un pourcentage supérieur au témoin de repiquage, 114 % (Tableau 8, CF 1h CF, et Figure 31). Ceci montre qu'il y a un effet d'additivité des *stimuli* de froid comme cela a déjà été décrit précédemment pour des *stimuli* mécaniques [Verdus *et al.*, 1997]. Le *stimulus* de froid, très simple à mettre en œuvre, permet d'obtenir des lots de plantules uniformément stressées et a donc été utilisé pour les études avec les inhibiteurs de canaux calciques et l'EGTA.

Action du lanthane sur la perception du choc de froid

Deux expériences différentes ont été réalisées pour comprendre l'action du lanthane (considéré comme inhibiteur des canaux calciques du plasmalemme) sur la perception du choc de froid. Une courte durée d'exposition des plantules de lin au lanthane (de 1 à 30

minutes) immédiatement avant ou après un choc de froid entraîne une diminution de la production des méristèmes (Tableau 8). Comme le montre la Figure 32, l'ordre entre l'application du choc de froid et l'ajout de lanthane ne semble pas avoir d'importance du moment que ces deux actions sont contiguës. La durée d'exposition au lanthane est par contre le facteur important. En effet, une exposition d'une minute avant ou après le choc de froid entraîne la production de 43 % et de 42 % de méristèmes respectivement. A partir d'une exposition de 5 minutes, le pourcentage tombe entre 13 % et 21 % (Tableau 8 et Figure 32). Pour produire une inhibition presque complète, le lanthane doit donc être utilisé pendant au moins 5 minutes soit immédiatement avant ou après l'administration d'un choc de froid.

Une autre approche a été d'administrer le lanthane à 10 μ M pendant 4 heures à la suite d'un choc de froid mais avec un laps de temps de 0 à 5 minutes entre ces deux actions. La figure 32 montre que s'il n'y a pas de laps de temps entre les deux actions, la production de méristèmes est très faible (15%) ce qui est comparable aux valeurs précédentes d'inhibition lors d'une exposition supérieure à 5 minutes. Par contre, si le laps de temps entre le choc de froid et l'ajout de lanthane est d'au moins une minute, la production de méristèmes épidermiques est alors de 42 à 48 % bien que le lanthane soit présent pendant 4 heures (Tableau 8 et Figure 32). L'inhibition de la formation des méristèmes épidermiques est alors beaucoup plus faible. Ces résultats montrent que l'inhibition de la production de méristèmes augmente avec la durée de l'exposition au lanthane et diminue avec celle du laps de temps qui sépare l'application du choc de froid et l'ajout de l'inhibiteur dans le milieu de culture.

Action de l'EGTA sur la perception d'un choc de froid.

Des expériences similaires aux précédentes ont été réalisées avec un chélateur de calcium, l'EGTA, à une concentration de 2,33 mM. Les résultats obtenus sont quasiment identiques. Si le choc de froid est immédiatement précédé ou suivi d'une exposition à l'EGTA pendant trois heures, la production de méristèmes est alors respectivement de 42 et 36 % (Tableau 8). L'inhibition de la production des méristèmes épidermiques est plus faible que celle obtenue avec le lanthane mais reste très significative. De même, si l'EGTA est ajouté au milieu de culture après l'application du choc de froid mais avec un laps de temps de 1 à 5 minutes, on remarque que la production de méristèmes augmente en fonction du temps (Tableau 8). Si le laps de temps est d'une minute, la production est de 32 %, de 53 % pour deux minutes et augmente à 62 % pour cinq minutes. Comme pour le lanthane,

l'augmentation du laps de temps entre l'application du choc de froid et l'ajout d'EGTA dans le milieu de culture diminue l'inhibition de la production de méristèmes.

Action du rouge de ruthénium sur la perception des stimuli.

Nous avons utilisé le rouge de ruthénium (inhibiteur des canaux calciques des membranes internes) dans deux expériences différentes. La descente lente en température induit une production modérée de méristèmes épidermiques (Tableau 8). Nous avons voulu savoir si le rouge de ruthénium pouvait inhiber la perception de ce *stimulus* en plaçant les plantules simultanément à 4°C en présence de rouge de ruthénium 50 µM ou 1 mM. Dans les deux cas, la production des méristèmes est extrêmement faible (soit 17 % pour 50 µM et 4 % pour 1 mM). Bien que le rouge de ruthénium soit considéré comme un inhibiteur de canaux calciques mécanosensibles, son action sur la perception de la descente en température est très efficace et inhibe la production des méristèmes de façon quasi complète.

Une autre expérience utilisant le rouge de ruthénium en pré-incubation à 500µM pendant deux heures avant l'application du *stimulus* montre que la production des méristèmes épidermiques est de 13 % à la suite d'un choc de froid unique et de 19 % à la suite d'un double choc de froid (Tableau 8 et Figure 31). Ces résultats montrent que le rouge de ruthénium inhibe de façon très efficace la perception du choc de froid par les plantules de lin (il s'agit même du meilleur inhibiteur dans le cas du choc de froid). Le pourcentage d'inhibition est similaire pour la descente lente en température, le choc de froid et le double choc de froid.

II.2.3. Effets du lanthane et de l'EGTA sur le protéome de lin.

L'analyse protéomique montre que la présence de lanthane et d'EGTA dans le milieu de culture induit la modification de 5 protéines (Figure 33). Quelle que soit la substance (La ou EGTA) et l'application ou non du choc de froid après l'exposition des plantules de lin à ces substances, l'effet sur le protéome semble être le même : les spots correspondant aux protéines CSA, CSB et CSC sont déplacés vers un pI plus faible de 0,03 unité. Cette diminution a déjà été observée pour ces mêmes protéines moins de 60 minutes après l'application d'un choc de froid d'une minute (**Publication 1**). En plus de la modification de

ces trois protéines impliquées dans le choc de froid, la présence de lanthane ou d'EGTA pendant trois heures dans le milieu de culture induit la surexpression d'une protéine de 21 kDa (Inhib1) et la modification vers un point isoélectrique plus faible de 0,04 unité pH d'une protéine de 20 kDa (Inhib2) et ce, qu'il y ait ou non application d'un choc de froid sur les plantules de lin. Ces deux protéines de faible masse n'interviennent pas lors de l'application d'un choc de froid sur les plantules de lin et sont donc spécifiquement modifiées par la présence de ces substances dans le milieu de culture.

Lors de la déplétion calcique, les protéines CSA, CSB et CSC (Figure 34) semblent subir les mêmes modifications (décalage vers un pI plus faible) que lors d'un choc de froid (après 30 minutes) ou qu'en présence de lanthane et d'EGTA. CSD et CSG sont des protéines ayant les mêmes comportements lors d'un choc de froid : ces spots apparaissent en moins d'une minute et restent visibles seulement une heure (**Publication 1**). Lors de l'utilisation d'inhibiteurs, il ne semble pas y avoir de modification. Par contre, au bout de 12 heures de déplétion calcique sans choc froid, les protéines CSG et CSD sont présentes sur les cartes protéiques. Enfin, deux protéines n'apparaissent que dans le cas d'une déplétion sans l'application d'un choc froid ; il s'agit de Depl1 (MM=31 kDa, pI=6.25) et Depl2 (MM=21 kDa, pI=6.16).

Les effets des inhibiteurs de canaux calciques et de chélateurs du calcium sur l'induction des méristèmes épidermiques chez le lin par des *stimuli* abiotiques soulignent plusieurs points importants. Le facteur temps semble avoir un rôle majeur dans l'action des inhibiteurs ou du chélateur de calcium. En effet, pour le lanthane, une durée d'exposition minimale d'au moins 5 minutes est nécessaire pour obtenir une nette inhibition de la production des méristèmes. Quand le lanthane et l'EGTA sont utilisés en post-incubation (c'est-à-dire après l'application du choc de froid), le laps de temps séparant la fin du choc de froid et le début de l'exposition à ces substances doit être inférieur à 5 minutes pour produire une inhibition sensible. Il faut cependant remarquer que dans les deux cas, l'inhibition n'est jamais totale. Quelle que soit la substance utilisée, le pourcentage de production des méristèmes reste supérieur au niveau basal d'au moins un facteur 2. Au niveau de l'analyse protéomique, le lanthane et l'EGTA ont la même action sur les protéines CSA, CSB et CSC qu'un choc de froid, ce qui tend à montrer que l'inhibiteur et le chélateur semblent agir sur la voie de réponse du lin au choc de froid.

La symétrie des effets observés quand on ajoute le lanthane *avant* ou *après* l'administration d'un *stimulus* et l'importance du facteur temps, laissent à penser que le mécanisme de perception et de transduction des signaux abiotiques (et l'intervention du calcium dans ce mécanisme) est peut être plus complexe qu'une simple suite linéaire d'événements biochimiques [Plieth, 2001] mais pourrait plutôt faire intervenir un réseau de structures dynamiques cellulaires. L'hypothèse est que la structure de ce réseau (assemblage dynamique de macromolécules) dépend de l'homéostasie calcique. Ainsi, tout processus physico-chimique qui modifiera la structure du réseau perturbera la concentration du calcium libre et, réciproquement tout changement de concentration du calcium intracellulaire induira des modifications de la structure du réseau. Sur le plan physico-chimique, il a été proposé que le phénomène de condensation des contre-ions [Manning et Ray, 1998] pourrait être à la base du contrôle de la structure de ce réseau par le calcium [Ripoll, 2002]. Ce phénomène interviendrait aussi pour réguler les activités de phosphorylation/déphosphorylation catalysées par des protéines du réseau. Activité phosphorylante et structure du réseau se trouveraient ainsi liées. Dès lors, on peut voir le réseau comme une sorte de « récepteur intégré », d'extension cellulaire, dont la réponse à un *stimulus* (déformation mécanique, choc de froid) sera dépendante du niveau de calcium intracellulaire et consistera en un changement de structure du réseau (par la modification de parties spécifiques de ce réseau) et de l'activité phosphorylante qui lui est associée. Il en résultera une production (ou disparition) de phosphoprotéines intervenant dans la réponse cellulaire au niveau biochimique ou de la régulation du génome [Ripoll, 2002]. Comment ce modèle de perception des signaux abiotiques peut-il éclairer les observations expérimentales sur l'action du lanthane ou de l'EGTA chez le lin ? Prenons l'exemple du lanthane : celui-ci pénètre dans les cellules, perturbe la condensation du calcium et ainsi, les structures qui, au sein du réseau, interviennent dans la réponse à certains types de signaux abiotiques. Dans cette hypothèse, l'effet du lanthane (révélé par l'inhibition de la production des méristèmes) sera d'autant plus important que la durée de pré-incubation (avant stimulation des plantes) sera longue ; c'est ce que nous avons observé. On comprend également que si après avoir incubé des plantes avec du lanthane, on les place pendant un certain laps de temps sur un milieu sans lanthane avant de les stimuler, les cellules pourront perdre le lanthane et le réseau pourra redevenir fonctionnel. Ainsi plus le laps de temps sera grand, mieux les cellules pourront récupérer leur capacité de réponse et moins forte sera l'inhibition ; c'est ce qui est observé. Enfin si on

stimule les plantes sur un milieu normal, la réponse générée par le « récepteur intégré » se produira avec une certaine cinétique (quelques minutes par exemple). Si l'administration du lanthane intervient pendant cette durée, par le même mécanisme que ci-dessus, il pourra altérer les structures et ainsi la réponse cellulaire. Par conséquent, si le lanthane est appliqué à des temps de plus en plus grands après la stimulation, il « n'aura pas le temps » de produire une inhibition ; c'est aussi ce que nous avons observé. La symétrie d'action du lanthane quand il est administré avant ou après stimulation des plantes est donc compréhensible dans le cadre de ce modèle. On peut spéculer sur le fait que les protéines qui apparaissent modifiées sur les gels de 2-DE, pourraient être des éléments clés du réseau.

II.3. Effets de rayonnements électromagnétiques sur le lin et Arabidopsis.

Nous avons montré que le lin et *Arabidopsis* réagissent à une irradiation par des ondes électromagnétiques dans le domaine de fréquence des GHz et ce, à des doses non thermiques (Publications 3, 4 et 5).

Le lin produit des méristèmes si, après avoir été irradié pendant 2 h par des ondes de fréquence 0,9 GHz émises par un téléphone portable (Publication 3) ou 105 GHz émises par un oscillateur de Gunn (**Publication 4**), il est soumis à une déplétion calcique. De plus, l'analyse protéomique montre qu'après 2h d'irradiation à 0,9 GHz, il y a diminution d'environ 0,03 unité du pI de 3 protéines dont 2 (CSA et CSC) sont également modifiées après un choc de froid (**Publications 1 et 3**).

En utilisant le modèle *Arabidopsis thaliana*, l'analyse protéomique nous a permis de mettre en évidence des modifications concernant 4 protéines après un choc de froid et outre ces 4 protéines, deux autres après une irradiation de 2 h à 0,9 GHz. Parmi les protéines modifiées par ces deux *stimuli*, 2 ont été identifiées : l'anhydrase carbonique et la spermidine synthase. De plus, l'une des protéines affectées spécifiquement par le rayonnement à 0,9 GHz est une protéine homologue aux phérophorines (**Publication 5**).

Ainsi nous avons montré que, de façon inattendue, les plantes perçoivent le rayonnement électromagnétique dans le domaine des GHz en utilisant probablement les voies de transduction des signaux abiotiques naturels (qui ne sont pas le fruit de la technologie humaine). Comment ces rayonnements peuvent-ils interagir avec les voies de signalisation ? Si par un mécanisme qui reste à déterminer, le rayonnement modifie l'homéostasie calcique, on peut comprendre les effets que nous avons observés. Bien entendu, beaucoup d'autres explications sont possibles (cf. Introduction bibliographique, § IV.3) mais restent pour l'instant difficiles à appliquer à nos expérimentations.

Troisième Partie

Résumé du mémoire et
Conclusion

Le but des travaux entrepris au cours de cette étude était d'essayer de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la perception, la transduction et le stockage des informations consécutives à un *stimulus* abiotique chez les végétaux. Les données connues sur les systèmes de perception, de transduction et de mémorisation des signaux environnementaux, font ressortir le rôle central de l'ion calcium dans ces processus. En effet, le calcium semble jouer un rôle important dans la perception rapide des *stimuli* [Knight and Knight, 2000 ; Plieth, 2001], mais aussi dans les phénomènes de stockage de l'information [Verdus *et al.*, 1996 ; 1997]. Lors de la transduction des signaux environnementaux, les cellules végétales font principalement appel à des voies de signalisations biochimiques faisant intervenir des protéines et plus particulièrement des MAPKs, grâce à leur cascade de phosphorylations [Mizoguchi *et al.*, 1996]. Ces données sur les mécanismes de réaction des plantes aux *stimuli* abiotiques et le modèle expérimental que nous utilisons au laboratoire (*Linum usitatissimum* var. Ariane, capable de révéler la perception d'un *stimulus* par le mécanisme de l'induction des méristèmes épidermiques) nous ont fait explorer la voie des mécanismes biochimiques utilisés par le lin et *Arabidopsis thaliana* pour répondre à différents stress abiotiques (repiquage, stress mécanique lésant, choc de froid et rayonnements électromagnétiques dans le domaine des micro-ondes). Pour essayer de mieux comprendre ces mécanismes, l'électrophorèse bidimensionnelle s'est révélée être un outil de choix grâce à sa capacité à produire des cartes protéiques, correspondant à des « signatures protéiques », d'un organisme dans un état physiologique donné. La technique de l'électrophorèse bidimensionnelle souffre cependant d'une variabilité dans la détermination des caractéristiques des protéines. Nous avons développé un critère statistique qui nous a permis d'identifier de façon fiable les changements produits par les différents stress abiotiques (**Publication 1**).

Les résultats que nous avons obtenus au cours de ces travaux ont montré que :

1. Les plantules de lin réagissent au stress de repiquage, et à un stress mécanique lésant. Le modèle de l'induction des méristèmes épidermiques montre qu'il y a perception et mémorisation d'un signal à la suite de ce type de stress. Les analyses par électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) prouvent que ces deux stress différents modifient une même protéine de 57 kDa (Toucher1), de façon transitoire, dans les minutes qui suivent l'application du *stimulus*. De plus, cette modification (la spectrométrie de masse prouve qu'il s'agit de la même protéine) correspond à une

phosphorylation transitoire, comme le montre la nouvelle méthode SIMS que nous avons mise au point pour l'analyse des spots des gels de 2-DE (**Publication 2**). Ces deux *stimuli* produisent aussi d'autres modifications au niveau du protéome de l'hypocotyle de lin : le stress de repiquage entraîne un déplacement transitoire (d'une durée inférieure à 30 minutes) d'un polypeptide de 51 kDa (Toucher2) vers un point isoélectrique plus faible, dix minutes après l'application du stress. Après un stress mécanique lésant, il apparaît sur les cartes deux spots, Toucher3 et Toucher4, (33 et 31 kDa) en moins de dix minutes. Pour compléter ces données, nous avons montré que le *stimulus* de repiquage produit une activité tyrosine kinase dans l'hypocotyle de lin.

2. Lors d'un choc de froid d'une minute à 4°C, les plantules de lin perçoivent et enregistrent un signal (ce qui est prouvé par le modèle de l'induction des méristèmes). L'analyse protéomique montre que 7 protéines sont modifiées dans les deux heures qui suivent l'application du choc de froid. CSA, CSB et CSC (66, 53 et 44 kDa respectivement) ont un point isoélectrique qui devient plus faible au moins trente minutes après le début du choc de froid. Ces modifications de point isoélectrique peuvent correspondre à des phosphorylations. CSD et CSG (46 et 30 kDa) apparaissent en moins d'une minute puis disparaissent au bout d'une heure. Ce phénomène incompatible avec une néosynthèse protéique est probablement dû à une modification post-traductionnelle. CSE (39 kDa) est un polypeptide qui apparaît en moins d'une minute et qui est apparenté à la saccharopine déshydrogénase (une enzyme du métabolisme de la lysine), et CSF est une protéine qui devient visible sur les cartes au bout de trente minutes ce qui est compatible avec une synthèse protéique (**Publication 1**). Les plantules d'*Arabidopsis thaliana* (**Publication 5**) réagissent aussi à un choc de froid. P1, P3 et P6 (31, 32 et 60 kDa) ont un point isoélectrique qui diminue en moins de dix minutes après le début de l'application d'un choc de froid (ce qui est compatible avec des phosphorylations). Le séquençage N-terminal a permis d'identifier P3 comme étant l'anhydrase carbonique, une enzyme connue pour jouer un rôle dans la régulation du pH du chloroplaste. P2 est un spot de 31 kDa qui disparaît en moins de dix minutes (dégradation ou modification post-traductionnelle).
3. Pour essayer de mieux analyser le rôle du calcium dans ces phénomènes, nous avons utilisé des inhibiteurs de canaux calciques (Lanthane et Rouge de Ruthénium) ainsi qu'un chélateur de calcium (EGTA). La production des méristèmes épidermiques

montre que ces inhibiteurs ont un effet sur la perception des signaux environnementaux. En présence de ces substances administrées, avant, pendant et juste après l'application du choc de froid, et ce pendant une durée limitée (deux à quatre heures), la quantité de méristèmes produits est beaucoup plus faible, voire quasi nulle. Les inhibiteurs empêchent donc la perception, et/ou la transduction, et/ou le stockage de l'information en modifiant l'homéostasie du calcium intracellulaire. L'analyse protéomique montre qu'en l'absence d'une déplétion calcique, les effets de l'EGTA et du lanthane semblent identiques au niveau de l'hypocotyle de lin, que ce soit avec ou sans l'application d'un choc de froid. Les protéines CSA, CSB et CSC, protéines affectées lors du choc de froid, ont un point isoélectrique qui diminue en présence de ces substances (probablement une modification post-traductionnelle du type phosphorylation). Le lanthane et l'EGTA induisent l'apparition de Inhib1 (21 kDa) et la diminution du point isoélectrique de Inhib2 (20 kDa) de façon spécifique. De même, l'étude par électrophorèse bidimensionnelle des effets d'une déplétion calcique de 12 heures avec ou sans choc de froid au préalable, montre que CSA, CSB et CSC sont modifiées (leurs points isoélectriques diminuent). CSD, CSG, Depl1 (30 kDa) et Depl2 (21 kDa) par contre n'apparaissent sur les cartes protéiques que si la déplétion calcique n'est pas précédée d'un choc de froid. Ces résultats montrent qu'en présence d'inhibiteurs de canaux calciques ou de chélateur de calcium, la perception du choc de froid ne se produit pas. De même, la déplétion calcique à la suite d'un choc de froid produit des modifications des cartes protéiques différentes de celles observées lors d'une déplétion calcique sans choc de froid.

4. En utilisant le modèle de l'induction des méristèmes épidermiques, nous avons montré que le lin réagit de la même façon à une irradiation de deux heures par un téléphone portable à 900 MHz (**Publication 3**) ou un oscillateur de Gunn à 105 GHz (**Publication 4**) qu'à un choc de froid. Dans les deux cas, les rayonnements électromagnétiques entraînent l'apparition de méristèmes avec une cinétique similaire mais produisant un peu moins de méristèmes que lors d'un choc de froid. Chez le lin, trois protéines subissent des modifications à la suite de l'émission d'un téléphone portable : CSA (P1 dans la **publication 3**), CSC (P2 dans la **publication 3**) et P3 (30 kDa) voient leurs points isoélectriques diminuer, ce qui est compatible avec une phosphorylation. Cette même expérimentation avec *Arabidopsis thaliana* met en évidence la modification de six polypeptides (**Publication 5**). Les comportements de

P1, P2, P3 (anhydrase carbonique) et P6 sont identiques à ceux observés pour le choc de froid (voir précédemment). P4 (38 kDa) est par homologie de domaine apparentée aux phérophorines et apparaît sur les cartes protéiques spécifiquement à la suite de l'irradiation (probablement une néosynthèse) ; P5 (45 kDa) correspond à la spermidine synthase et voit son spot disparaître au bout de deux heures d'irradiation (dégradation ou modification post-traductionnelle).

Quels sont les mécanismes biochimiques impliqués dans la perception, la transduction et la mémorisation des signaux abiotiques chez les plantes ? La question reste ouverte. L'ensemble de nos résultats fait apparaître le rôle clé des protéines CSA, CSB, CSC, CSD, CSG pour le lin (Tableau 9), et P1, P2, P3 et P6 pour *Arabidopsis* (Tableau 10) dans la perception de plusieurs types de *stimuli* (choc de froid, rayonnements électromagnétiques). La modification de l'homéostasie du calcium semble également un paramètre clé. Cela montre l'imbrication des systèmes de perception, de transduction et peut être de mémorisation des signaux environnementaux chez les végétaux.

Si le fait est maintenant bien établi que le calcium joue un rôle prépondérant dans les événements qui suivent la perception d'un *stimulus* environnemental, les mécanismes que sous-tende ce rôle ne sont toujours pas vraiment connus. Comme le pressentent certains auteurs, il ne faut peut être pas voir les augmentations de la concentration cytosolique du calcium comme un phénomène isolé mais plus comme une partie d'un ensemble plus important [Plieth, 2001]. En effet, vouloir analyser une réponse à un signal comme un enchaînement linéaire de processus biochimiques bien définis semble aujourd'hui insuffisant. Beaucoup de résultats expérimentaux suggèrent l'idée d'une structure cellulaire capable de réagir directement avec son environnement. En effet, il n'est pas forcément nécessaire de faire appel à des molécules spécialisées (comme des récepteurs) pour que la cellule puisse percevoir un *stimulus*. Ainsi, lors d'un choc de froid, la membrane plasmique et le cytosquelette, par exemple, subissent des modifications physiques liées à la diminution de la fluidité membranaire, entraînant l'activation de certains gènes qui codent des protéines permettant, en rétro-action, de modifier le cytosquelette et la fluidité membranaire [Mazars *et al.*, 1997 ; Örvar *et al.*, 2000]. D'autres expériences montrent aussi que les gradients de calcium à l'intérieur des cellules participant à la croissance apicale, jouent un rôle dans le contrôle de la structure des filaments d'actine et donc sur le cytosquelette de ces cellules [Yokata *et al.*, 1999 ; Yokata *et al.*, 2000].

Le cytoplasme n'est pas une simple solution aqueuse contenant des ions, des protéines, des métabolites ainsi que d'autres molécules. Ainsi, la voie des MAPKs ne semble pas reposer sur un ensemble de protéines kinases en solution, mais plutôt sur une structure finement régulée par des protéines d'assemblage (*scaffold proteins*) ainsi que par les ions [Levcenko *et al.*, 2000]. La localisation des protéines kinases calcium-dépendantes est souvent proche de la membrane plasmique et il a été montré qu'il existait une association de ces protéines avec les filaments d'actine [Putnam-Evans *et al.*, 1989]. Comme les filaments d'actine sont déjà connus pour être sensibles au calcium par l'intermédiaire de phosphorylations, les protéines kinases calcium-dépendantes ont peut être un rôle dans la régulation de la structuration de ces filaments et donc dans le contrôle du cytosquelette et des flux cytoplasmiques. Il a aussi été montré que des interactions entre les microtubules et les canaux modifient l'activité de ces canaux vis-à-vis du calcium, ce qui laisse envisager le contrôle des flux ioniques dans la cellule par la structure du cytosquelette et donc par un réseau structuré et régulé [Thion *et al.*, 1996].

Toutes ces données font converger la représentation des systèmes cellulaires vers la notion d'ensembles intégrés dans lesquels les différents constituants qui interviennent, par exemple dans une chaîne de transduction, sont « assemblés » les uns aux autres et avec les filaments du cytosquelette (chez les eucaryotes) pour donner naissance à une structure cohérente qui permet de véhiculer une information. Ces structures sont dynamiques et se forment hors équilibre ; leurs constituants peuvent s'assembler « quand la cellule en a besoin » et disparaître à d'autres moments. Le calcium et les phénomènes de condensation des contre-ions, déjà évoqués, pourraient jouer un rôle clé dans cet assemblage. On peut désigner ce type de structure cohérente par le terme d'hyperstructure [Norris *et al.*, 1999]. Des travaux de modélisation de ces hyperstructures ont déjà été entrepris au sein du laboratoire et montrent que dans une cellule « *in silico* » la présence d'un substrat dans le milieu extérieur induit la formation d'un ensemble regroupant les enzymes nécessaires à la dégradation et l'utilisation de ce substrat [Le Sceller *et al.*, 2000]. Nous avons suggéré qu'un réseau de macromolécules, d'extension cellulaire, pourrait jouer le rôle de « récepteur intégré » [Ripoll, 2002]. Ce réseau pourrait être vu, conceptuellement, comme un réseau d'hyperstructures. Dans cette conception, la dynamique des réponses que peut faire une cellule aux différentes sollicitations qu'elle reçoit dépend du réseau d'hyperstructures et donc de l'état physiologique de la cellule. En particulier les signaux abiotiques pourraient induire, comme nous l'avons déjà discuté au §

II.2.3, des changements dans la structure du réseau. Certains de ces changements de structure pourraient ne pas être entièrement réversibles quand cesse la stimulation de la cellule. L'application d'une série de *stimuli* laissera donc des « traces structurales » qui auront un effet sur la réponse produite par le réseau lors de la dernière sollicitation à laquelle il est soumis. C'est un phénomène de mémoire. La nature biochimique et moléculaire de ces « traces » est inconnue. Mais le modèle de réseau comme « récepteur intégré » peut être un guide pour l'expérimentation, en ce sens qu'il suggère qu'il n'existe pas une molécule unique dépositaire de la mémoire et que cette mémoire peut en fait être diffuse dans la plante entière (chaque cellule étant dans un état qui dépend de l'histoire de la plante en matière de stimulations physico-chimiques). Des approches, telle celle que nous avons tenté d'initier ici sur le lin, qui consistent à produire des cartes globales des biomolécules (ici du protéome) semblent donc appropriées.

A partir des travaux que nous avons déjà effectués, il serait intéressant, d'une part de mieux caractériser les protéines impliquées dans les systèmes de transduction des signaux environnementaux pour mieux comprendre les mécanismes biochimiques mis en œuvre, et d'autre part de mettre au point de nouvelles méthodes d'analyse. La technologie SIMS ouvre la voie à de nouvelles techniques pouvant apporter des informations biologiques importantes. En couplant l'électrophorèse bidimensionnelle miniaturisée et le SIMS, il serait peut être possible de mettre en évidence plusieurs modifications post-traductionnelles (par l'utilisation de marquages non radioactifs) dans le protéome d'une seule cellule (la sensibilité de la technique le permet en principe, et prélever les protéines d'une seule cellule est maintenant chose courante). Les nanotechnologies permettront sans doute l'émergence de telles techniques, rendant les analyses plus fines et encore plus précises. Pour imager le calcium dans les cellules, le SIMS couplé aux cryotechniques permettra de mieux caractériser les modifications spatiales, cellulaires et tissulaires de la répartition de cet ion. Enfin, l'utilisation du système æquorine sur le modèle expérimental que nous utilisons pourrait être d'une grande utilité pour mieux comprendre les implications de l'ion calcium dans les mécanismes de transduction des signaux environnementaux chez les plantes.

Quatrième Partie

Annexes

Annexe 1: Compositions des milieux de culture

Milieu normal

<i>Macroéléments</i>	g/L	mmol/L
KNO ₃	0,7	6,92
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	0,55	2,33
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,4	1,62
NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	0,34	2,18

<i>Microéléments</i>	mg/L	μmol/L
MnSO ₄ , H ₂ O	1,69	10
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,25	1
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,29	1
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,05	0,21
BO ₃ H ₃	1,69	27,33
C ₁₀ H ₁₂ N ₂ NaFeO ₈	36,71	100

Milieu sans Calcium (plus les microéléments)

<i>Macroéléments</i>	g/L	mmol/L
KNO ₃	1,17	11,58
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,4	1,62
NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	0,34	2,18

Milieu sans Phosphate (plus les microéléments)

<i>Macroéléments</i>	g/L	mmol/L
KNO ₃	0,7	6,92
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	0,55	2,33
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,4	1,62

Lanthane (ajouté au milieu sans phosphate)

	mg/L	μmol/L
La(NO ₃) ₃ , 6H ₂ O	4,33	10

EGTA (ajouté au milieu sans calcium)

	g/L	mmol/L
EGTA	0,886	2,33

Annexe 2 : Compositions des tampons utilisés

1) Extraction

Acétone TCA	10% acide trichloroacétique, 0,07% β -mercaptoéthanol dans l'acétone pure.
Lavage Acétone	0,07% β -mercaptoéthanol dans l'acétone pure.
Extraction	9,5 mol/L urée, 50mmol/L dithioérythritol, 5% 3-([3-cholamidopropyl]diméthyl-ammonio]-1-propanesulfonate, 4% polyvinylpyrrolidone, 25mmol/L spermine base, trace de bleu de bromophénol.
Activité en Solution	20mmol/L tris-HCl pH 7,4, 50mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA, 1mmol/L EGTA, 1 μ g/mL leupeptin, 1 μ g/mL cantharidine, 1 μ g/mL antipaïne, 0,1 μ g/mL acide okadaïque, 0,2mmol/L Na ₃ VO ₄ , 5mmol/L β -mercaptoéthanol.

2) Focalisation

Réhydratation	8 mol/L urée, 15mmol/L DTE, 0,8% ampholines (m/v), 2% CHAPS, trace de bleu de bromophénol.
----------------------	--

3) Rééquilibration

Rééquilibration 1	50mmol/L tris(hydroxyméthyl)aminométhane-HCl pH 8,8, 6mol/L Urée, 24% Glycérol (m/v), 2% DTE, 2% dodécylsulfate de sodium.
Rééquilibration 2	50mmol/L tris-HCl pH 8,8, 6mol/L urée, 24% glycérol (m/v), 2% SDS, 2,5% iodoacétamide, trace de bleu de bromophénol.

4) Deuxième dimension

Tampon anodique	2,4% tris (base), 0,4% glycine.
Tampon cathodique	0,3% tris (base), 1,4% glycine, 0,1% SDS.
Agarose	0,5% agarose, 0,3% tris (base), 1,4% glycine, 0,1% SDS.

5) Transfert

Tampon de Transfert	48mmol/L tris (base), 39mmol/L glycine, 0,1% SDS, 20% isopropanol.
----------------------------	--

7) Activité sur gel

Lavage	2 mmol/L tris-HCl, 0,5mMol/L dithioérythritol, 0,1mMol/L Na ₃ VO ₄ , 5mMol/L NaF, 0,5mg/mL BSA, 0,1% triton X100 pH 7,5.
Renaturation	25mmol/L tris-HCl, 1mMol/L dithioérythritol, 0,1mMol/L Na ₃ VO ₄ , 5mMol/L NaF, pH 8.
Réaction	25mmol/L tris-HCl, 1mMol/L Dithioérythritol, 0,1mMol/L Na ₃ VO ₄ , 2mMol/L EGTA, 12mMol/L MgCl ₂ , 200nMol/L ATP 170μCi γ ³² P-ATP pour 100mL, pH 8.
Arrêt	5% acide trichloroacétique, 1% pyrophosphate de sodium.

Annexe 3 : Coloration Argentique Basique

<i>Lavage</i>	<i>Eau</i>		<i>5 min</i>
Fixateur 1	Ethanol Acide acétique	40 % (V/V) 10 % (V/V)	45 min
Fixateur 2	Ethanol Acide acétique	5 % (V/V) 5 % (V/V)	1 nuit
<i>Lavage</i>	<i>Eau</i>		<i>5 min</i>
Sensibilisateur	Sodium acétate Glutaraldéhyde 25%	4 % (m/V) 4 % (V/V)	30 min
<i>Lavage</i>	<i>Eau</i>		<i>3x10 min</i>
Naphtalène	Naphtalène disulfonique	0,005 % (m/V)	2x30 min
<i>Lavage</i>	<i>Eau</i>		<i>4x15 min</i>
Nitrate d'Argent	NaOH 10N Hydroxyde d'ammonium 25% Nitrate d'Argent	0,2 % (V/V) 1,33 % (V/V) 0,8 % (m/V)	30 min
<i>Lavage</i>	<i>Eau</i>		<i>4x4 min</i>
Développement	Acide citrique Formaldéhyde 37%	0,01 % (m/V) 0,27 % (V/V)	5-10 min
Stop	Tris Acide acétique	5 % (m/V) 2 % (V/V)	10 min

*Références
Bibliographiques*

A

- Adam, A.L., Pike, S., Hoyos, M.E., Stone, J.M., Walker, J.C. and Novacky, A. (1997). Rapid and transient activation of myelin basic protein kinase in tobacco leaves treated with harpin from *Erwinia amylovora*. *Plant Physiol.* **115**, 853-861.
- Alessi, D.R., Saito, Y., Campbell, D.G., Cohen, P., Sithanandam, G., Rapp, U., Ashworth, A., Marshall, C.J., and Cowley, S. (1994). Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by P74raf-1. *EMBO J.* **13**, 1610-1619.
- Alexandre, J., Lassalles, J.P., and Kado, R.T. (1990). Opening of Ca²⁺ channels in isolated red beet root vacuole membrane by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Nature* **343**, 567-570.
- Allen, G.J., and Sanders, D. (1994). Two voltage-gated calcium release channels coreside in the vacuolar membrane of guard cells. *Plant Cell* **6**, 685-694.
- Allen, G.J., and Sanders, D. (1995). Protein phosphatase 2B (calcineurin) modulates the Ca²⁺ selective slow vacuolar ion channel of stomatal guard cells. *Plant Cell* **7**, 1473-1483.
- Allen, G.J., and Sanders, D. (1996). Control of ionic currents in guard cell vacuoles by cytosolic and lumenal calcium. *Plant J.* **10**, 1055-1067.
- Allen, G.J., Amtmann, A. And Sanders, D. (1998). Calcium-dependent and calcium-independent K⁺ mobilization channels in *Vicia faba* guard cells vacuoles. *J. Exp. Bot.* **49**, 305-318.
- Allen, G.J., and Sanders, D. (1997). Vacuolar ion channels of higher plants. *Adv. Bot. Res.* **25**, 218-252.
- Allen, G.J., Muir, S.R., and Sanders, D. (1995). Release of Ca²⁺ from individual plant vacuoles by bath InsP₃ and cyclic ADP-ribose. *Science* **268**, 735-737.
- Allis, J.W. and Sinha, B.L. (1981). Fluorescence depolarization studies of red cell membrane fluidity. The effect of exposure to 1.0 GHz microwave radiation. *Bioelectromag.* **2**, 13.
- Allis, J.W. and Sinha, B.L. (1982). Fluorescence depolarization studies of the phase transition in multilamellar phospholipid vesicles exposed to 1.0 GHz microwave radiation. *Bioelectromag.* **3**, 323.
- Allix, J. (1852). Communication universelle et instantanée de la pensée, à quelque distance que ce soit, à l'aide d'un appareil portatif appelé boussole Pasilalinique Sympathique, par MM Benoît et Biat-Chrétien. Mémoire non publié pour le moment.
- Ames, J.B., Ishima, R., Tanaka, T., Gordon, J.I., Stryer, L. and Ikura, M. (1997). Molecular mechanics of calcium-myristoyl switches. *Nature* **389**, 198-202.
- Appleby, J.L., Parkinson, J.S. and Bourret, R.B. (1996). Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less travelled. *Cell* **86**, 845-848.
- Audus, L.J. (1960). Magnetotropism, a new plant growth response. *Nature* **185**, 132-134.
- Axelsen, K.B., and Palmgren, M.G. (1998). Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J. Mol. Evol.* **46**, 84-101.

B

- Bachmann, M., Shiraishi, N., Campbell, W.H., Yoo, B.C., Harmon, A.C., and Huber, S.G. (1996). Identification of the major regulatory phosphorylation site as Ser-543 in spinach leaf nitrate reductase and its phosphorylation by a calcium-dependent protein kinase in vitro. *Plant Cell* **8**, 505-517.
- Baker, R.R. (1984). Human Magnetoreception for navigation, in O'Connor, M.E., and Lovely, R.H. eds., *Electromagnetic Fields and Neurobehavioral Function*, Liss, A.R. NY.
- Barnothy, M.F. ed., *Biological effects of magnetic fields*, Plenum Press, NY, Vol. 1, 1964.
- Baudet, V., Mouellic, H.L., Campbell, A.K., Lucas-Meunier, E., Fossier, P. and Brulet, P. (2000). Chimeric green fluorescent protein-aequorin as bioluminescent Ca²⁺ reporters at the single cell level. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7260-7265.

- Baudouin, E., Meskiene, I., and Hirt, H. (1999). Unsaturated fatty acids inhibits MP2C, a protein phosphatase 2C involved in the wound-induced MAP kinase pathway regulation. *Plant J.* **20**, 343-348.
- Bauer, C.S., Plieth, C., Hansen, U.P., Sattlemacher, B., Simonis, W., and Schonknecht, G. (1997). Repetitive Ca²⁺ spikes in a unicellular green alga. *FEBS Lett.* **405**, 390-393.
- Bauer, C.S., Plieth, C., Bethmann, B., Popescu, O., Hansen, U.P., Simonis, W., and Schonknecht, G. (1998). Strontium-induced repetitive calcium spikes in a unicellular green alga. *Plant Physiol.* **117**, 545-557.
- Becker, G. (1976). Reaction of termites to weak alternating magnetic fields. *Naturwissenschaften* **63**, 201-202.
- Becker, G. (1979). Communication between termites by means of biofields and the influence of magnetic and electric fields on termites, in Popp, Fritz A., G. Becker, H.L. König, and W. Peschka, eds., *Electromagnetic Bio-information*, Urban and Schwarzenberg, Baltimore, 1979
- Becker, R.O. and Marino, A.A. (1982). *Electromagnetism and Life*, State University of New York Press.
- Becraft, P.W., Stinard, P.S. and McCarty, D.R. (1996). CRINKLY4: A TNFR-like receptor kinase involved in maize epidermal differentiation. *Science* **273**, 1406-1409.
- Bell, G., Marino, A.A., Chesson, A.L. and Struve, F.A. (1991). Human sensitivity of weak magnetic fields. *Lancet* **338**, 1521-1522.
- Berberich, T. and Kusano, T. (1997). Cycloheximide induces a subset of low temperature-inducible genes in maize. *Molec. Gen. Genet.* **254**, 275-283.
- Berger, F., and Brownlee, C. (1993). Ratio confocal imaging of free cytoplasmic calcium gradients in polarising and polarised *Fucus* zygotes. *Zygote* **1**, 9-15.
- Berger, F., Taylor, A.R. and Browlee C. (1994) Cell fate determination by the cell wall in early *Fucus* development. *Science* **263**, 1421-1423.
- Bergey, D.R., Howe, G.A., and Ryan, C.A. (1996). Polypeptide signalling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signalling in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12053-12058.
- Berntsen, S. and Bach Andersen, J. (1991). A general formulation of applied potential tomography. *Radio Sc.* **26**, 535.
- Berridge, M.J. (1997). The AM and FM of calcium signaling. *Nature* **386**, 759-760.
- Berteaud, A.J., Dardalhon, M., Rebey Rotte, N., and Averbek, M.D. (1975). Action d'un rayonnement électromagnétique à longueur d'onde millimétrique sur croissance bactérienne. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D* **281**, 834-846.
- Bethke, P.C., and Jones, R.L. (1994). Ca²⁺-calmodulin modulates ion channel activity in storage protein vacuoles of barely aleurone cell. *Plant Cell* **6**, 277-285.
- Bhagal, M.S., and Colyer, J. (1998). Depletion of Ca²⁺ from the sarcoplasmic reticulum of cardiac muscle prompts phosphorylation of phospholamban to stimulate store refilling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1484-1489.
- Bibikova, T.N., and Gilroy, S. (1997). Root hair growth in *Arabidopsis thaliana* is directed by calcium and an endogenous polarity. *Planta* **203**, 495-505.
- Binder, B.M., Harper, J.F. and Sussman, M.R. (1994). Characterisation of an *Arabidopsis* calmodulin-like domain protein kinase purified from E. coli using an affinity sandwich technique. *Biochem.* **33**, 2033-2041.
- Blackford, S., Rea, P.A., and Sanders, D. (1990). Voltage sensitivity of H⁺/Ca²⁺ antiport in higher plant tonoplast suggests a role in vacuolar calcium accumulation. *J. Biol. Chem.* **265**, 9617-9620.
- Blackman, C.F. (1984). Stimulation of brain tissue in vitro by extremely low frequency, low intensity, sinusoidal electromagnetic fields, in O'Connor, M.E., and Lovely, R.H. eds., *Electromagnetic Fields and Neurobehavioral Function*, Alan R. Liss, NY.

- Blackman, C.F., House D.E. (1988). Effect of ambient levels of power-line frequency electric fields on a developing vertebrate. *Bioelectromag.* **9**, 129-140.
- Blackstone, C. and Sheng, M. (1999). Protein targeting and calcium signalling microdomains in neuronal cells. *Cell Calcium* **26**, 181-192.
- Bleecker A.B. (1999). Ethylene perception and signalling: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci.* **4**, 269-274.
- Blum, H., Beier, H. and Gross H.J., (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Bögre, L., Ligterink, W., Heberle-Bors, E., and Hirt, H. (1996). Mechanosensors in plants. *Nature* **383**, 489-490.
- Bögre, L., Ligterink, W., Meskiene, I., Baker, P., Heberle-Bors, E., and Hirt, H. (1997). Wounding induces the rapid and transient activation of a specific MAP kinase pathway. *Plant Cell* **9**, 75-83.
- Bolomey, J. C., Pichot, C., and Garbورياud, G. (1991). Planar microwave imaging camera for biomedical applications: critical and prospective analysis of reconstruction algorithms. *Radio Sc.* **26**, 541.
- Bond, J.D. and Wyeth, N.C. (1986). Are membrane microwave effects related to a critical phase transition? *J. Chem. Phys.* **85**, 7377.
- Bond, J.D. and Wyeth, N.C. (1987). Membrane, electromagnetic fields, and critical phenomena, in: "Mechanistic Approaches to Interaction of Electromagnetic Fields with Living Systems". M. Blank, and E. Findl, eds., Plenum Press, New York.
- Bourgeade, P., Boyer, N., De Jaegher, G. and Gaspar, T. (1989) Carry-over of thigmomorphogenetic characteristics in calli derived from *Bryonia dioica* internodes. *Plant Cell Tis. Org. Cult.* **19**, 199-211.
- Borgens, R.B., Vanable, J.W. and Jaffe, L.F. (1979). Bioelectricity and regeneration. *Biosci.* **29**, 468-474.
- Borgens, R.B., Vanable, J.W. and Jaffe, L.F. (1979). Reduction of sodium dependent stump currents disturbs urodele limb regeneration. *J. exp. zoology* **209**, 377-386.
- Bowler, C., Neuhaus, G., Vamagata, H., and Chua, N-H. (1994). Cyclic-GMP and calcium mediate phytochrome transduction. *Cell* **77**, 73-81.
- Bowles, D.J. (1993). Local and systemic signals in the wound stress response. *Semin. Cell Biol.* **4**, 103-111.
- Boyer, N., Gaspar, T. and Lamond, M. (1979) Modification des isoperoxydases et de l'allongement des entre-noeuds de Bryone à la suite d'irritations mécaniques. *Z. Pflanzenphysiol.* **93**, 459-470.
- Boyer, N., Desbiez, M.O., Hofinger, M. and Gaspar, T. (1983) Effect of lithium on thigmomorphogenesis in *Bryonia dioica*, ethylene production and sensitivity. *Plant Physiol.* **72**, 522-525.
- Braam, J. (1992). Regulated expression of the calmodulin-related TCH genes in cultured *Arabidopsis* cells: induction by calcium and heat shock. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 3213-3216.
- Braam, J., Sistrunk, M.L., Polisensky, D.H., Xu, W., Purugganan, M.M., Antosiewicz, D.M., Campbell, P., and Johnson, K.A. (1997). Plant responses to environmental stress : regulation and functions of the *Arabidopsis* TCH genes. *Planta* **203**, S35-S41.
- Brauer, M., Sers, D. and Stitt M. (1990). Regulation of photosynthetic sucrose synthesis: a role of Ca²⁺? *Planta* **182**, 236-243.
- Braune, S., Wrocklage, C., Raczek, J., Gailus, T. and Lucking, C.H. (1998). Resting blood pressure increase during exposure to a radio-frequency electromagnetic field. *Lancet* **9119**, 1857-1858.
- Bray, A.E. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.* **2**, 48-54.

- Brewer, H.B. (1979). Some preliminary studies of the effects of a static magnetic field on the life cycle of the *Lebistes reticulatus*. *Biophysical J.* **28**, 305-314.
- Breviario, D., Morello, L. and Giani, S. (1995). Molecular cloning of two novel rice cDNA sequences encoding putative calcium-dependent protein kinases. *Plant Molec. Biol.* **27**, 953-967.
- Brinley, F.J., Tiffert, T., and Scarpa, A. (1977). Mitochondria and other calcium buffers of squid axon studied *in situ*. *J. Gen. Physiol.* **70**, 355.
- Broquetas, A., Romou, J. Rius, J.M., Elias-Fuste, A.R., Cardama, A., and Jofre, L. (1991), Cylindrical geometry: a further step in active microwave tomography. *IEEE Trans. on microwave Theory and Techniques*, MTT 39:844.
- Brown, F.A. and Scow, K.M. (1978). Magnetic induction of a circadian cycle in hamsters, *J. interdisc. cycle res.* **9**, 137-145.
- Brownlee, C. and Berger, F. (1995). Extracellular matrix and pattern in plant embryos: on the lookout for developmental information. *Trends Gen.* **11**, 344-348.
- Brownlee, C. and Pulsford, A.L. (1988). Visualization of the cytoplasmic Ca²⁺ gradient in *Fucus serratus* rhizoids: Correlation with cell ultrastructure and polarity. *J. cell Sci.* **91**, 249-256.
- Brownlee, C., and Wood, J.W. (1986). A gradient of cytoplasmic free calcium in growing rhizoid cells of *Fucus serratus*. *Nature* **320**, 624-626.
- Bruce, G.K., Howlett, C.R. and Huckstep, R.L. (1987). Effect of a static magnetic field on fracture healing in rabbit radius. *Clini. Orthop.* **222**, 300-306.
- Burr, H.S. (1944). Electricity and life, *Yale Sci. Mag.*, May, 5-18.
- Burr, H.S. and Hovland, C.I. (1937). Bio-electric correlates of development in *Amblystoma*. *Yale J. Biol. Med.* **9**, 541-549.
- Burr, H.S., Musselman, L.K., Barton, D.S. and Kelly, N.B. (1937). A bio-electric record of human ovulation. *Science* **86**, 312.
- Burr, H.S. and Northrop, F.S.C. (1937). The Electro-Dynamic Theory of Life. *Quart. Rev. Biol.* **10**, 322-333.
- Burr, H.S. and Northrop, F.S.C. (1939). Evidence for the existence of an electro-dynamic field in living organisms. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **25**, 284-288.
- Burr, H.S., Smith, G.M. and Strong, L.C. (1940). Electrometric Studies of tumors induced in mice by the external application of Benzpyrene. *Yale J. Biol. Med.* **12**, 711-717.
- Burr, H.S., Strong, L.C. and Smith, G.M. (1938). Bioelectric Correlates of methylcolantherene-induced tumors in mice. *Yale J. Biol. Med.* **10**, 539-544.
- Bush, D.S. (1995). Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 95-122.
- Bush, D.S., and Jones, R.L. (1988). Cytoplasmic calcium and α -amylase secretion from barley aleurone protoplasts. *Eur. J. Cell Biol.* **46**, 466-469.

C

- Camacho, P., and Lechleiter, J.D. (1993). Increased frequency of calcium waves in *Xenopus laevis* oocytes that express a calcium ATPase. *Science* **260**, 226-229.
- Camacho, L., Parton, R., Trewavas, A.J. and Malhó, R. (2000). Imaging cytosolic free-calcium distribution and oscillations in pollen tubes with confocal microscopy: a comparison of different dyes and loading methods. *Protoplasma* **212**, 162-173.
- Camoni, L., Fullone, M.R., Marra, M., and Aducci, P. (1998). The plasma membrane H⁺-ATPase from maize roots is phosphorylated in the C-terminal domain by a calcium-dependent protein kinase. *Physiol. Plant.* **104**, 549-555.

- Cantu, A.M., Carpento, A., and Gambale, F. (1998). Cytoplasmic magnesium modulates slow vacuolar currents in plant vacuoles. Abstract from the 11th International Workshop on Plant Membrane Biology, Cambridge, UK.
- Caorsi, S., Gragnani, G.L., and Pastorino, M. (1991). A multiview microwave imaging system for two-dimensional penetrable objects. *IEEE Trans. on Microwave Theory and Techniques*, MTT 39, 845.
- Carafoli, E. (1997). Plasma membrane calcium pump: Structure, function and relationships. *Basic Res. Cardiol.* **92**, 59-61.
- Carrión, A.M., Link, W.A., Ledo, F., Mellstrom, B., and Naranjo, J.R. (1999). DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor. *Nature* **398**, 80-84.
- Cazale, A.C., Rouet-Mayer, M.A., Barbier-Brygoo, H., Mathieu, Y., and Lauriere, C. (1998). Oxidative burst and hypoosmotic stress in tobacco cell suspensions. *Plant Physiol.* **116**, 659-669.
- Cessna, S.G., Chandra, S., and Low, P.S. (1998). Hypo-osmotic shock of tobacco cells stimulates Ca²⁺ fluxes deriving first from external and then internal Ca²⁺ stores. *J. Biol. Chem.* **273**, 27286-27291.
- Chang, C. (1996). The ethylene signal transduction pathway in *Arabidopsis*: an emerging paradigm? *Trends Biochem. Sci.* **21**, 129-133.
- Chang, C., Kwok, S.F., Bleeker, A.B. and Meyerowitz, E.M. (1993). *Arabidopsis* ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science* **262**, 539-544.
- Chang, C., Schaller, G.E., Patterson, S.E., Kwok, S.F., Meyerowitz, E.M. and Bleeker, A.B. (1992). The TMK1 gene from *Arabidopsis* codes for a protein with structural and biochemical characteristics of a receptor protein kinase. *Plant Cell* **4**, 1263-1271.
- Chen, X., Chang, M., Wang, B., and Wu, B. (1997). Cloning of a Ca²⁺-ATPase gene and the role of cytosolic Ca²⁺ in the gibberellin-dependent signaling pathway in aleurone cells. *Plant J.* **103**, 363-371.
- Chiabrera, A., Grattarola, M. and Viviani, R. (1984). Interaction between electromagnetic fields and cells: Microelectrophoretic effect on ligands and surface receptors. *Bioelectromag.* **5**, 173-191.
- Chiabrera, A., Hisenkamp, M., Pilla, A.A., Ryaby, J. (1979). Cytofluorimetry of electromagnetically controlled cell dedifferentiation. *J. Histochem. Cytochem.* **27**, 375-381.
- Chiabrera, A., Viviani, R., Parodi, G., Vernazza, G., Hinsenkamp, M., Pilla, A.A., Ryaby, J., Beltrame, F., Grattarola, M. and Nicolini, C. (1980). Automated absorption image cytometry of electromagnetically-exposed frog erythrocytes. *Cytometry* **1**, 42-48.
- Cho, F.S., Phillips, K.S., Bogucki, B. and Weaver, T.E. (1994). Characterization of a rat cDNA clone encoding calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. *Biochim. Biophys. Acta* **1224**, 156-160.
- Cho, K.O., Wall, J.B., Pugh, P.C., Ito, N.I., Mueller S.A. and Kennedy, M.B. (1991). The alpha subunit of type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase is highly conserved in *Drosophila*. *Neuron* **7**, 439-450.
- Cho, M.H., and Spalding, E.P. (1996). An anion channel in *Arabidopsis* hypocotyls activated by blue light. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8134-8138.
- Cho, M.H., Shears, S.B., and Boss, W.F. (1993). Changes in phosphatidylinositol metabolism in response to hyperosmotic stress in *Daucus carota* L. cells grown in suspension culture. *Plant Physiol.* **103**, 637-647.
- Clemens, S., Antosiewicz, D.M., Ward, J.M., Schachtman, D.P., and Schroeder, J.I. (1998). The plant cDNA *LCT1* mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12043-12048.

- Cubitt, A.B., Reddy, I., Lee, S., McNally, J.G., and Firtel, R.A. (1998). Coexpression of a constitutively active plasma membrane calcium pump with green fluorescence protein identifies roles for intracellular calcium in controlling cell sorting during morphogenesis in *Dictyostelium*. *Dev. Biol.* **196**, 77-94.
- Cunningham, K.W., and Fink, G.R. (1996). Calcineurin inhibits VCX1-dependent H^+/Ca^{2+} exchange and induces Ca^{2+} ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **16**, 2226-2237.
- Czempinski, K., Zimmermann, S., Ehrhardt, T. and Müller-Röber, B. (1997). New structure and function in plant K^+ channels: KCO1 an outward rectifier with a steep Ca^{2+} dependency. *EMBO J.* **16**, 2565-2575.

D

- Damerval, C., de Vienne, D., Zivy, M. and Thiellement, H. (1986). Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* **7**, 52-54.
- De Jaegher, G., Boyer, N. and Gaspar, T. (1985). Thigmomorphogenesis in *bryonia dioica*, changes in soluble and wall peroxidases, phenylalanine ammonia lyase activity, cellulose, lignin content and monomeric constituents. *Plant Growth Regul.* **3**, 133-148.
- Demongeot J., Thomas R., Thellier M. (2000). A mathematical model for storage and recall functions in plants. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la Vie/Life Sciences* **323**, 93-97.
- Dempster, J. (1999). Fast photometric measurements of cell function combined with electrophysiology. In Mason B (ed) *Fluorescent and luminescent probes for biological activity*. Academic Press. San Diego, pp 196-209.
- Dérue, C., Gibouin, D., Lefebvre, F., Rasser, B., Robin, A., Le Sceller, L., Rasser, L., Verdus, M.C., Demarty, M., Thellier, M. and Ripoll, C. (1999). A new cold stage for SIMS analysis and imaging of frozen-hydrated biological samples. *J. Trace Microprobe Techn.* **17**, 111-122.
- Desbiez, M.O., Boyer, N., De Jaegher, G., Frachisse, J.M., Ripoll, C., Demarty, M. and Thellier, M. (1991a) Fast signalling involved in the morphogenetic responses of plants to mechanical stimuli. *Rev. Cytol. Biol. Veg. Bot.* **14**, 185-200.
- Desbiez, M.O., Gaspar, T., Crouzillat, D., Frachisse, J.M. and Thellier, M. (1987a) Effect of cotyledonary prickings on growth, ethylene metabolism and peroxidase activity in *Bidens pilosa*. *Plant Physiol. Biochem.* **25**, 137-143.
- Desbiez, M.O., Kergosien, Y., Champagnat, P. and Thellier, M. (1984) Memorization and delayed expression of regulatory messages in plants. *Planta* **160**, 392-399.
- Desbiez, M.O., Mikulecky, D. and Thellier, M. (1994) Growth messages in plants : principle of a possible modelling, and further experimental characteristics. *J. Biol. Syst.* **2**, 127-136.
- Desbiez M.O., Pichon O., Julien J.L. (1995). Detection in pricked cotyledons of a *Bidens* plant, of a substance active in breaking the symmetry of bud growth. *J. Trace Microprobe Techn.* **13**, 479-486.
- Desbiez, M.O., Ripoll, C., Pariot, C. and Thellier, M. (1991b) Elicitation of developmental processes in higher plants by hexose or myo-inositol, in the presence of K^+ or Ca^{2+} . *Plant Physiol. Biochem.* **29**, 457-462.
- Desbiez, M.O., Thellier, M. and Champagnat, P. (1987b) Storage and retrieval of morphogenetic messages in plantlets of *Bidens pilosa* L. In *The cell surface in signal transduction*, NATO ASI series, Volume H12 (E. Wagner et al., eds.), Berlin: Springer-Verlag, pp. 189-203.
- Desbiez, M.O., Tort, M. and Thellier, M. (1991c) Control of a symmetry-breaking process in the course of the morphogenesis of plantlets of *Bidens pilosa* L. *Planta* **184**, 397-402.
- Dixon, R.A., and Lamb, C.J. (1990). Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**, 339-367.

- Dolmetsch, R.E., Lewis, R.S., Goodnow, C.C., and Healy, J.I. (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* **386**, 855-858.
- Drouillard, M.J., Thibivilliers, S., Cazalé, A.C., Barbier-Brygoo, H. and Laurière C. (2000). Protein kinases induced by osmotic stresses and elicitor molecules in tobacco cell suspensions: two crossroad MAP kinase and one osmoregulation-specific protein kinase. *FEBS Lett.* **474**, 217-222.

E

- Edman, P. (1950). Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chem. Scand.* **4**, 283-290.
- Ehrhardt, D.W., Atkinson, E.M., and Long, S.R. (1992). Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science* **256**, 998-1000.
- Ehrhardt, D.W., Wais, R., and Long, S.R. (1996). Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell* **85**, 673-681.
- Ermolayeva, E., Hohmeyer, H., Johannes, E., and Sanders, D. (1996). Calcium-dependent membrane depolarization activated by phytochrome in the moss *Physcomitrella patens*. *Planta* **199**, 352-358.
- Ermolayeva, E., Sanders, D., and Johannes, E. (1997). Ionic mechanism and role of phytochrome-mediated membrane depolarization in caulonemal side branch initial formation in the moss *Physcomitrella patens*. *Planta* **201**, 109-118.
- Evans, D.E., and Williams, L.E. (1998). P-type calcium ATPases in higher plants-Biochemical, molecular and functional properties. *Biochem. Biophys. Acta* **1376**, 1-25.

F

- Fanger, G.R., Gerwins, P., Widmann, C., Jarpe, M.B., and Johnson, G.L. (1997). MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls : upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinase? *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**, 67-74.
- Felle, H. (1989). Ca²⁺-selective microelectrodes and their application to plant cells and tissues. *Plant Physiol.* **91**, 1239-1242.
- Felle, H., and Kepler, P.K. (1997). The cytosolic Ca²⁺ concentration gradient of *Sinapis alba* root hairs as revealed by Ca²⁺-selective microelectrode tests and fura-dextran ratio imaging. *Plant Physiol.* **114**, 39-45.
- Ferrol, N., and Bennett, A.B. (1996). A single gene may encode differentially localized Ca²⁺-ATPases in tomato. *Plant Cell* **8**, 1159-1169.
- Franklin-Tong, V.E., Drobak, B.K., Allen, A.C., Watkins, P.A.C., and Trewavas, A.J. (1996). Growth of pollen tubes of *Papaver rhoeas* is regulated by a slow-moving calcium wave propagated by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Plant Cell* **8**, 1305-1321.
- Franklin-Tong, V.E., Hackett, G., and Hepler, P.K. (1997). Ratio- imaging of Ca²⁺ in the self-incompatibility response of *Papaver rhoeas*. *Plant J.* **12**, 1375-1386.
- Fricke, H. (1953). Relation of the permittivity of biological cell suspensions to fractional cell volume. *Nature* **172**, 731-732.
- Fricke, M.D., Plieth, C., Knight, H., Blancaflor, E., Knight, E.R., White, N. and Gilroy, S. (1999). Fluorescence and luminescence techniques to probe ion activities in living plant cells. In Mason B (ed) *Fluorescent and luminescent probes for biological activity*. Academic Press. San Diego, pp569-596.
- Friedman, H., Becker, R.O. and Bachman, C. (1962). Direct current potentials in hypnoanalgesia. *Arch. General Psy.* **7**, 193-197.

- Fröhlich, H. (1968). Long range coherence and energy storage in biological systems. *Int. J. Quant. Chem.* **2**, 641-649.
- Fröhlich, H. (1975). The extraordinary dielectric properties of biological materials and the action of enzymes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**, 4211-4215.
- Fröhlich, H., (1978). Coherent electric vibrations in biological systems and the cancer problem. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques*, MTT-26, 613-617.
- Fröhlich, H. (1980). The biological effects of microwaves and related questions. *Adv. Electronics and Electron. Phys.* **53**, 85-152.
- Frohnmeier, H., Bowler, C., Zhu, J-K., Yamagata, H., Schäfer, E., and Chua, N.-H. (1998). Different roles for calcium and calmodulin in phytochrome and UV-regulated expression of chalcone synthase. *Plant J.* **13**, 763-772.

G

- Garrington, T.P., and Johnson, G.L. (1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signalling pathways. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **11**, 211-218.
- Gartner, A., Nasmyth, K., and Ammerer, G. (1992). Signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires tyrosine and threonine phosphorylation of FUS3 and KSS1. *Genes Dev.* **6**, 1280-1292.
- Gaudino, R.J. and Pikaard, C.S. (1997). Cytokinin induction of RNA polymerase I transcription in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **272**, 6799-6804.
- Gelli, A., and Blumwald, E. (1993). Calcium retrieval from vacuolar pools. *Plant Physiol.* **102**, 1139-1146.
- Gill, D.L., Waldron, R.T., Rys-Sikora, K.E., Ufret-Vincenty, C.A., Graber, M.N., Favre, C.J., and Alfonso, A. (1996). Calcium pools, calcium entry, and cell growth. *Biosci. Rep.* **16**, 139-157.
- Gilroy, S., Read, N.D., and Trewavas, A.J. (1990). Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol trisphosphate initiates stomatal closure. *Nature* **346**, 769-771.
- Gilroy, S., Bethke, P.C. and Jones, R.L. (1993). Calcium homeostasis in plants. *J. Cell Sci.* **106**, 453-462.
- Golant, M.B., Mijdrick, D.G., Kruglakova, O.P., and Izvol'skaya, V.E. (1994). Effect of EHF-radiation polarization on yeast cells. *Radiophys. Quantum Electron.* **37**, 82-84.
- Goldbeter, A., Dupont, G., and Berridge, M.J. (1990). Minimal model for signal-induced Ca^{2+} oscillations and for their frequency encoding through protein phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1461-1465.
- Gong, M., Van de Luit, A.H., Knight, M.R., and Trewavas, A.J. (1998). Heat-shock-induced changes in intracellular Ca^{2+} level in tobacco seedlings in relation to thermotolerance. *Plant Physiol.* **116**, 429-437.
- Gonzalez, F.A., Raden, D.L., and Davis, R.J. (1991). Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. *J. Biol. Chem.* **266**, 22159-22163.
- Goodman, R., Abbot, J., Krim, A.J. and Henderson, A.S. (1985). The effect of pulsing electromagnetic fields on RNA, DNA, and protein synthesis in Chinese hamster ovary cells, in Bioelectrical Repair and Growth Society (BRAGS). (1981). Transactions of the First Annual Meeting, Vol. **5**.
- Goodman, R. and Henderson, A.S. (1988). Exposure of salivary gland cells to low-frequency electromagnetic fields alters polypeptide synthesis, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **85**, 3928-3932.
- Gorman, A.L.F., and Thomas, M.V. (1980). Intracellular calcium accumulation during depolarization in a molluscan neurone. *J. Physiol.* **308**, 259-285.
- Grabov, A., and Blatt, M.R. (1997). Parallel control of the inward rectifier K^+ channel by cytosolic free Ca^{2+} and pH in *Vicia* guard cells. *Planta* **201**, 84-95.

- Grabov, A., and Blatt, M.R. (1998). Membrane voltage initiates Ca^{2+} waves and potentiates Ca^{2+} increases with abscisic acid in stomatal guard cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4778-4783.
- Granier, F. (1988). Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **9**, 712-718.
- Grattarola M., Chiabrera, A., Viviani, R. and Parodi, G. (1985). Interactions between weak electromagnetic fields and biosystems, *J. Bioelectricity* **4**, 211-225.
- Greene, J.J., Skowronski, W.J., Mullins, J.M. and Nardone, R.M. (1991). Delineation of electric and magnetic field effects of extremely low frequency electromagnetic radiation on transcription, *Biochem. Biophys. Res. Com.* **174**, 742-749.
- Grillo, S., and Leone, A. (eds) (1996). 'Physical Stresses in Plants, Genes and their Products for Tolerance'. Springer, Berlin.
- Grodzinsky, A.J. (1983). Electromechanical and physicochemical properties of connective tissue. *CRC Critical Reviews in Biomedical Engineering* **9**, 133-199.
- Grundler, W., and Kaiser, E. (1992). Experimental evidence for coherent excitations correlated with cell growth. *Nanobiol.* **1**, 163-176.
- Gu, X., and Spitzer, N.C. (1995). Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous Ca^{2+} transients. *Nature* **375**, 784-787.
- Gustin, M.C., Albertyn, J., Alexander, M. and Davenport, K. (1998). MAP kinase pathways in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1264-1300.

H

- Hackett, R.M., Oh, S.A., Morris, P.C., and Grierson, D. (1998). A tomato MAP kinase kinase gene (accession no. AJ 000728) differentially regulated during fruit development, leaf senescence, and wounding. *Plant Physiol.* **117**, 1526-1526.
- Hagman, M.J. and Levin, R.L. (1990). Procedures for noninvasive electromagnetic property and dosimetry measurements. *IEEE, Trans. on Antennas and Propagation*, AP 38, 99.
- Harding, S.C., and Wolniak, S.M. (1998). Molecular cloning and characterisation of maize ZmMEK1, a protein kinase with a catalytic domain homologous to mitogen- and stress-activated protein kinase kinases. *Planta* **206**, 577-584.
- Hardingham, G.E., Chawla, S., Johnson, C., and Balding, H. (1997). Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* **385**, 260-264.
- Harper, J.F., Sussman, M.R., Schaller, G.E., Putnam-Evans, C., Charbonneau, H., and Harmon, A.C. (1991). A calcium-dependent protein kinase with a regulatory domain similar to calmodulin. *Science* **252**, 951-954.
- Harper, J.F., Hong, B., Hwang, I., Guo, H.Q., Stoddard, R., Huang, J.F., Palmgren, M.G., and Sze, H. (1998). A novel calmodulin-regulated Ca^{2+} -ATPase (ACA2) from *Arabidopsis* with an N-terminal autoinhibitory domain. *J. Biol. Chem.* **273**, 1099-1106.
- Harrington, Daniel B., and Robert O. Becker, (1973). Electrical stimulation of RNA and protein synthesis in the frog erythrocyte, *Exp. Cell Res.* **76**, 95-98.
- Hedrich, R., and Neher, E. (1987). Cytoplasmic calcium regulates voltage dependent ion channels in plant vacuoles. *Nature* **329**, 833-836.
- Henry, C.A., Jordan, J.R., and Kropf, D.L. (1996). Localized membrane-wall adhesion in *Pelvetia* zygotes. *Protoplasma* **190**, 39-52.
- Hermann, A., and Felle, K.H. (1995). Tip growth in root hair cells of *Sinapis alba* L.: Significance of internal and external Ca^{2+} and H^{+} . *New Phytol.* **129**, 523-533.
- Hirschi, K.D., Zhen, R.G., Cunningham, K.W., Rea, P.A., and Fink, G.R. (1996). CAX1 an $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ antiporter from *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8782-8786.

- Hirschi, K.D. (1999). Expression of *Arabidopsis* CAX1 in tobacco: altered calcium homeostasis and increase stress sensitivity. *Plant Cell* **11**, 2113-2122.
- Hirt, H. (2000). Connecting oxidative stress, auxin, and cell cycle regulation through a plant mitogen-activated protein kinase pathway. *PNAS* **97**, 2405-2407.
- Holdaway-Clarke, T.L., Feijó, J.A., Hackett, G.R., Kunkel, J.G., and Hepler, P.K. (1997). Pollen tube growth and the intracellular cytosolic calcium gradient oscillates in phase while extracellular calcium influx is delayed. *Plant Cell* **9**, 1999-2010.
- Holdaway-Clarke, T.L., Hackett, G.R., Kunkel, J.G., Hepler, P.K., and Feijó, J.A. (1998). Oscillations of cell expansion rate, cytoplasmic calcium, and calcium influx in the pollen tube. *J. Gen. Physiol.* **112**, 94.
- Holian, O., Astumian, R.D., Lee, R.C., Reyes, H.M., Attar, B.M. and Walter, R.J. (1996). Protein Kinase C activity is altered in HL60 cells exposed to 60 Hz AC electric fields. *Bioelectromag.* **17**, 504-509.
- Hong, B.A., Ichida, S., Wang, Y., Gens, J.S., Pickard, B.G., and Harper, J.F. (1999). Identification of a calmodulin-regulated calcium ATPase in the ER. *Plant Physiol.* **119**, 1165-1176.
- Horn, H. (1981). Bees in an electric field. *Apidologie*, **12**(1), 101-103.
- Hoyos, M.E. and Zhang, S. (2000). Calcium-independent activation of salicylic acid-induced protein kinase and a 40-kilodalton protein kinase by hyperosmotic stress. *Plant Physiol.* **122**, 1355-1363.
- Hrabak, E.M., Dickmann, L.J., Satterlee, J.S., and Sussman, M.R. (1996). Characterization of eight new members of the calmodulin-like domain protein kinase gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **31**, 405-412.
- Hua, J., Chang, C., Sun, Q. and Meyerowitz, E.M. (1995). Ethylene insensitivity conferred by *Arabidopsis* ERS gene. *Science* **269**, 1712-1714.
- Hua, J., Sakai, H., Nourizadeh, S., Chen, Q.G., Bleecker, A.B., Ecker, J.R. and Meyerowitz, E.M. (1998). EIN4 and ERS2 are members of the putative ethylene receptor gene family in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1321-1332.
- Huang, C.H., Tate, B.F., Crain, R.C., and Cote, G.G. (1995). Multiple phosphoinositide-specific phospholipases C in oat roots: Characterization and partial purification. *Plant J.* **8**, 257-267.
- Huang, F.Y., Philosoph-Hadas, S., Meir, S., Callahan, D.A., Sabato, R., Zelcer, A. and Hepler P.K. (1997). Increases in cytosolic Ca²⁺ in parsley mesophyll cells correlate with leaf senescence. *Plant Physiol.* **115**, 51-60.
- Huang, L., Berkelman, T., Franklin, A.E., and Hoffman, N.E. (1993). Characterization of a gene encoding a Ca²⁺-ATPase-like Protein in the plastid envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10066-10070.

I

- Ichimura, K. (1999). Molecular analysis of a MAP kinase cascade involved in environmental stress response in *Arabidopsis thaliana*. PhD Thesis, university of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan.
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Yuasa, T. and Shinozaki, K. (2000). Protein phosphorylation and dephosphorylation in environmental stress responses in plants. *Adv. Bot. Res.* **32**, 355-377.
- Imamura, A., Hanaki, N., Nakamura, A., Suzuki, T., Taniguchi, M., Kiba, T., Ueguchi, C., Sugiyama, T. and Mizuno, T. (1999). Compilation and characterization of *Arabidopsis thaliana* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. *Plant Cell Physiol.* **40**, 733-742.
- Ingram, J., and Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 377-403.

J

- Jaffe, L.F. (1981). The role of ionic currents in establishing developmental pattern. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B*. **295**, 553-566.
- Jaffe, L.F. (1995). Calcium waves and development. *CIBA Found. Symp.* **188**, 4-12.
- Jaffe, M.J. (1973) Thigmomorphogenesis: the response of plant growth and development to mechanical stimulation with special reference to *Bryonia dioica*. *Planta*, **114**, 143-157.
- Jenkins, G.I. (1998). Signal transduction networks and the integration of responses to environmental stimuli. *Adv. Bot. Res.* **29**, 55-75.
- Jiang, C.J., Weeds, A.G., and Hussey, P.J. (1997). The maize actin depolymerizing factor, ZmADF3, redistributes to the growing tip of elongating root hairs and can be induced to translocate into the nucleus with actin. *Plant J.* **12**, 1035-1043.
- Johannes, E., Brosnan, J.M., and Sanders, D. (1992). Calcium channels in the vacuolar membrane of plants: Multiple pathways for intracellular Ca²⁺ mobilization. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* **338**, 105-112.
- Johnson, C., Knight, M.R., Kondo, T., Masson, P., Sedbrook, J., Haley, A., and Trewavas, A.J. (1995). Circadian oscillations in cytosolic and chloroplast free calcium in transgenic luminous plants. *Science* **269**, 1863-1866.
- Johnson, K.D. and Chrispeels, M.J. (1992). Tonoplast-bound protein kinase phosphorylates tonoplast intrinsic protein. *Plant Physiol.* **100**, 1787-1795.
- Jonak, C., Kiergel, S., Ligterink, W., Barker, P.J., Huskisson, N.S., and Hirt, H. (1996). Stress signaling in plants : a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 11274-11279.
- Jones, D.L., Shaff, J.E., and Kochian, L.V. (1995). Role of calcium and other ions in directing root hair tip growth in *Limnobium stoloniferum*. Inhibition of tip growth by aluminium. *Planta* **197**, 672-680.
- Jouannic, S., Hamal, A., Leprince, A.S., Tregear, J.W., Kreis, M., and Henry, Y. (1999). Characterisation of novel plant genes encoding MEKK/STE11 and RAF-related protein kinases. *Gene* **229**, 171-181.

K

- Kakimoto, T. (1996). CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* **274**, 982-985.
- Kasai, N., and Muto, S. (1990). Ca²⁺ pump and Ca²⁺/H⁺ antiporter in plasma membrane vesicles isolated by aqueous two-phase partitioning from maize leaves. *J. Membr. Biol.* **114**, 133-142.
- Kavaliers, M. and Ossenkopp, K.P. (1986a). Magnetic fields differentially inhibit Mu, Delta, Kappa, and Sigma opiate-induced analgesia in mice. *Peptides* **7**, 449-453.
- Kavaliers, M. and Ossenkopp, K.P. (1986b). Stress-induced opioid analgesia and activity in mice, inhibitory influences of exposure to magnetic fields. *Psychopharmacol.* **89**, 440-443.
- Kermarrec, A. (1981). Sensitivity to artificial magnetic fields and avoiding reaction, *Insectes Sociaux* **28**, 40-46.
- Kholodov, Y.A. (1966). Effect of Electromagnetic and Magnetic Fields on the Central Nervous System, Nauka, Moscow.
- Kiegle, E., Moore, C.A., Haseloff, J., Tester, J. and Knight M.R. (2000). Cell-type-specific calcium responses to drought salt and cold in *Arabidopsis* roots. *Plant J.* **23**, 267-278.
- Kim, H.Y., Cote, G.G., and Crain, R.C. (1996). Inositol 1,4,5-trisphosphate may mediate closure of K⁺ channels by light and darkness in *Samanea saman* motor cells. *Planta* **198**, 279-287.

- Kirschvink, J.L. (1992). Magnetite (Fe₃O₄) biomineralization in human tissue: a solution to the thermal noise problem of the ELF bioeffects. 1st World Congress for Electricity and Magnetism in Biology and medicine Session, Lake Buena Vista, Florida.
- Kirschvink, J.L., Jones, D.S. and McFadden, B.J. (Eds) (1985). Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms. A new Biomagnetism. Plenum. New York.
- Klusener, B., Boheim, G., Liss, H., Engleberth, J., anti Weiler, E.W. (1995). Gadolinium-sensitive, voltage-dependent calcium release channels in the endoplasmic reticulum of a higher plant mechanoreceptor organ. *EMBO J.* **14**, 2708-2714.
- Klose, J. (1975). Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in animals. *Humangenetik* **26**, 231-243.
- Knight, H., Brand, S., and Knight, M.R. (1998). A history of stress alters drought calcium signalling pathways in *Arabidopsis*. *Plant J.* **16**, 681-687.
- Knight, M.R., Campbell, A.K., Smith, S.M., and Trewavas, A.J. (1991). Transgenic plant aequorin reports the effects of cold shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* **352**, 524-526.
- Knight, H., Knight, M. R. (2000). Imaging spatial and cellular characteristics of low temperature calcium signature after cold acclimation in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **51**, 1679-1686.
- Knight, H., Trewavas, A.J., and Knight, M.R. (1996). Cold calcium signalling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell* **8**, 489-503.
- Knight, H., Trewavas, A.J, and Knight, M.R. (1997). Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J.* **12**, 1067-1 078.
- Kopka, J., Pical, C., Gray, J.E., and Muller-Rober, B. (1998). Molecular and enzymatic characterization of three phosphoinositide-specific phospholipase C isoforms from potato. *Plant Physiol.* **116**, 239-250.
- Kosterich, J.D., Foster, K.R., Pollack, S.R. (1983). Dielectric permittivity and electrical conductivity of fluid saturated bone. *Trans. Biomedical Eng.* **30**, 81-86.
- Kosterich, J.D., Foster, K.R., Pollack, S.R. (1984). Dielectric properties of fluid-saturated bone - The effect of variation in conductivity of immersion fluid. *Trans. Biomedical Eng.* **31**, 369-371.
- Kreimer, G., Melkonian, M., and Latzko, E. (1985). An electrogenic uniport mediates light-dependent Ca²⁺ influx into intact spinach chloroplasts. *FEBS Lett.* **180**, 253-258.
- Krueger, W.F., Giarola, A.J., Bradley, J.W. and Shrekenhamer, A. (1975). Effects of electromagnetic fields on fecundity in the chicken. *Annals of New York Academy of Science*, **247**, 391.
- Kuchitsu, K., Kikuyama, M., and Shibuya, N. (1993). N-acetyl chito-oligosaccharides, biotic elicitors for phytoalexin production, induce transient membrane depolarization in suspension-cultured rice cells. *Protoplasma* **174**, 79-81.
- Kurtz, I. and Schrank, A.R. (1955). Bioelectrical properties of intact and regenerating earthworms *Eisenia foetida*. *Physiolog. Zoology* **28**, 322-330.

L

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lai, H., Carino, M.A. and Ushijima, I. (1998). Acute exposure to a 60 Hz magnetic field affects rats' water-maze performance. *Bioelectromag.* **19**, 117-122.
- Lai, H. and Singh, N.P. (1997). Acute exposure to a 60 Hz magnetic field increases DNA strand breaks in rat brain cells, *Bioelectromag.* **18**, 156-165.

- Lamb, C.J., and Dixon, R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 251-275.
- Lambé, P., Mutabel, H.S.N., Fouché, J.G., Deltour, R., Foidart, J.M. and Gaspar, T. (1997). DNA methylation as a key in regulation of organogenic totipotency and plant neoplastic progression? *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **33**, 155-162.
- Lancelle, S.A., and Hepler, P.K. (1992). Ultrastructure of freeze-substituted pollen tubes of *Lilium longiflorum*. *Protoplasma* **167**, 215-230.
- Langman, L. and Burr, H.S. (1949). A technique to aid in the detection of malignancy of the female genital tract. *US J. Obst. Gynec.* **57**(2), 274-280.
- Larter, R. and Ortoleva, P. (1981). A theoretical basis for selfelectrophoresis. *J. Theor. Biol.* **88**, 599-630.
- Lashbrook, C.C., Tieman, D.M. and Klee, H.J. (1998). Differential regulation of the tomato ETR gene family throughout plant development. *Plant J.* **15**, 243-252.
- Lebrun-Garcia, A., Ouaked, F., Chiltz, A. and Pugin, A. (1998). Activation of MAPK homologues by elicitor in tobacco cells. *Plant J.* **15**, 773-781.
- Lechleiter, J.D., John, L.M., and Camacho, P. (1998). Ca²⁺ wave dispersion and spiral wave entrainment in *Xenopus laevis* oocytes overexpressing Ca²⁺ ATPases. *Biophys. Chem.* **72**, 123-129.
- Leckie, C.P., McAinsh, M.R., Allen, G.J., Sanders, D., and Hetherington, A.M. (1998). Abscisic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 15837-15842.
- Lee, F.S., Hagler, J., Chen, Z.J., and Maniatis, T. (1997a). Activation of the I κ B alpha kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. *Cell* **88**, 213-222.
- Lee, J.W., Zhang, Y.X., Weaver, C.D., Shomer, N.H., Louis, C.F., and Roberts, D.M. (1995). Phosphorylation of nodulin-26 on serine-262 affects its voltage-sensitive channel activity in planar lipid bilayers. *J. Biol. Chem.* **270**, 27051-27057.
- Lee, J.Y., Yoo, B.C., and Harmon, A.C. (1998). Kinetic and calcium-binding properties of three calcium-dependent protein kinase isoenzymes from soybean. *Biochem.* **37**, 6801-6809.
- Lee, S.M., Suh, S., Kim, S., Crain, R.C., Kwak, J.M., Nam, H.G., and Lee, Y.S. (1997b). Systemic elevation of phosphatidic acid and lysophospholipid levels in wounded plants. *Plant J.* **12**, 547-556.
- Lefèvre, J., Boyer, N., Gaspar, T. and Desbiez, M.O. (1993) Change of peroxidase activity related to storage of information and immediate or delayed expression of the effect of cotyledon prickings on hypocotyl growth in tomato. In *Plant peroxidases: biochemistry and physiology* (Welinder, K.G., Rasmussen, S.K., Penel, C. and Greppin, H., eds). Genève: Université, pp. 345-348.
- Lerbs, S., Lerbs, W., Klyachko, N.L., Romanko, E.G., Kulaeva, ON., Wollgiehn, R. and Parthier, B. (1984). Gene expression in cytokinin- and light-mediated plastogenesis of *Cucurbita* cotyledons: ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Planta* **162**, 289-298.
- Le Sceller, L., Ripoll, C., Demarty, M., Cabin-Flamand, A., Nystrom, T., Saier Jnr, M. and Norris, V. (2000) Modelling bacterial hyperstructures with cellular automata. *Interjournal of Complex Systems*: 366.
- Levchenko, A., Bruck, J. and Sternberg, P.W. (2000). Scaffold proteins may biphasically affect the levels of mitogen-activated protein kinase signalling and reduce its threshold properties. *PNAS* **97**, 5818-5823.
- Levine, R.L., Dooley, J.K., and Bluni, T.D. (1995). Magnetic field effects on spatial discrimination and melatonin levels in mice, *Physiology & Behavior* **58**, 535-537.
- Lewis, B.D. and Spalding, E.P. (1998). Nonselective block by La³⁺ of *Arabidopsis* ion channels involved in signal transduction. *J. Membr. Biol.* **162**, 81-91.

- Li, J., Lee, Y.R., and Assmann, S.M. (1998a). Guard cells possess a calcium-dependent protein kinase that phosphorylates the KAT1 potassium channel. *Plant Physiol.* **116**, 785-795.
- Li, W.H., Llopis, J., Whitney, M., Zlokarnik, G., and Tsien, R.Y. (1998b). Cell-permeant caged InsP₃ ester shows that Ca²⁺ spike frequency can optimise gene expression. *Nature* **392**, 936-941.
- Liang, F., Cunningham, K.W., Harper, J.F., and Sze, H. (1997). ECA1 complements yeast mutants defective in Ca²⁺ pumps and encodes an endoplasmic reticulum-type Ca²⁺-ATPase in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8579-8584.
- Liburdy, R.P. (1986). Microwave associated protein shedding in human erythrocyte: quantitative HPLC analysis, 8th Annual Meet. of Bioelectromag. Soc., (Abstr.), Madison, USA.
- Liburdy, R.P. (1999). Calcium and EMFs: graphing the data. *Science* **285**, 337.
- Liburdy, R.P. (2000). Calcium signaling in lymphocytes and ELF fields: evidence for an electric field metric and a site of interaction involving the calcium ion channel. *FEBS Lett.* **478**, 304.
- Liburdy, R.P., Callahan, D.E., Harland, J., Dunham, E., Sloma, T.R. and Yaswen, P. (1993). Experimental evidence for 60 Hz magnetic fields operating through the signal transduction cascade. Effects on calcium influx and c-MYC mRNA induction. *FEBS Lett.* **334**, 301-308.
- Liburdy, R.P. and Penn, A. (1984). Microwave bioeffects in the erythrocyte are temperature and pO dependent: cation permeability and protein shedding occur at the membrane phase transition. *Bioelectromag.* **5**, 283.
- Liboff, A.R., Williams Jr., T., Strong, D.M. and Wistar Jr., R. (1982). Alternating magnetic fields enhance DNA synthesis in fibroblastic cells, in Bioelectrical Repair and Growth Society (BRAGS). (1981). Transactions of the First Annual Meeting, Vol. **2**.
- Ligterink, W. (2000). MAP kinases in plant signal transduction : how many, and what for? *Results Probl. Cell Differ.* **27**, 11-27.
- Lighterink, W., Kroj, T., Nieden, U., Hirt, H. And Scheel, D. (1997). Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogene defense of plants. *Science* **276**, 2504-2507.
- Lin, L.L., Wartmann, M., Lin, A.Y., Knopf, J.L., Seth, A., and Davis, R.J. (1993). cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* **72**, 269-278.
- Lindzen, E., and Choi, J.H. (1995). A carrot cDNA encoding an atypical protein kinase homologous to plant calcium-dependent protein kinases. *Plant Mol. Biol.* **28**, 785-797.
- Lino, B, Baizabal-Aguirre, V.M., and Gonzalez de la Vara, L.E. (1998). The plasma-membrane H⁺-ATPase from beet root is inhibited by a calcium-dependent phosphorylation. *Planta* **204**, 352-359.
- Lisman, J.E. (1985) A mechanism for memory storage insensitive to molecular turnover : a bistable autophosphorylating kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 3055-3057.
- Liu, J., and Zhu, J.K. (1997). An *Arabidopsis* mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 14960-14964.
- Liu, J., and Zhu, J.K. (1998). A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science* **280**, 1943-1945.
- Lohmann, K.J., Willows, A.O.D. and Pinter, R.B. (1991). An identifiable molluscan neuron responds to changes in earth-strength magnetic fields. *J. Exp. Biol.* **161**, 1-24.
- Loscher, W. and Liburdy, R.P. (1998). Animal and cellular studies on carcinogenic effects of low frequency (50/60-Hz) magnetic fields. *Mutat. Res.* **410**, 185-220.
- Love, J., Brownlee, C., and Trewavas, A.J. (1997) Ca²⁺ and calmodulin dynamics during photopolarization in *Fucus serratus* zygotes. *Plant Physiol.* **115**, 249-261.
- Luan, S., Li, W., Rusnak, F., Assman, S.M., and Schreiber, S.L. (1993). Immunosuppressants implicate protein-phosphatase regulation of K⁺ channels in guard cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2202-2206.

Luit, A. van der, Olivari, C., Haley, A., Knight, M.R. and Trwavas, A.J. (1999). Distinct calcium signalling pathways regulate calmodulin gene expression in tobacco. *Plant Physiol.* **121**, 705-714.

M

MacRobbie, E.A.C. (1997). Signalling in guard cells and regulation of ion channel activity. *J. Exp. Bot.* **48**, 515-528.

Maeda, T., Takehara, M., and Saito, H. (1995). Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or binding of an SH₃-containing osmosensor. *Science* **269**, 554-558.

Malhó, R., and Trewavas, A.J. (1996). Localized apical increases of cytosolic free calcium control pollen tube orientation. *Plant Cell* **8**, 1935-1949.

Malhó, R., Read, N.D., Pais, M.S., and Trewavas, A.J. (1994). Role of cytoplasmic free calcium in the reorientation of pollen tube growth. *Plant J.* **5**, 331-341.

Malhó, R., Read, N.D., Trewavas, A.J., and Pais, M.S. (1995). Calcium channel activity during pollen tube growth and reorientation. *Plant Cell* **7**, 1173-1184.

Malhó, R., Moutinho, A., van der Lui, A., and Trewavas, A.J. (1998). Spatial characteristics of calcium signaling: The calcium wave as a basic unit in plant cell calcium signalling. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* **353**, 1463-1473.

Malmstrom, S., Askeflund, P., and Palmgren, M.G. (1997). A calmodulin-stimulated Ca²⁺-ATPase from plant vacuolar membranes with a putative regulatory domain at its N-terminus. *FEBS Lett.* **400**, 324-328.

Mancuso, S. (1999). Hydraulic and electrical transmission of wound-induced signals in *Vitis vinifera*. *Aust. J. Plant. Physiol.* **26**, 55-61.

Manning G. S., Ray J. (1998) Counterion condensation revisited. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **16**: 461-476.

Marty, F. (1999). Plant vacuoles. *Plant Cell* **11**, 587-599.

Mazars, C., Thion, L., Thuleau, P., Graziana, A., Knight, M.R., Moreau, M. and Ranjeva, R. (1997). Organization of cytoskeleton controls the changes in cytosolic calcium of cold-shocked *Nicotiana plumbaginifolia* protoplasts. *Cell Calcium* **22**, 413-420.

McAinsh, M.R., and Hetherington, A.M. (1998). Encoding specificity in Ca²⁺ signalling systems. *Trends Plant Sci.* **3**, 32-36.

McAinsh, M.R., Brownlee, C., and Hetherington, A.M. (1990). Abscisic acid-induced elevation of guard cell cytosolic Ca²⁺ precedes stomatal closure. *Nature* **343**, 186-188.

McAinsh, M.R., Webb, A.A.R., Taylor, J.E., and Hetherington, A.M. (1995). Stimulus-induced oscillations in guard cell cytoplasmic free calcium. *Plant Cell* **7**, 1207-1219.

McAinsh, M.R., Brownlee, C., and Hetherington, A.M. (1997). Calcium ions as second messengers in guard cell signal transduction. *Physiol. Plant.* **100**, 16-29.

McBride, E.L. and Comer, A.E. (1975). The effect of magnetic fluctuation on bean rhythms, *Chronobiologia* supplement **1**, 44-45.

McCaig, C.D. and Zhao, M. (1997). Physiological electric fields modify cell behaviour, *BioEssays* **19**, 819-826.

McCleary, V.L., Akers, T.K. and Aasen, G.H. (1991). Low magnetic field effects on embryonic bone growth. *Biomed. Sci. Inst.* **27**, 205-217.

McLauchlan, K.A. and Steiner, U.E. (1991). The spin-correlated radical pair has a reaction intermediate. *Molec. Phys.* **241**, 73.

McMichael, R.W., Jr, Bachmann, M. and Huber, S.C. (1995). Spinach leaf sucrose-phosphate synthase and nitrate reductase are phosphorylated/inactivated by multiple protein kinases in vitro. *Plant Physiol.* **108**, 1077-1082.

- McPhalen, C.A., Strynadka, N.C., and James, M.N.G. (1991). Calcium-binding sites in proteins: A structural perspective. *Adv. Prot. Chem.* **42**, 77-144.
- Meshi, T., Moda, I., Minami, M., Okanami, M., and Iwabuchi, M. (1998). Conserved Ser residues in the basic region of the bZIP-type transcription factor HBP-1a(17): Importance in DNA binding and possible targets for phosphorylation. *Plant Mol. Biol.* **36**, 125-136.
- Meskiene, I., Ligterink, W., Bögre, L., Jonak, K., Kiergel, K., Balog, L., Eklöf, S., Ammerer, G., and Hirt, H. (1998). The SAM kinase pathway : an integrated circuit for stress signaling in plants. *J. Plant Res.* **111**, 339-344.
- Meskiene, I. and Hirt, H. (2000). MAP kinase pathways: molecular plug-and-play chips for the cell. *Plant Mol. Biol.* **42**, 791-806.
- Messerli, M. and Robinson, K.R. (1997). Tip localized Ca^{2+} pulses are coincident with peak pulsatile growth rates in pollen tubes of *Lilium longiflorum*. *J. Cell Sci.* **110**, 1269-1278.
- Messerli, M., Danuser, G. and Robinson, K.R. (1999). Pulsatile influxes of H^+ , K^+ and Ca^{2+} lag growth pulses of *lilium longiflorum* pollen tubes. *J. Cell Sci.* **112**, 1497-1509.
- Messiaen, J., Read, N.D., Van Cutsen P. and Trewavas, A.J. (1993). Cell wall oligogalacturonides increase cytosolic free calcium in carrot protoplasts. *J. Cell Sci.* **104**, 365-371.
- Meyer, P. (1999). The role of chromatin remodelling in transgene silencing and plant development. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **35**, 29-36.
- Micheau, J. and Riedel, G. (1999). Protein kinases: which one is the memory molecule? *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 534-548.
- Mikołajczyk, M., Awotunde, O.S., Muszyńska, G., Klessig, D.F. and Dobrowolska G. (2000). Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. *Plant Cell* **12**, 165-178.
- Miller, A.J., and Sanders, D. (1987). Depletion of cytosolic free calcium induced by photosynthesis. *Nature* **326**, 397-400.
- Miller, A.J., Vogg, G., and Sanders, D. (1990). Cytosolic calcium homeostasis in fungi: Roles of plasma membrane transport and intracellular sequestration of calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 9348-9352.
- Miller, D Callaham, D.A., Gross, D.J., and Hepler, P.K. (1992). Free Ca^{2+} gradient in growing pollen tubes of *Lilium*. *J. Cell Sci.* **101**, 7-12.
- Miller, D., Lancelle, S.A., and Hepler, P.K. (1996). Actin microfilaments do not form a dense meshwork in *Lilium longiflorum* pollen tube tips. *Protoplasma* **195**, 123-132.
- Miyata, S., Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1998). Characterization of genes for two-component phosphorelay mediators with a single HPt domain in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **437**, 11-14.
- Miyawaki, A., Griesbeck, O., Heim, R. and Tsien, R.Y. (1999). Dynamic and quantitative Ca^{2+} measurements using improved cameleons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 2135-2140.
- Mizoguchi, T., Irie, K., Hirayama, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Matsumoto, K., and Shinozaki, K. (1996). A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 765-769.
- Mizuno, T. (1998). His-Asp phosphotransfer signal transduction. *J. Biochem. Tokyo* **123**, 555-563.
- Mogami, H., Tepikin, A.V., and Patersen, O.H. (1998). Termination of cytosolic Ca^{2+} signals: Ca^{2+} reuptake into intracellular stores is regulated by the free Ca^{2+} concentration in the store lumen. *EMBO J.* **17**, 435-442.
- Monroy, A.F., Sarhan, F., and Dhindsa, R.S. (1993). Cold-induced changes in freezing tolerance, protein phosphorylation, and gene expression-evidence for a role of calcium. *Plant Physiol.* **102**, 1227-1235.

- Monroy, A.F., Sangwan, V., and Dhinsa, R.S. (1998). Low temperature signal transduction during cold acclimation : protein phosphatase 2A as an early target for cold-inactivation. *Plant J.* **13**, 653-660.
- Moritz, R.L., Eddes, J.S., Reid, G.E. and Simpson, R.J. (1996). S-pyridylethylation of intact polyacrylamide gels and in situ digestion of electrophoretically separated proteins: a rapid mass spectrometry method for identifying cysteine-containing peptides. *Electrophoresis* **17**, 907-917.
- Morris, P.C., Guerrier, D., Leung, J., and Giraudat, J. (1997). Cloning and characterisation of MEK1, an *Arabidopsis* gene encoding a homologue of MAP kinase kinase. *Plant Mol. Biol.* **35**, 1057-1064.
- Moses, G.C. and Martin, A.H. (1993). Effect of magnetic fields on membrane associated enzymes in chicken embryos. *Biochem. Mol. Biol. Intern.* **29**, 757-762.
- Moyen, C., Hammond-Kosack, K.E., Jones, J., Knight, M.R, anti Johannes, E. (1998). Systemin triggers an increase of cytoplasmic calcium in tomato mesophyll cells: Ca²⁺ mobilization from intra- and extracellular compartments. *Plant Cell Environ.* **21**, 1101-1111.
- Muir, S.R., and Sanders, D. (1996). Pharmacology of Ca²⁺ release from red beet microsomes suggests the presence of ryanodine receptor homologs in higher plants. *FEBS Lett.* **395**, 39-42.
- Muir, S.R., and Sanders, D. (1997). Inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ release across non-vacuolar membranes in cauliflower. *Plant Physiol.* **114**, 1511-1521.
- Munnik, T., Ligterink, W., Meskiene, I., Calderini, O., Beyerly, J., Musgrave, A., and Hirt, H. (1999). Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress. *Plant J.* **20**, 381-388.

N

- Nagai, M. and Ota, M. (1994). Pulsating electromagnetic field stimulates mRNA expression of bone morphogenetic protein-2 and -4, *J. Dental Res.* **73**, 1601-1605.
- Neuhaus, G., Bowler, C., Hiratsuka, K., Yamagata, H., and Chua, N.H. (1997). Phytochrome-regulated repression of gene expression requires calcium and cGMP. *EMBO J.* **16**, 2554-2564.
- Norris V., Alexandre S., Bouligand Y., Celler D., Demarty M., Grehan G., Gouesbet G., Guespin J., Insinna E., Le Sceller L., Maheu B., Monnier C., Grant N., Onoda T., Orange N., Oshima A., Picton L., Polaert H., Ripoll C., Thellier M., Valleton J-M., Verdus M-C., Vincent J-C., White G., Wiggins P. (1999) Hypothesis: Hyperstructures regulate bacterial structure and cell cycle. *Biochimie* **81**, 915-920.
- Novikova, G.V., Moshkov, I.E., Smith, A.R. and Hall, M.A. (2000). The effect of ethylene on MAPKinase-like activity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **474**, 29-32.
- Nuccitelli, R., ed., Ionic currents in development, Alan R. Liss, NY, 1986.

O

- Oakely, B.R., Kirsh, D.R. and Morris, N.R. (1980). A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **105**, 361-363.
- O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021.
- Órvar, B.L., Sangwan, V., Omann, F. and Dhinsa, R.S. (2000). Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J.* **23**, 785-794.

P

- Paccalet, T. (2000). Production d'un lin transgénique exprimant le gène de l'æquorine : Un outil pour l'étude de la dynamique du calcium chez des plantules de lin. DEA de l'Université de Rouen, Discipline Biologie Cellulaire.
- Patil, S, Takezawa, D., and Poovaiah, B.W. (1995). Chimeric plant calcium/calmodulin-dependent protein-kinase gene with a neural visinin-like calcium-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4897-4901.
- Parkinson, J.S. and Kofoid, E.C. (1992). Communication modules in bacterial signalling proteins. *Annu. Rev. Genet.* **26**, 71-112.
- Patel, N.B., Xie, Z.P., Young, S.H. and Poo, M.M. (1985). Response of nerve growth cone to focal electric currents, *J. Neurosci. Res.* **13**, 245-256.
- Payne, D.M., Rossomando, A.J., Martino, P., Erickson, A.K., Her, J.H., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Weber, M.J., and Sturgill, T.W. (1991). Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J.* **10**, 885-892.
- Payton, S., Fray, R.G., Brown, S. and Grierson, D. (1996). Ethylene receptor expression is regulated during fruit ripening, flower senescence and abscission. *Plant Mol. Biol.* **31**, 1227-1231.
- Pei, Z.M., Ward, J.M., Harper, J.F, and Schroeder, J.I. (1996). A novel chloride channel in *Vicia faba* guard cell vacuoles activated by the serine/threonine kinase, CDPK. *EMBO J.* **15**, 6564-6574.
- Pei, Z.M., Baizabal-Aguirre, V.M., Allen, G.J. and Schröder, J.I. (1998). A transient outward-rectifying K⁺ channel current down-regulated by cytosolic Ca²⁺ in *Arabidopsis thaliana* guard cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6548-6553.
- Penniston, J.T., and Enyedi, A. (1998). Modulation of the plasma membrane Ca²⁺ pump. *J. Membr. Biol.* **165**, 101-109.
- Persinger, M.A. (1974a). Behavioral, Physiological, and histological changes in rats exposed during various developmental stages to ELF magnetic fields, in Persinger, M.A., ed., ELF and VLF Electromagnetic field effects, Plenum Press, New York, 1974
- Phillips, J.B. and Borland, C. (1992). Behavioural evidence for use of a light-dependent magnetoreception mechanism by a vertebrate. *Nature* **359**, 142-144.
- Pilla, A.A., Sechaud, P. and McLeod, B.R. (1983). Electrochemical and electrical aspects of low-frequency electromagnetic current induction in biological systems. *J. Biol. Phy.* **11**, 51-58.
- Pineros, M., and Tester, M. (1995). Characterization of a voltage dependent Ca²⁺-selective channel from wheat roots. *Planta* **195**, 478-488.
- Pineros, M., and Tester, M. (1997). Calcium channels in plant cells: Selectivity, regulation and pharmacology. *J. Exp. Bot.* **48**, 551-557.
- Ping, Z., Yabe, I., and Muto, S. (1992). Voltage-dependent Ca²⁺ channels in the plasma membrane and vacuolar membrane of *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta* **1112**, 287-290.
- Plieth, C. (1999). Temperature sensing by plants: calcium-permeable channels as primary sensors – a model. *J. Membr. Biol.* **172**, 121-127.
- Plieth, C. (2001). Plant calcium signalling and monitoring: pros and cons and recent experimental approaches. *Protoplasma* **218**, 1-23.
- Polisensky, D.H. and Braam, J. (1996). Cold shock regulation of *Arabidopsis* TCH genes and the effects of modulating intracellular calcium levels. *Plant Physiol.* **111**, 1271-1279.
- Pottosin, I.I., Tikhonova, L.I., Hedrich, R., and Schonknecht, G. (1997). Slowly activating vacuolar channels cannot mediate Ca²⁺ induced Ca²⁺ release. *Plant J.* **12**, 1387-1398.
- Price, A.H., Taylor, A., Ripley, S.J., Griffiths, A., Trewavas, A.J., and Knight, M.R. (1994). Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell* **6**, 1301-1310.
- Pu, R., and Robinson, K.R. (1998). Cytoplasmic calcium gradients and calmodulin in the early development of the fucoid alga *Pelvetia compressa*. *J. Cell Sci.* **111**, 3197-3207.

- Putnam-Evans, C., Harmon, A.C., Palevitz, B.A., Fecheimer, M. and Cormier, M.J. (1989). Calcium-dependent protein kinase is localized with F-actin in plant cell. *Cell Motil. Cytoskel.* **12**, 12-22.
- Putnam-Evans, C.L., Harmon, A.C. and Cormier, M.J. (1986). Calcium-dependent protein phosphorylation in suspension-cultured soybean cells. *Biochem.* **29**, 2488-2495.

R

- Rabilloud, T. (1996). Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. *Electrophoresis* **17**, 813-829.
- Rai, K.S. (1986). Use of the mosquito *Aedes aegypti* as an experimental model to study electropollution, in Dutta, S.K., and Millis, R.M., Biological Effects of Electropollution, Information Ventures, Philadelphia, 1986.
- Ramahaleo, T., Alexandre, J. and Lassales, J.P. (1996). Stretch-activated channels in plant cells. A new model of osmoelastic coupling. *Plant Physiol. Biochem.* **34**, 327-334.
- Rathore, K.S., Cork, R.J., and Robinson, K.R. (1991). A cytoplasmic gradient of Ca²⁺ is correlated with the growth of lily pollen tubes. *Dev. Biol.* **148**, 612-619.
- Ravitz, L.J. (1959). Application of the Electrodynamics Field Theory in Biology, Psychiatry, Medicine, and Hypnosis, *US J. Clinical Hypnosis* **1**, 135-150.
- Ravitz, L.J. (1962). History, measurement, and applicability of periodic changes in the electromagnetic field in health and disease. *Annals of NY Academy of Sciences*, **98**, 1144-1201.
- Read, N.D., Shacklock, P.S., Knight, M.R., and Trewavas, A.J. (1993). Imaging calcium dynamics in living plant cells and tissues. *Cell Biol. Int. Rep.* **17**, 111-125.
- Ripoll C. (2002) Counter-ions condensation as an integrating process in living cells. « Modélisation et simulation de processus biologiques dans le contexte de la génomique », Autrans, (conférencier invité).
- Roberts, D.M., and Harmon, A.C. (1992). Calcium-modulated proteins: Targets of intracellular calcium signals in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 375-414.
- Roberts, K. (1994). The plant extracellular matrix: in a new expansive mod. *Curr. Opinions Cell Biol.* **6**, 688-694.
- Roberts, S., Brownlee, C. (1995). Calcium influx fertilization potential and egg activation in *Fucus serratus*. *Zygote* **3**, 191-197.
- Robertson, B. and Astumian, R.D. (1990). Kinetics of a multistate enzyme in a large oscillating field. *Biophys. J.* **57**, 689-696.
- Robinson, K.R. (1985). The responses of cells to electrical fields, a review. *J. Cell Biol.* **101**, 2023-2027.
- Robinson, M.J., and Cobb, M.H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 180-186.
- Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D.F., Hirt, H. And Jones, J.D.G. (1999). Rapid Avr 9- and Cf9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* **11**, 273-288.
- Ross, S.M. (1990). Combined DC and ELF magnetic fields can alter cell proliferation. *Bioelectromag.* **11**, 27-36.
- Rossomando, A.J., Dent, P., Sturgill, T.W., and Marshak, D.R. (1994). Mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MKK1) is negatively regulated by threonine phosphorylation. *Mol. Cell Biol.* **14**, 1594-1602.

- Rudolph, H.K., Antebi, A., Fink, G.R., Buckley, C.M., Dorman, T.E., LeVitre, J., Davidow, L.S., Mao, J.I., and Moir, D.T. (1989). The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in PMR1, a member of a Ca²⁺ATPase family. *Cell* **58**, 133-145.
- Ryan, C.A. (1990). Proteinase inhibitors in plants : genes improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **28**, 425-449.

S

- Sabbah, S., Raise, M. and Tal, M. (1995). Methylation of DNA in NaCl-adapted cells of potato. *Plant Cell Reports* **4**, 467-470.
- Sakai, H., Hua, J., Chen, Q.G., Medrano, L.J., Bleecker, A.B. and Meyerowitz, E.M. (1998). ETR2 is an ETRI-like gene involved in ethylene signalling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5812-5817.
- Sakakibara, H., Taniguchi, M. and Sugiyama, T. (2000). His-Asp phosphorelay signalling: a communication avenue between plants and their environment. *Plant Mol. Biol.* **42**, 273-278.
- Sanders, D., Brownlee, C. and Harper, J.F. (1999). Communicating with calcium. *Plant Cell* **11**, 691-706.
- Sano, H., Seo, S., Orudjev, E., Youssefian, S., Ishizuka, K., and Ohashi, Y. (1994). Expression of gene for a small GTP binding protein in transgenic tobacco elevates endogenous cytokinin levels abnormally induces salicylic acid in response to wounding, and increases resistance to tobacco mosaic virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10556-10560.
- Sano, H., Seo, S., Koizumi, N., Niki, T., Iwamura, H., and Ohashi, Y. (1996). Regulation by cytokinins of endogenous levels of jasmonic and salicylic acids in mechanically wounded tobacco plants. *Plant Cell Physiol.* **37**, 762-769.
- Santella, L., and Carafoli, E. (1997). Calcium signalling in the cell nucleus. *FSEB J.* **11**, 1091-1109.
- Satoh, K., and Murata, N. (eds) (1998). 'Stress Responses of Photosynthetic Organisms, Molecular Mechanisms and Molecular Regulations.' Elsevier Science, Amsterdam.
- Satterlee, J.S., and Sussman, M.R. (1998). Unusual membrane associated protein kinases in higher plants. *J. Membr. Biol.* **164**, 205-213.
- Schachtman, D.P., Kumar, R., Schroeder, J.I., and Marsh, E.L. (1997). Molecular and functional characterization of a novel low-affinity cation transporter (LCT1) in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11079-11084.
- Scaiano, J.C. (1995). Exploratory laser flash photolysis study of free radical reactions and magnetic field effects in melatonin chemistry. *J. Pineal Res.* **19**, 189-195.
- Schaller, G.E. and Sussman M.R. (1988). Phosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase of oat roots by a calcium-stimulated protein kinase. *Planta* **173**, 509-518.
- Schmidt, C., Schelle, T., Liao, Y.J., and Schroeder, J.I. (1995). Strong regulation of slow anion channels and abscisic acid signalling in guard cells by phosphorylation and dephosphorylation events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9535-9539.
- Schmülling, T., Schafer, S. and Ramanov, G. (1997). Cytokinins as regulators of gene expression. *Physiol. Plant.* **100**, 505-519.
- Schonknecht, G., Bauer, C.S., and Simonis, W. (1998). Light dependent signal transduction and transient changes in cytosolic Ca²⁺ in a unicellular green alga. *J. Exp. Bot.* **49**, 1-11.
- Schroeder, J.I., and Hagiwara, S. (1990). Repetitive increases in cytosolic Ca²⁺ of guard cells by abscisic acid activation of non selective Ca²⁺ permeable channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9305-9309.
- Schroeder, J.I., and Keller, B.U. (1992). Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5025-5029.

- Schultz-Lessdorf, B., and Hedrich, R. (1995). Protons and calcium modulate SV-type channels in the vacuolar-lysosomal compartment-channel interaction with calmodulin inhibitors. *Planta* **197**, 655-671.
- Schumaker, K.S., and Sze, H. (1986). Calcium transport into the vacuole of oat roots. Characterization of $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchange activity. *J. Biol. Chem.* **261**, 12172-12178.
- Schumaker, K.S., and Sze, H. (1987). Inositol 1,4,5-trisphosphate releases Ca^{2+} from vacuolar membrane vesicles of oat roots. *J. Biol. Chem.* **262**, 3944-3946.
- Schwan, H.P. (1985). Dielectric properties of cells and tissues, in Interactions between Electromagnetic Fields and Cells. Chiabrera, A., Nicolini, C. and Schwan, H.P., Eds., Plenum Press, N.Y., 75-98.
- Seger, R., Ahn, N.G., Posada, J., Munar, E.S., Jensen, A.M., Cooper, J.A., Cobb, M.H., and Krebs, E.G. (1992). Purification and characterisation of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. *J. Biol. Chem.* **267**, 14373-14381.
- Seo, S., Okamoto, M., Seto, H., Ishizuka, K., Sano, H., and Ohashi, Y. (1995). Tobacco MAP kinase : a possible mediator in wound signal transduction pathways. *Science* **270**, 1988-1992.
- Seo, S., Sano, H., and Ohashi, Y. (1997). Jasmonic acid in wound signal transduction pathways. *Physiol. Plant.* **101**, 740-745.
- Seo, S., Sano, H., and Ohashi, Y. (1999). Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* **11**, 289-298.
- Shacklock, P.S., Read, N.D., and Trewavas, A.J. (1992). Cytosolic free calcium mediates red light induced photomorphogenesis. *Nature* **358**, 153-155.
- Shaw, S.L., and Quatrano, R.S. (1996). The role of targeted secretion in the establishment of cell polarity and the orientation of the division plane in *Fucus zygotes*. *Development* **122**, 2623-2630.
- Sheen, J. (1996). Ca^{2+} -dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science* **274**, 1900-1902.
- Sheppard, A.R., and Eisenbud, M., Biological Effects of Electric and Magnetic Fields of Extremely Low Frequency, New York University Press, NY, 1977.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. And Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of protein silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **68**, 850-858.
- Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (1996). Molecular responses to drought and cold stress. *Cur. Op. Plant Biol.* **7**, 161-167.
- Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997). Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* **115**, 327-334.
- Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K., Mizoguchi, T., Urao, T., Katagiri, T., Nakashima, K., Abe, H., Ichimura, K., Liu, Q., Nanjyo, T., Uno, Y., Iuchi, S., Seki, M., Ito, T., Hirayama, T., and Mikami, K. (1998). Molecular responses to water stress in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.* **111**, 345-351.
- Smialowicz, R.J. (1987). Immunologic effects of nonionizing electromagnetic radiation, *IEEE Engineering and Medical Biology* **6**, 47-51.
- Smith, S.D. (1979). Bioelectrical Control of Growth. A retrospective look, in Becker, 1979.
- Soni, R., Carmichael, J.P., Shah, Z.H. and Murray, J.A.H. (1995). A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved *retinoblas toma* protein interaction motif. *Plant Cell* **7**, 85-103.
- Spalding, E.P., and Cosgrove, D.J. (1989). Large plasma-membrane depolarization precedes rapid blue-light-induced growth inhibition in cucumber. *Planta* **178**, 407-410.
- Srivastava, A., Pines, M., and Jacoby, B. (1989). Enhanced potassium uptake and phosphatidylinositol-phosphate turnover by hypertonic mannitol shock. *Physiol. Plant.* **77**, 320-325.

- Stankovic, B., Zawadzki, T. and Davies, E. (1997). Characterisation of variation potential in sunflower. *Plant Physiol.* **115**, 1083-1088.
- Staxen, I., Montgomery, L., Hetherington, A.M., and McAinsh, M.R. (1996). Do oscillations in cytoplasmic free calcium encode the ABA signal in stomatal guard cells? *Plant Physiol.* **111**, 151.
- Staxen, R., Pical, C., Montgomery, L.T., Gray, J.E., Hetherington, A.M., and McAinsh, M.R. (1999). Abscisic acid induces oscillations in guard-cell cytosolic free calcium that involve phosphoinositide-specific phospholipase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1779-1784.
- Steiner, U.E. and Ulrich, T. (1989). Magnetic Effects in chemical kinetics, and related phenomena. *Chem. Rev.* **51**, 89.
- Stokes, D.L. (1997). Keeping calcium in its place: Ca²⁺-ATPase and phospholamban. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 550-556.
- Stratmann, J.W. and Ryan, C.A. (1997). Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11085-11089.
- Stuchly, M.A. and Stuchly, S.S. (1985). A six-octave experimental system for in-vivo and in-vitro dielectric measurements, in Interactions between Electromagnetic Fields and Cells. Chiabrera, A., Nicolini, C. and Schwan, H.P., Eds., Plenum Press, N.Y., 117-130.
- Subbaiah, C.C., Bush, D.S., and Sachs, M.M. (1994). Elevation of cytosolic calcium precedes anoxic gene expression in maize suspension cultured cells. *Plant Cell* **6**, 1747-1762.
- Suen, K.L. and Choi, J.H. (1991). Isolation and sequence analysis of a cDNA clone for a carrot calcium protein kinase: Homology to calcium/calmodulin-dependent protein kinases and to calmodulin. *Plant Mol. Biol.* **17**, 581-590.
- Sugiharto, B., Burnell, J.N. and Sugiyama, T. (1992). Cytokinin is required to induce the nitrogen-dependent accumulation of mRNAs for phosphoenolpyruvate carboxylase and carbonic anhydrase in detached maize leaves. *Plant Physiol.* **100**, 153-156.
- Suzuki, K. and Shinshi, H. (1995). Transient activation and tyrosine phosphorylation of a protein kinase in tobacco cells treated with fungal elicitor. *Plant Cell* **7**, 639-647.
- Suzuki, T., Imamura, A., Ueguchi, C. and Mizuno, T. (1998). Histidine-containing phosphotransfer (HPT) signal transducers implicated in His-to-Asp phosphorelay in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **39**, 1258-1268.
- Szczegielniak, J., Liwosz, A., Jurkowski, I., Loog, M., Dobrowolska, G., Ek, P., Harmon, A.C. and Muszynska, G. (2000). Calcium-dependent protein kinase from maize seedlings activated by phospholipids. *Eur. J. Biochem.* **12**, 3818-3827.

T

- Takahashi, K., Isobe, M., Knight, M.R., Trewavas, A.J., and Muto, S. (1997a). Hypo-osmotic shock induces increases in cytosolic Ca²⁺ in tobacco suspension culture cells. *Plant Physiol.* **113**, 587-594.
- Takahashi, K., Isobe, M., and Muto, S. (1997b). An increase in cytosolic calcium ion concentration precedes hypoosmotic shock-induced activation of protein kinases in tobacco suspension culture cells. *FEBS Lett.* **401**, 202-206.
- Takahashi, A., Camacho, P., Lechleiter, J.D. and Herman, B. (1999). Measurement of intracellular calcium. *Physiol. Rev.* **79**, 1089-1125.
- Tang, Y.H., and Othmer, H.G. (1995). Frequency encoding in excitable systems with applications to calcium oscillations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7869-7873.
- Taylor, A.R., Manison, N.F.H., Fernandez, C., Wood, J.W., and Brownlee, C. (1996). Spatial organization of calcium signalling involved in cell volume control in the *Fucus* rhizoid. *Plant Cell* **8**, 2015-2031.

- Taylor, C.W., and Traynor, D. (1995). Calcium and inositol trisphosphate receptors. *J. Membr. Biol.* **145**, 109-118.
- Tazawa, M., Shimada, K., and Kikuyama, M. (1995). Cytoplasmic hydration triggers a transient increase in cytoplasmic Ca^{2+} concentration in *Nitella flexilis*. *Plant Cell Physiol.* **36**, 335-340.
- Tena, G., and Renaudin, J.P. (1998). Cytosolic acidification but not auxin at physiological concentration is an activator of MAP kinases in tobacco cells. *Plant J.* **16**, 173-182.
- Terry, B.R., Findlay, G.P. and Tyerman, S.D. (1992). Direct effects of calcium channel blockers on plasma membrane cation channel of *Amaranthus tricolor* protoplasts. *J. Exp. Bot.* **43**, 1457-1473.
- Thellier, M., Boyer, N., Julien, J.L., Verdus, M.C., Norris, V. and Ripoll, C. (1997). Storage and expression of morphogenic signals in plants. *Sci. Rep. Agr. Plant Physiol.* 15-21.
- Thellier, M., Le sceller, L., Norris, V., Verdus, M.C. and Ripoll, C. (2000). Long-distance transport, storage and recall of morphogenetic information in plants. The existence of a sort of primitive plant 'memory'. *C. R. Acad. Sci. Paris* **323**, 81-91.
- Thiel, G., and Blatt, M.R. (1994). Phosphatase antagonist okadaic acid inhibits steady-state K^+ currents in guard cells of *Vicia faba*. *Plant J.* **5**, 727-733.
- Thiel, G., MacRobbie, E.A.C., and Blatt, M.R. (1992). Membrane transport in stomatal guard cells: The importance of voltage control. *J. Membr. Biol.* **126**, 1-18.
- Thiellement H., Bahrman, N., Damerval, C., Plomion, C., Rossignol, M., Santoni, V., De Vienne, D., Zivy, M. (1999). Proteomics for genetic and physiological studies in plants. *Electrophoresis* **20**, 2013-2026.
- Thion, L., Mazars, C., Thuleau, P., Graziana, A., Rossignol, M., Moreau, M., and Ranjeva, R. (1996). Activation of plasma membrane voltage-dependent calcium-permeable channels by disruption of microtubules in carrot cells. *FEBS Lett.* **340**, 45-50.
- Thomas, M.V. (1982). *Techniques in Calcium Research*. (London: Academic Press).
- Thuleau, P., Graziana, A., Ranjeva, R., and Schroeder, J.I. (1993). Solubilized proteins from carrot (*Daucus carota* L.) membranes bind calcium channel blockers and form calcium-permeable ion channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 765-769.
- Thorne, A.W. (1998). DNA methylation models histone acetylation. *Nature* **394**, 842.
- Trewavas, A. (1986) Timing and memory processes in seed embryo dormancy - A conceptual paradigm for plant development questions. *Bio. Essays* **6**, 87-92.
- Trewavas, A.J., and Mahl6, R. (1998). Ca^{2+} signalling in plant cells: The big network! *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 428-433.

U

- Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T. and Shinozaki, K. (1999). A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell* **11**, 1743-1754.
- Usami, S., Banno, H., Ito, Y., Nishimama, R., and Machida, Y. (1995). Cutting activates a 46-kilodalton protein kinase in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 8660-8664.

V

- Verdus, M.C., Cabin-Flaman A., Ripoll, C. and Thellier, M. (1996) Calcium-dependent storage/retrieval of environmental signals in plant development. *C. R. Acad. Sci. Paris* **319**, 779-782.
- Verdus, M.C., Thellier, M. And Ripoll, C. (1997). Storage of environmental signals in flax. Their morphogenetic effect as enabled by a transient depletion of calcium. *Plant J.* **12**, 1399-1410.

- Vian H. C., Vian A., Dietrich A., Ledoigt G., Desbiez M.O. (1995a) Changes in the polysomal mRNA population upon wound signal expression or storage in *Bidens pilosa*. *Plant Physiol.* **33**, 337-344.
- Vian H. C., Vian A., Davies E., Ledoigt G., Desbiez M.O. (1995b) Wounding regulates polysomal incorporation of hsp70 and tch1 transcripts during signal storage and retrieval. *Physiol. Plant.* **95**, 387-392.
- Vriezen, W.H., Rijn, C.P.E., Voesenek, L.A.C.J. and Mariani, C. (1997). A homolog of the *Arabidopsis thaliana* ERS gene is actively regulated in *Rumex palustris* upon flooding. *Plant J.* **11**, 1265-1271.

W

- Walleczek, J., Liburdy, R.P. (1990). Nonthermal 60 Hz sinusoidal magnetic-field exposure enhances $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in rat thymocytes: dependence on mitogen activation. *FEBS Lett.* **271**, 157-160.
- Ward, J.M., and Schroeder, J.I. (1994). Calcium activated K^+ channels and calcium-induced calcium release by slow vacuolar ion channels in guard cell vacuoles implicated in the control of stomatal closure. *Plant Cell* **6**, 669-683.
- Ward, J.M., Pei, Z.M., and Schroeder, J.I. (1995). Roles of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants. *Plant Cell* **7**, 833-844.
- Wasinger, V.C., Cordwell, S.J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J.X., Gooley, A.A., Wilkins, M.R., Duncan, M.W., Harris, R., Williams, K.L. and Humphery-Smith, I. (1995). Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* **16**, 1090-1094.
- Webb, M.H., Brown, F.A. and Schroeder, T.E. (1961). Organismic responses to differences in weak horizontal electrostatic fields. *Biological Bulletin* **121**, 413.
- Webb, S.J. (1990). Factors affecting the induction of Lambda prophages by millimetre microwaves. *Phys. Lett.* **73A**, 145-148.
- Webb, S.J. and Booth, A.D. (1969). Absorption of microwaves by micro-organisms. *Nature* **222**, 1199-1200.
- White, P.J. (1993). Characterization of a high-conductance, voltage dependent cation channel from the plasma membrane of rye roots in planar lipid bilayers. *Planta* **191**, 541-551.
- White, P.J. (1994). Characterization of a voltage-dependent cation channel from the plasma membrane of rye (*Secale cereale* L.) roots in planar lipid bilayers. *Planta* **193**, 186-193.
- White, P.J. (1998). Calcium channels in the plasma membrane of root cells. *Ann. Bot.* **81**, 173-183.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., and Johnson, G.L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* **79**, 143-180.
- Wilson, C., Voronin, V., Touraev, A., Vicente, O., and Heberle-Bors, E. (1997). A developmentally regulated MAP kinase activated by hydration in tobacco pollen. *Plant Cell* **9**, 2093-2100.
- Wimmers, L.E., Ewing, N.N., and Bennett, A.B. (1992). Higher plant Ca^{2+} -ATPase: Primary structure and regulation of mRNA abundance by salt. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9205-9209.
- Wood, N.T., Allan, A.C., Haley, A., Viry-Moussaid, M. and Trewavas, A.J. (2000). The characterization of differential calcium signalling in tobacco guard cells. *Plant J.* **24**, 335-344.
- Wu, Y., Kuzma, J., Marechal, E., Graeff, R., Les, H.C., Foster, R., and Chua, N.H. (1997). Abscisic acid signalling through cyclic ADP-ribose in plants. *Science* **278**, 2126-2130.
- Wurgley-Murphy, S.M., and Saito, H. (1997). Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 172-176.
- Wymer, C.L., Bibikova, T.N., and Gilroy, S. (1997). Cytoplasmic free calcium distributions during the development of root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **12**, 427-439.

Y

- Yamasaki, H., Mesnil, M., Omori, Y., Mironov, N. and Krutovskikh, V. (1995). Intercellular communication and carcinogenesis. *Mutation res.*, **333**, 181-188.
- Yang, W., and Boss, W. (1994). Regulation of phosphatidylinositol 4-kinase by the protein activator PIK-A49. Activation requires phosphorylation of PIK-A49. *J. Biol. Chem.* **269**, 3852-3857.
- Yang, Y., Shah, J., and Klessig, D.F. (1997). Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes and Development* **11**, 1621-1639.
- Yates J.R. III. (1998). Mass spectrometry and the age of the proteome. *J. Mass Spectrom.* **33**, 1-19.
- Yokota, E., Muto, S. and Shimmen, T., (1999). Inhibitory regulation of higher-plant myosin by Ca²⁺ ions. *Plant Physiol.* **119**, 231-239.
- Yokota, E., Muto, S. and Shimmen, T., (2000). Calcium-calmodulin suppresses the filamentous actin-binding activity of a 135-kilodalton actin-bundling protein isolated from lily pollen tubes. *Plant Physiol.* **123**, 645-654.
- Youbicier-Simo, B.J., Boudard, F., Cabaner, C. and Bastide, M. (1997). Biological effects of continuous exposure of embryos and young chickens to electromagnetic fields emitted by video display units. *Bioelectromag.* **7**, 514-523.
- Yost, M.G. and Liburdy, R.P. (1992). Time-varying and static magnetic fields act in combination to alter calcium signal transduction in the lymphocyte. *FEBS Lett.* **296**, 117-122.

Z

- Zhao, Y., Kappes, B., and Franklin, R.M. (1993). Gene structure and expression of an unusual protein kinase from *Plasmodium falciparum* homologous at its carboxyl terminus with the EF hand calcium-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **268**, 4347-4354.
- Zhang, F., Strand, A., Robbins, D., Cobb, M.H., and Goldsmith, E.J. (1994). Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* **367**, 704-711.
- Zhang, J., Zhang, F., Ebert, D., Cobb, M.H., and Goldsmith, E.J. (1995). Activity of the MAP kinase ERK2 is controlled by a flexible surface loop. *Structure* **3**, 299-307.
- Zhang, S. and Klessig, D.F. (1997). Salicylic acid activates a 48 kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* **9**, 809-824.
- Zhang, S., and Klessig, D.F. (1998a). The tobacco woundind-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7225-7230.
- Zhang, S. and Klessig, D.F. (1998b). Resistance gene N-mediated *de novo* synthesis and activation of a tobacco mitogen-activated protein kinase by tobacco mosaic virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7433-7438.
- Zheng, C.F., and Guan, K.L. (1994). Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *EMBO J.* **13**, 1123-1131.
- Zimmermann, S., Nürnberger, T., Frachisse, J.M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R., and Scheel, D. (1997). Receptor-mediated activation of a plant Ca²⁺-permeable ion channel involved in pathogen defence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2751-2755.
- Zivy M., de Vienne D. (2000). Proteomics : a link between genomics, genetics and physiology. *Plant Mol. Biol.* **44**, 575-580.

Publication 1.

2D-electrophoresis investigation of short-term response of flax seedlings to a cold shock.

Electrophoresis (sous presse).

2D-electrophoresis investigation of short-term response of flax seedlings to a cold shock

Authors: Marc Tafforeau¹, Marie Claire Verdus¹, Roland Charlionet², Armelle Cabin-Flaman¹, Camille Ripoll¹

Address: ¹ Laboratoire des Processus Intégratifs Cellulaires, UMR CNRS 6037, Faculté des Sciences de l'Université de Rouen, Mont Saint Aignan Cedex, France.

² Unité INSERM 519, Faculté de Médecine - Pharmacie, Rouen, France.

Running title: Short-term changes in flax proteome after a cold shock

Correspondence: Prof. C. Ripoll, Laboratoire des Processus Intégratifs Cellulaires, UMR CNRS 6037, Faculté des Sciences de l'Université de Rouen, 76821 Mont Saint Aignan Cedex, France

E-mail: Camille.Ripoll@univ-rouen.fr

Fax: +33-2-3414-7020

Abbreviations: MAPK, Mitogen Activated Protein Kinase; CS, Cold Shock

Keywords: 2D-electrophoresis / cold shock / flax

Summary

The flax, *Linum usitatissimum* L, is particularly suitable for studying the transduction and long-term signal storage of environmental signals. To investigate the underlying molecular mechanisms, we have focussed on the initial changes in the proteome since these offer the possibility of reflecting the plant's history of exposure to stress. In principle, this 'proteome signature' might be revealed by 2-DE. We have therefore determined the potential of 2-DE to study the kinetics of changes to the proteome of flax induced by a 1 minute cold shock. Protein identification is difficult with flax because of the lack of knowledge of gene sequences. Nevertheless, 2-DE analysis can be informative providing the significance of changes can be evaluated. We have therefore developed a stringent threshold method to determine the significance of changes in gels obtained with proteins extracted from hypocotyls at different times after cold shock. This allowed us to reliably detect and characterise the kinetics of a set of seven spots that responded to cold shock and that constitute candidates for a proteome signature of long-term signal storage.

1 Introduction

Understanding the effect of low temperature on plants is an important issue for the improvement of crops in temperate and cold countries. Short-term and long-term responses of plants to cold exposure have been subjected to intensive study. Long term (days, weeks) exposure to low temperature induces in a variety of plant species the process of cold acclimation [1-3] endowing plants with the ability to survive freezing temperatures. Sudden exposure of plants to a low ambient temperature (cold shock) triggers short-term (seconds to hour) responses such as a decrease in membrane fluidity [1, 4], transient MAPK activation [5], actin cytoskeleton re-organisation [6], up-regulation of calmodulin-related genes [7], transient increase of the free cytosolic calcium concentration [7-12]. It is widely accepted that these transient calcium increases lie upstream from phosphorylation-dephosphorylation events and gene expression in the cell [13-15].

Cold pre-treatment of *Arabidopsis* plants altered the spatio-temporal characteristics of the calcium transient, a “calcium signature” triggered by a cold shock [9, 12]. This signature corresponds to a short-term response and a similar response has also been reported for drought [16]. In the latter case, the history of previous stresses was also important in altering the calcium response to a subsequent stress. These observations suggest that a long-term “memory” of the history of stresses exists in plants. Our group also obtained evidence for a similar long-term signal storage in flax [17, 18]. We showed that exposure of flax seedlings to stresses such as touching, wind, drought or cold shock, resulted in the production of epidermal meristems in the hypocotyl, providing these seedlings underwent a temporary calcium deprivation. Moreover, if the calcium deprivation was delayed for a few days after subjecting the seedlings to a stress, the meristem production was also delayed for the same lapse of time (the level of production was not affected) [17, 18]. This sensitive system of production of meristems triggered by a calcium depletion, means that flax is an excellent model organism for studying long-term signal storage in the transduction of environmental signals in plants.

Almost nothing is known about the molecular mechanisms underlying long-term signal storage in plants [19] except for the possible involvement of calcium [9, 12, 17, 18]. This calcium signature is one of the earliest events revealing that signal storage may have taken place. We therefore wondered if it would be possible to obtain evidence of a “proteome signature” of the history of stresses experienced by a plant analogous to that shown for the calcium signature [9]. We reasoned that the short-term changes occurring in its proteome might elucidate the nature of the long-term signal storage in flax. To investigate these

changes, we have used standard 2D-electrophoresis (2-DE) to study the kinetics of the modification of the flax proteome induced by a cold shock. Two steps in the analysis of 2-DE are required. Firstly, the statistical significance of the difference in migration must be assessed. It is particularly important to adopt stringent criteria for the analysis of differences in migration in the case of flax in which identification of proteins is difficult due to the scarcity of sequence data. Secondly, this difference must be attributed to a biochemical cause. In this mainly methodological work, we focus on the first step and determine the smallest changes in protein 2-DE gels that can be reliably considered as short-term responses of flax to cold shock.

2 Material and Methods

2.1 Plant growth and cold shock treatment

Flax plants were grown in different batches in a culture room at $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$. Two replicates have been carried out. Approximately 100 flax seeds (*Linum usitatissimum* L., var. Ariane) per batch were allowed to germinate on nylon meshes fitted on the top of the growth vessels. The level of the nutrient medium in the vessels was adjusted in such a way that the solution was in contact with the seeds during seed germination (3 days in the dark). Then the seedlings were left to grow for 3 further days *in situ* under continuous artificial light ($32 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ in intensity). During seed germination and seedling growth, the vessels were filled with a medium modified [20] from the CERA III medium of Homès *et al.* [21] and containing the macronutrients 6.92 mM KNO_3 , 2.33 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.62 mM $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 2.18 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and the micronutrients 2.18 μM $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.0 μM $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1.04 μM $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 51.0 μM $\text{Fe}^{3+}\text{EDTA}$ and 27.33 μM H_3BO_3 . The medium was renewed every 2 days. After six days of growth the flax seedlings were subjected to a cold shock treatment. The meshes, each bearing a different batch of seedlings, were carefully removed from their growth vessels and transferred for one minute on the top of another vessel containing a cold (4°C) growth medium into which the roots were plunged. After this treatment the meshes were placed back on their original growth vessel for different times (9, 29, 59 and 119 min). Then they were again removed from their growth vessel and rapidly thrown into a polystyrene box containing liquid nitrogen wherein the seedlings were frozen. Another mesh was frozen immediately after the cold shock treatment. This allowed us to recover 5 batches of seedlings (termed 1minCS, 10minCS, 30minCS, 60minCS and 120minCS) that had been subjected to a 1 min cold shock and frozen

1, 10, 30, 60 and 120 min after the beginning of the cold shock. In the control experiment, plants were subjected to the same transfers from one medium to another but the medium was always held at 22°C; at the end of the experiment the control seedlings (termed NCS) were also frozen. The frozen plants were then transferred at -20°C and the hypocotyls were severed and conserved at this temperature until their use.

2.2 Extraction of soluble proteins of flax and Arabidopsis

Flax hypocotyls were crushed in liquid nitrogen, and then homogenised with 10% TCA and 0.07% β -mercaptoethanol in cold (-20°C) acetone [22, 23]. Proteins were allowed to precipitate one hour at -20°C. After a 10 min centrifugation at 6,000g at -10°C, the pellets were washed twice with cold acetone containing 0.07% β -mercaptoethanol for one hour at -20°C. The supernatants were discarded and the pellets were vacuum-dried during a night at -20°C and dissolved in 70 μ L per mg of dry matter of an extraction buffer (9.5 M urea, 50 mM DTE, 5% CHAPS, 25 mM spermine base, 4% polyvinylpyrrolidone, and a trace of bromophenol blue) for one hour on a shaker [24]. After a 30 min centrifugation at 200,000 g at 15°C, the protein concentrations were determined using the Bradford Protein Kit Assay (Bio-Rad). The samples were conserved at -80°C until use.

2.3 2D-electrophoresis

Two-dimensional electrophoresis was carried out according to Bjellqvist [25]. Dry IPG strips (17 cm long, pH 5-8 linear) from BioRad were used to perform the first dimension electrophoresis. Each strip was rehydrated with 400 μ L of rehydration buffer (9 M urea, 15 mM DTE, 2% CHAPS, 0,8% (v/v), Ampholines and a trace of bromophenol blue) containing 30 μ g of proteins. Focalisation was performed using a Protean IEF Cell unit (Bio-Rad) with a total (volt)x(hour) value of 80 kVh. Before performing the second dimension, the strips were first equilibrated during 15 min in a buffer containing 50mM Tris HCl (pH 8.8), 6M urea, 24% (m/v) glycerol, 2% SDS, 2% DTE and then 15 min again in the same buffer except that the 2% DTE had been substituted by 2.5% of iodoacetamide plus a trace of bromophenol blue. The second dimension electrophoresis was then performed in a 10% polyacrylamide gel: 1) 50 minutes with a current intensity of 10 mA per gel at a temperature in the range 9-11°C, and 2) 4 hours with a current intensity of 20mA per gel [26]. Gels were stained using ammoniacal silver staining protocol [27] then scanned using an optical scanner in transmissive mode (Umax) at 150 dpi and analysed with Melanie III software (Bio-Rad).

2.4 N-terminal sequencing

After completion of the second dimension of the 2-D electrophoresis, flax proteins were transferred (transfer time duration: 2h) from the gel to a PVDF membrane using a semi-dry blotting apparatus (Bio-Rad). The transfer buffer was 48mM Tris, 39mM Glycin, 0.1% SDS and 20% 2-propanol. After the staining of the PVDF membrane (Coomassie brilliant blue R250), spots were selected and the N-terminal sequence of the corresponding proteins determined using Edman procedure (Procise 492, Perkin Elmer Applied Biosystems). Swiss-Prot, GenBank and Embl protein databases were used for protein identification.

3 Results

3.1 Determination of reliability thresholds for the observed changes in 2-DE gels

After the cold shock, two types of changes were observed in the gels. Spots appeared or disappeared without apparent major changes in the location of the neighbouring spots. In other cases, one spot appeared and another disappeared at a neighbouring location and at the same molecular mass corresponding to a shift in the pI of a protein (although degradation of one protein and synthesis of another cannot be *a priori* excluded). When small, these “shifts” may be artefactual, because 2-DE is known to give results affected by a hardly controllable variability [28]. Thus to improve the determination of the significance of small shifts in protein pI induced by a cold shock, we used the following threshold procedure. It consisted in the measurement of the “noise” of the method, i.e. the maximum Δ pI value that cannot be accepted as significantly different from zero; this value was the threshold value. As a rule, a protein spot was accepted as being shifted in a gel after cold shock if it was actually shifted at least 2 times the threshold and if this was observed in at least 3 replicate gels. To determine the threshold value we proceeded in 2 steps. First, we chose by eye from the unprocessed gel images a set of 50 intensely stained proteins spots that appeared at the same location in a fairly reproducible manner (Figure 1). These reference spots were chosen to cover the entire gel and their co-ordinates (Mw, pI) were measured (Melanie III software) in a reference gel using markers of pI and molecular weight. The obtained values (reference values) were then assigned without change to the corresponding spots in all the other analysed gels. Second, using a series of 16 unprocessed gels images, we measured (Melanie III software) the pIs and Mw of a set of 21 additional “unchanged” proteins (Figure 1) whose spots in the gels were located in areas where major changes (large spot shifts, spot appearing or disappearing) were visibly affecting neighbouring proteins. This measurement used the reference values obtained

as described above. For the 21 proteins we calculated the mean $\langle pI \rangle$ of the 16 pI values and found that the set of deviations from the mean, $(pI - \langle pI \rangle)$, constituted an homogeneous statistical sample. We considered that these deviations were a measure for the “noise” of the method. To quantify this noise, we calculated the 95 and 99% confidence intervals and found 0.0071 and 0.0098 respectively. Thus, we estimated at 0.01 the largest ΔpI value that cannot significantly be accepted as different from zero. Clearly this procedure integrates the variability inherent to the 2-D gel electrophoresis method. Finally, we measured the coordinates of the spots that were substantially changed in the gels after a cold shock. An example is given in Figure 2.

The increase (or decrease) in intensity of a spot in a gel at a given time may also be artefactual because of large random variations in the silver staining, as recently quantified by Voss and Haberl [28]. Comparing 2 replicate gels run in parallel (proteins from human blood mononuclear cells), these authors showed that the staining intensity for 20% of all spots differed by a factor of 2 to 5 and even for 3% of them by a factor of 5 or more. Hence, to determine in our experiments whether a cold-shock produced a significant variation in spot intensity, we proceeded as follows. We measured the relative integrated absorbance of 38 spots (“vol%” value returned by the Melanie software) in a series of 16 gels. The spots included those of the 21 proteins used to estimate the pI threshold as explained above and 17 additional spots chosen for their apparent unsaturated staining. We determined the 38x16 deviations from the mean of the relative integrated absorbances, $vol\% - \langle vol\% \rangle$ (the mean, $\langle vol\% \rangle$, for each of the 38 spots is calculated with the vol% values measured in the 16 gels). As for the position shift, we quantified the staining noise using the 95 and 99% confidence intervals of the deviations from the mean and found 0.033 and 0.043 respectively. Thus we decided that the intensity of a spot had reliably changed only when: 1) at a given time, the spot vol% values did not differ more than 0.033 from each other in at least 3 replicate gels run in parallel and 2) the change in intensity in gels obtained at two consecutively investigated times was at least 2×0.033 which was indeed observed in all the replicates. Figure 3 shows the example of the 46 kDa flax protein CSD (see below and table 1).

3.2 Kinetics of the changes in flax proteome induced by a cold shock

As explained in the Material and Methods, we analysed the changes in the 2-DE gels at times 1, 10, 30, 60 and 120 minutes after the beginning of the cold shock. Using the stringent criteria described above, we found 7 proteins that were reliably correlated with the cold shock (Table 1). When at least 30 min had elapsed after subjecting the seedlings to the

cold shock, 3 of these (CSA, CSB and CSC) showed a pI shift towards a lower value (Figure 3) whilst 1 (CSF) appeared (this spot was absent at shorter times and in the control). The spots of the other 3 proteins (CSD, CSE and CSG) were absent in the control gels but appeared as early as 1 min after the cold shock. Two of these spots, CSD and CSG, were transient; being present until 60 minutes but absent at 120 minutes.

One possible interpretation of these observations is that the proteins CSA, CSB and CSC underwent a post-translational modification such as phosphorylation following the cold shock. The proteins CSD, CSE, CSF and CSG, which are absent from the control gels at the corresponding position, may be newly synthesised proteins or the result of degradation of other proteins. The spots of proteins CSD, CSE and CSG are visible in gels obtained with proteins extracted as soon as 1 minute after the beginning of the cold shock. If they are newly synthesised, this may be because their synthesis is under translational control (the corresponding mRNAs being already present at the time of the cold shock). That said, synthesis of these 3 proteins within a minute is unlikely. The spot corresponding to the protein CSF is only visible in gels obtained with proteins extracted at least 30 minutes after the cold shock; in this case the synthesis may be under transcriptional control.

N-terminal sequences were obtained for protein CSA – xx(IP)(GE)(AL)ExxN – and for protein CSE – (DK)G(LG)(GEI)(NS)(LVT)FR(QL)V. The CSE sequence was compared with those in different databases; a match (80% identity) was found in the NCBI database to saccharopine dehydrogenase (an enzyme of lysine metabolism) of the yeast *Yarrowia lipolytica* (NCBI accession number: M34929). It is unclear why the N-terminal microsequencing of the seven proteins using the Edman procedure gave a satisfactory result only for CSE. N-terminal blockage of these proteins is one possible explanation.

4 Discussion

Our objective in this study was to evaluate the potential of 2-DE to reveal short-term changes to soluble flax proteins. We therefore investigated changes that occurred in the flax proteome during the first minutes after that this plant was subjected to a brief cold shock (1 min). The choice of this cold shock duration was dictated by the observation that after subjecting plants to a cold shock, the $[Ca]_{\text{cyt}}$ increased and then returned to a basal level within a lapse of time of about 1 min [7-12]. Hence we expected that after such a short exposure to low temperature, the changes most likely to be observed would be of proteins responsible for sensing low temperature and for the early stages of the downstream

transduction processes (including possibly a memorisation process) rather than proteins involved in cold acclimation which requires a much longer exposure to low temperature [2].

The system of epidermal meristem production in the hypocotyls of flax is particularly effective for revealing the memory that is laid down during the transduction of a wide range of low intensity stimuli by seedlings [17, 18]. The lack of knowledge of flax genome sequences is, however, a serious drawback to discovering the molecular mechanism underlying this memory. To identify a flax protein using its N-terminal sequence entails searching databases that are not based on flax and can only succeed in the case of highly conserved sequences. An alternative approach is to use a model organism such as *Arabidopsis thaliana*. Recently, we have found that carbonic anhydrase, an enzyme implicated in signalling [29], is one of the *Arabidopsis* proteins affected by a brief cold shock and other stimuli (Tafforeau *et al.*, unpublished results). Unfortunately, this does not help identify a similar protein in flax proteins by sequence comparison; indeed, comparison of the 25 first aminoacids of the N-terminal sequences of the mature carbonic anhydrase from *Flaveria linearis* (Swiss-Prot accession number P46512), *Pisum sativum* (P17067), *Spinacia oleracea* (P16016) and *Nicotiana tabacum* (P27141) to that of *Arabidopsis thaliana* gives percentage identities of only 12, 4, 12 and 16% respectively.

Our experiments are in accord with the results of Voss and Haberl [28] in showing that the most important limitation of 2-DE in generating a pattern that might constitute a “proteome signature” of the history of stresses experienced by a plant lies in the variability in the location as well as in the staining intensities of the spots in a gel. Even using standardised protocols, as we did in this work, the 2-DE method remains “noisy”. Hence many changes cannot be detected with certitude. We actually found that the characteristics of numerous spots were different at different times after cold-shock treatment. Many of these differences, however, were of a similar magnitude to those generated by the variability inherent to the 2-DE technique. On a statistical basis it was therefore not possible to assign them to a cold-shock effect. Nevertheless, using our stringent criteria to evaluate both shifts in position and variations in intensity, we succeeded to reliably detect a set of flax proteins that were affected by a brief cold shock. Moreover, we were able to characterise the short-term kinetics of these changes. Hence, 2-DE which is acknowledged to be one of the principal techniques in several areas in plant biology [30] may also help reveal the proteome signature corresponding to the memory laid down during environmental signal integration in flax.

Acknowledgements

We thank Vic Norris for discussions and for help with our English. M.T. was supported by a fellowship from the “Ministère de la Recherche”.

5 References

- [1] Levitt, J., *Responses of plants to environmental stress. Chilling, freezing and high temperature stresses*, Ed 2, Academic Press, New York 1980, pp 497.
- [2] Guy C., L., *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1990, *41*, 187-223.
- [3] Thomashow, M., F., *Plant Physiol.* 1998, *118*, 1-7.
- [4] Alonso, A., Queiroz, C.S., Magalhaes, A. C., *Biochim. Biophys. Acta* 1997, *1323*, 75-84.
- [5] Mizoguchi, T., Irie, K., Hirayama, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Matsumoto, K., Shinozaki, K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, *93*, 765-769.
- [6] Örvar, B. L., Sangwan, V., Omann, F., Dhindsa, R. S., *Plant J.* 2000, *23*, 785-794.
- [7] Polisenky, D. H., Braam, J., *Plant Physiol.* 1996, *111*, 1271-1279.
- [8] Knight, M. R., Campbell, A. K., Smith, S. M., Trewavas, A. J., *Nature* 1991, *352*, 524-526.
- [9] Knight, H., Trewavas, A. J., Knight M. R., *Plant Cell* 1996, *8*, 489-503.
- [10] Sebastiani, L., Lindberg, S., Vitagliano, C., *Physiol. Plant.* 1999, *105*, 239-245.
- [11] Plieth, C., Hansen, U-P., Knight, H., Knight, M. R., *Plant J.* 1999, *18*, 491-497.
- [12] Knight, H., Knight, M. R., *J. Exp. Bot.* 2000, *51*, 1679-1686.
- [13] Monroy, A. F., Sarhan, F., Dhindsa, R. S., *Plant Physiol.* 1993, 102-1227-1235.
- [14] Takahashi, K., Isobe, M., Muto, S., *FEBS Letters* 1997, *401*, 202-206.
- [15] Malhó, R., Moutinho, A., Van der Luit, A., Trewavas, A. J., *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 1998, *353*, 1463-1473.
- [16] Knight, H., Brandt, S., Knight, M. R., *Plant J.* 1998, *16*, 681-687.
- [17] Verdus, M-C., Cabin-Flaman, A., Ripoll, C., Thellier, M., *C. R. Acad. Sci. Paris, Série III, Sci. Vie* 1996, *319*, 779-782.
- [18] Verdus, M-C., Thellier, M., Ripoll, C., *Plant J.* 1997, *12*, 1399-1410.
- [19] Thellier, M., Boyer, N., Julien, J-L., Verdus, M-C., Norris, V., Ripoll, C., in: Couchat, P. (Ed.), *Scientific representation in agronomy and plant physiology*, Research Signpost, Trivandrum 1997, pp. 15-21.
- [20] Thellier, M., *Contribution à l'étude de la nutrition en bore des végétaux*, Thèse, Paris 1963.
- [21] Homès, M., Ansiaux, J.R., Van Schoor, G., *L'aquiculture*, 2nd edition, Bruxelles 1953.
- [22] Damerval, C., De Vienne, D., Zivy, M., Thiellement, H., *Electrophoresis* 1986, *7*, 52-54.
- [23] Granier, F., *Electrophoresis* 1988, *9*, 712-718.
- [24] Rabilloud, T., *Electrophoresis* 1996, *17*, 813-829.
- [25] Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P.G., Gianazza, E., Görg, A., Westermeier, R., Postel, W., *J. Biochem. Biophys. Method* 1982, *6*, 317-339.
- [26] Görg, A., Boguth, G., Obermaier, C., Posch, A., Weiss, W., *Electrophoresis* 1995, *16*, 1079-1086.
- [27] Oakely, B. R., Kirsch, D. R., Morris, N. R., *Anal. Biochem.* 1980, *105*, 361-363.
- [28] Voss, T., Haberl, P., *Electrophoresis* 2000, *21*, 3345-3350.
- [29] Breton S., *JOP. J Pancreas (Online)* 2001; *2(4 Suppl)*, 159-164.
- [30] Thiellement H., Bahrman, N., Damerval, C., Plomion, C., Rossignol, M., Santoni, V., De Vienne, D., Zivy, M., *Electrophoresis* 1999, *20*, 2013-2026.

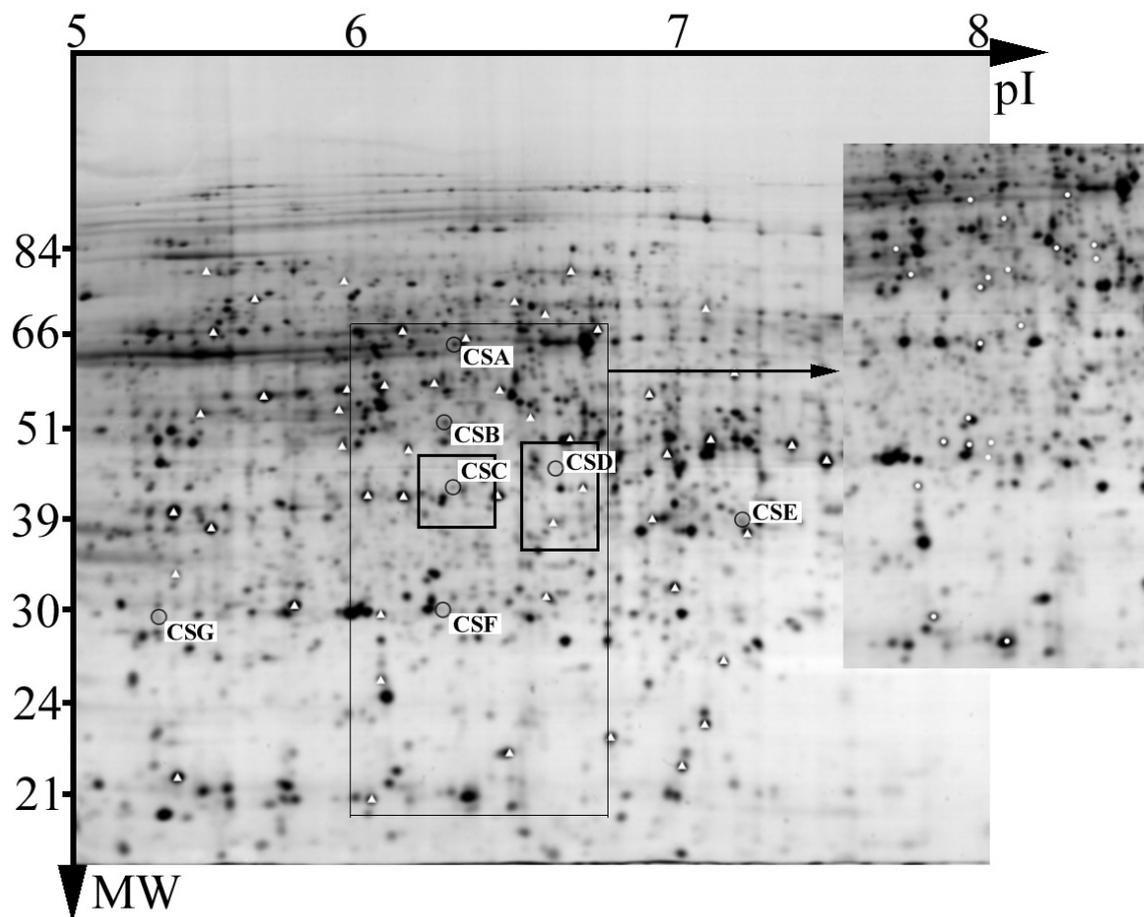


Figure 1. Two dimensional electrophoresis gel obtained with proteins extracted from flax (control experiment). Silver staining; some 1200 spots are visible. The shown pI range is 5-8. Proteins spots indicated by an upper triangle correspond to the reference proteins (see text). Spots marked by a dot in the inset are the 21 proteins used to estimate the “noise” in pI shift determination as explained in the text. The square areas labelled CSC and CSD are shown enlarged in figures 2 and 3. The circled proteins are those affected by the cold shock as discussed in the text (Table 1).

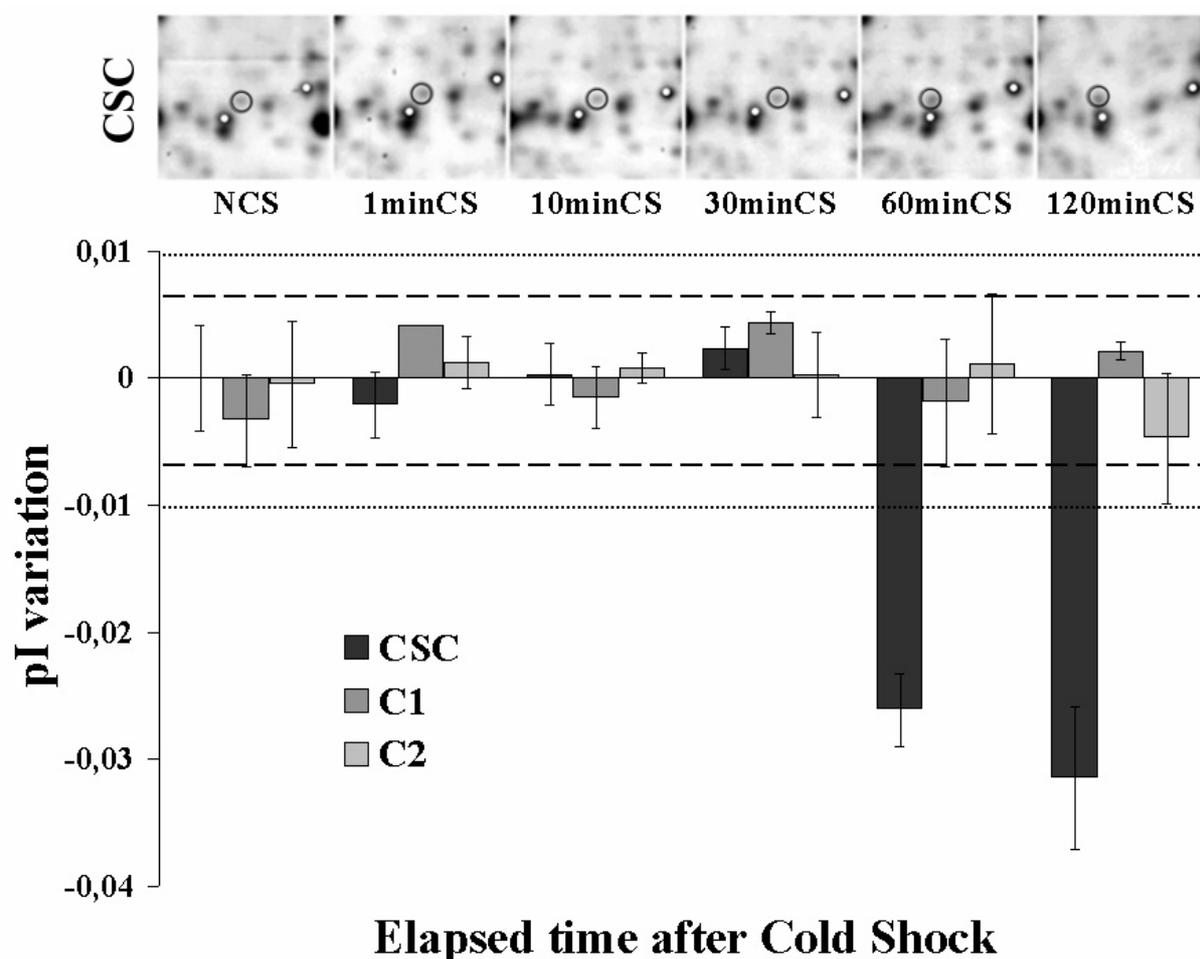


Figure 2. Example of determination of the pI change of the 44 kDa flax protein CSC. The pI changes at different times are shown for 3 proteins. The proteins C1 and C2 are 2 of the 21 proteins used to estimate the “noise” of the method (dotted spots in the shown gel areas). For these 2 proteins the shown pI changes are differences between the mean of pI values obtained with 3 replicates gels corresponding to a given time and the mean of the values obtained at all the times (16 gels). The differences are not significant, they lie within the 95 and 99% confidence intervals (dashed and dotted horizontal lines respectively) calculated with the series of 16 gels used to estimate the noise (see text). The pI of the protein CSC (circled protein in the shown gel areas) clearly remains unchanged until a time comprised between 30 and 60 min after the cold shock, after which it falls 0.03 units. The pI differences shown for the protein CSC are between the mean of pI values measured at a given time with 3 replicates gels and the mean of the control gels (3 replicates). The standard deviations of the different plotted means are shown.

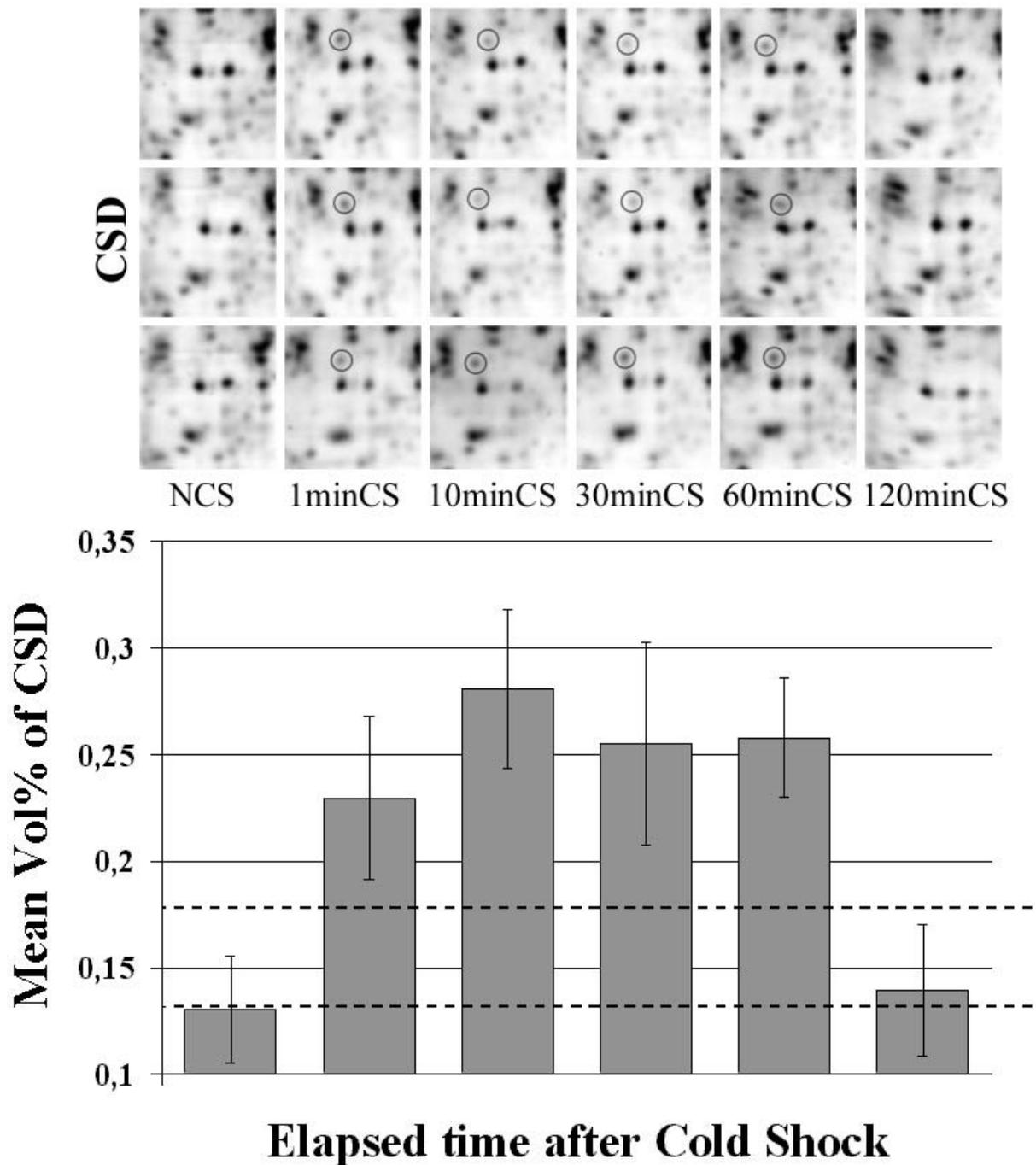


Figure 3. Kinetics of change of the staining intensity of the 46 kDa flax protein CSD after a cold shock. The spot corresponding to CSD is circled in the shown gel areas corresponding to 3 replicates run in parallel. The mean Vol% of the replicates from 3 independent experiments and its standard deviation is represented at the different times. The distance between the two horizontal dashed lines is the Vol% threshold value (2×0.033) determined as explained in the text.

Table 1. Characteristics of the early changes in flax proteins after a cold shock.

Protein	MW (kDa)	pI	Observed changes
CSA	66	6.34	After 30 min, pI value lowered to 6.31
CSB	53	6.31	After 30 min, pI value lowered to 6.29
CSC	44	6.33	After 30 min, pI value lowered to 6.30
CSD	46	6.60	New spot visible from 1 to 60 min (%vol variation: 0.108)
CSE	39	7.16	New spot already visible at 1 min (%vol variation: 0.066)
CSF	30	6.31	New spot only visible after 30 min (%vol variation: 0.104)
CSG	30	5.52	New spot visible from 1 to 60 min (%vol variation: 0.099)

Publication 2.

Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS): a tool for the determination of the phosphorylation status of proteins in electrophoresis gels.

(Manuscrit en préparation).

Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS): a tool for the determination of the phosphorylation status of proteins in electrophoresis gels.

Marc Tafforeau, Guillaume Legent, David Gibouin, Marie-Claire Verdus, Vic Norris and Camille Ripoll

Address: Laboratoire des Processus Intégratifs Cellulaires, UMR CNRS 6037, Faculté des Sciences de l'Université de Rouen, Mont Saint Aignan Cedex, France.

Running title: SIMS determination of phosphorylation status of proteins

Correspondence: Prof. C. Ripoll, Laboratoire des Processus Intégratifs Cellulaires, UMR CNRS 6037, Faculté des Sciences de l'Université de Rouen, 76821 Mont Saint Aignan Cedex, France

E-mail: Camille.Ripoll@univ-rouen.fr

Fax: +33-2-3414-7020

Abbreviations: SIMS Secondary Ion Mass Spectrometry, EGDMA Ethyleneglycol Dimethacrylate, HEMA Hydroxyethyl Methacrylate, LRW London Resin White, MS Mass Spectrometry

Keywords: Phosphorylation, Post-translational modifications, SIMS, 2-DE, PAGE

Summary

Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS) has the potential to determine the phosphorylation status of proteins after their separation by gel electrophoresis (PAGE and 2-DE). We have investigated this potential and show here that SIMS permits a direct and sensitive detection of the non-radioactive isotope of phosphorus bound to proteins *in vivo*. The proteins were separated by electrophoresis in polyacrylamide gels, excised in the form of millimetre-size cubes and embedded in a resin before analysis by SIMS. A new and simple method of embedding an excised spot (or a part of a band) is described. Quantification and extension of the method to other post-translational modifications are discussed.

Introduction

Several hundred kinases are known to exist in animals [Hanks and Hunter, 1995; Hunter and Plowman, 1997; Smith *et al.*, 1997] and plants [Hardie, 1999]. Phosphorylation of S, T or Y amino-acid side chains of proteins of prokaryotes has also been evidenced [Cortay *et al.*, 1986 ; Freestone *et al.*, 1998]. Apart from a few exceptions, these kinases are pleiotropic proteins that have the ability to phosphorylate a large spectrum of proteins (many of which are involved in various cellular functions); it has been estimated that up to 30 to 50% of the total proteins of a eukaryotic cell can be phosphorylated [Pinna and Ruzzene, 1996]. Phosphorylation may be reversed by several classes of phosphatases [Cohen, 1989 ; Smith and Walker, 1996].

Determining the phosphorylation status of proteins is therefore of major importance for the understanding of a variety of cell functions and activities. Current methods [Rabilloud, 2000] include: immunological detection of phosphorylated proteins after mono- or bi-dimensional electrophoresis and blotting [Glenney *et al.*, 1988; Hunter *et al.*, 1991; Chevallet *et al.*, 1997], labelling cells with radioactive isotopes of phosphorus plus in-gel imaging of phosphorylated proteins [Komatsu and Hosoya, 1996], and in-gel tryptic digestion plus combination of mass fingerprinting with sequence tags [Patterson and Aebersold, 1995; Lahm and Langen, 2000; Soskic and Godovac-Zimmermann, 2001,]. Other Mass Spectrometry (MS) methods of analysis of phosphoaminoacids that do not rely on a previous electrophoretic separation of the proteins have been described [Zhou *et al.*, 2001].

The aim of the work presented here was to develop a MS method for protein phosphorylation detection after a gel electrophoresis separation that necessitated neither previous in-gel digestion nor (electro)blotting of the proteins. We therefore investigated a method based on Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS) that combines the high sensitivity of detection and the quantification potential of MS with the simple preparation of pieces of gels. To evaluate the method, we used a test system in which phosphorylated casein (the positive control) and unphosphorylated pI markers (the negative control) were migrated in different lanes in a standard SDS-PAGE. These proteins were then excised from the gel as millimetre-sized cubes and analysed by SIMS. We show here that the phosphorus content of a protein present in an excised piece of gel may be easily determined using a SIMS microanalytical procedure provide it is performed on a thin section of gel that has been embedded previously in a methacrylic resin. We describe a new protocol for the simple and

rapid embedding of polyacrylamide gel pieces in resin and compare it with standard embedding protocols. We also apply the SIMS method to study the transient phosphorylation of a flax protein separated in a 2-DE.

Material and Methods

Gel electrophoresis and embedding gel pieces in a resin

Phosphorylated casein (Sigma) and unphosphorylated pI markers (Pharmacia) were allowed to migrate in different lanes in the same gel according to the standard SDS-PAGE protocol [Laemmli, 1970]. Briefly, 10 μ L of a 1 mg/mL protein solutions were deposited in separate wells formed in a 10 % polyacrylamide gel. Electrophoresis was carried out with a standard Laemmli buffer (Tris, SDS, glycine) with a current of 10 mA during 2 h. After staining with acidic Coomassie blue, the major band in each lane was excised and divided into several parts, typically 1 mm³ in volume (excision and division were performed underwater using a histological blade).

The key step of the preparation is to use a hydrophilic polymerisable monomer mixture for dehydrating the unfixed gel piece, instead of alcohol or acetone, as performed in standard procedures. Dehydration with alcohol or acetone produces extensive shrinking that then prevents an adequate infiltration of the gel piece with the polymerisable monomer. Incomplete and non-uniform polymerisation results from inadequate infiltration. Here, we used a mixture (85/15 % v/v) of HEMA and EGDMA (Sigma). The HEMA/EGDMA mixture is hydrophilic enough to dissolve water. Shrinking also occurs during this dehydration but it does not affect the subsequent polymerisation since the water is replaced in one step by a polymerisable monomer. A piece of gel was put into contact with 1 mL of the HEMA/EGDMA mixture during 3 h at 4°C. After renewing the HEMA/EGDMA mixture, dehydration was continued for 12 h at 4°C. The dehydrated gel piece was inserted into a gelatine capsule for electron microscopy (Agar) that was then filled with LR White histologic resin (London Resin). Polymerisation was carried out at 60°C during 24 h as recommended by the manufacturer. LR White is perfectly miscible with the HEMA/EGDMA. It is, however, difficult to estimate to what extent it penetrates the gel sample because of the extensive shrinking of the latter. Nevertheless it copolymerises with the HEMA/EGDMA mixture and this permits a continuity between the crosslinked HEMA macromolecular network formed inside the gel piece and the external LRW resin. Samples embedded with this protocol are easily sectioned using standard procedures (see below).

This new gel dehydration-embedding method was compared to a standard procedure (used for histological preparations). Dehydration and infiltration by LR White resin (LRW) was performed very progressively in a series of ethanol-water-resin-mixtures : (alcohol 10%, 2 h), (alcohol 20%, 12 h), (alcohol 40%, 3 h), (alcohol 60%, 3 h), (alcohol 80% + LRW (3/1), 3 h), (alcohol 90% + LRW (3/1), 12 h), (alcohol 96% + LRW (3/1), 5 h), (alcohol 96% + LRW (1/1), 5 h), (alcohol 96% + LRW (1/3), 12 h), (pure LRW, 5 h), (pure LRW, 5 h), (pure LRW, 12 h), (pure LRW, 5 h), (pure LRW, 5 h), (polymerisation 24 h at 60°).

To test the method of progressive infiltration, we used excised spots from 2-DE gels of flax (*Linum usitatissimum* L.) proteins. Flax seedlings were grown in a culture room at (22 ± 1)°C under continuous artificial light (32 μmol·m⁻²·s⁻¹ intensity), except for a 3 day period of germination in the dark. The culture medium was a slightly modified standard Homès medium. Each batch of approximately 200 flax seeds was grown in its own culture box. Polystyrene culture boxes (Sercobox, Polylabo) and polypropylene meshes (Scrynel, Polylabo) were used. Seeds were placed on polypropylene meshes fitted on the top of each box and the nutrient medium was brought into contact with them (days 1 and 2) to allow germination. The seedlings were then left to grow for a further 3 days *in situ*. On day 6, the seedlings were transferred to another culture box. This treatment is a stress for the plants [Verdus et al., 1997] (seedlings from a separate batch were not transferred and were used as a negative control). Seedlings were then harvested 5, 10, 30, 60 and 120 minutes after their transfer to the second culture box and protein extraction and 2-DE separation were performed as described elsewhere [Tafforeau et al., 2002]. Gel pieces containing the spot of a 57 kDa protein (the pI of this protein was 6.17 in control gels) were excised from 2-DE gels obtained with proteins extracted from seedlings harvested at the different times.

SIMS analysis

Sectioning of the resin embedded gel pieces was performed using a diamond knife mounted on an ultramicrotome Ultracut S (Leica, Wetzlar, Germany). For SIMS imaging, 1 to 2 μm thick sections were mounted in tight contact with the surface of finely polished stainless steel stubs; this was carried out by transferring a section onto the surface of a micro-drop of ultra pure water (MilliQ, Millipore, St-Quentin en Yvelines, France) deposited on the stub. The water droplet was immediately dried (a few seconds) using a hot plate at 60 °C. The stubs with their adherent sections were stored under vacuum until they were used for SIMS analysis.

SIMS analysis was carried out using a CAMECA IMS 4f ion analyser (CAMECA, Courbevoie, France). SIMS is a standard microanalytical and imaging technique used in physics [Hussain and Larachi, 2001; Yamamoto et al., 2001; Gammer et al., 2002] and biology [Thellier et al., 1993, 2001]. Briefly, it consists of bombarding a solid specimen held in a high vacuum (here a thin section of a resin-embedded gel piece) with a beam of accelerated ions (primary ions) a few keV in energy. The physical interactions between the incident primary ions and the specimen surface involve complex processes of chemical-bond breaking and atom recombination with the consequence that the most superficial atomic layers of the solid are sputtered, at least in part, as monoatomic or polyatomic ions (the secondary ions). These are collected, sorted using a high performance mass spectrometer and used either to build images of their distribution over the sample surface (SIMS microscopy) or to carry out a MS analysis of the sputtered microvolume. In the so-called quasi-static regime, the primary beam erodes the sample surface very slowly (typically 1 nm/min). Under these conditions, the selected secondary ions issuing from a very small (less than 1 μm^2) bombarded area of the sample surface are counted using an appropriate device (electron multiplier) and the obtained value is stored in the memory of a computer. The beam is rastered over the surface of the sample, thus producing a 256 \times 256 pixels scanning digital image. In the so-called dynamic regime, the primary beam erodes the sample surface at a typical rate of 1 μm in a few minutes; in-depth analysis may therefore be performed. This allows gradients of a chemical species just beneath the sample surface to be determined with an excellent in-depth resolution (of the order of 1 nm in a homogeneous material). Sensitivity is high and detection limits are in the ppm range for most of the elements. Mass resolution is also high. A mass resolution at the value of 2000 means that two secondary ions with masses, m' and m , differing by only $m/2000$, are discriminated; this is achieved in the IMS 4f without drastic loss of the spectrometer transmission.

The analytical parameters of the SIMS used here were as follows. Primary ions: Cs^+ (these enhance the emission of negative secondary ions); energy of the primary beam: 10 keV; primary current: 2.5 nA; analysed area: 400 \times 400 μm ; contrast aperture: 400 μm ; field aperture: 750 μm ; mass resolution better than 2500. The secondary currents were measured using the "Isotope program" of the IMS 4f; after stabilisation, the currents were measured during 5 minutes and the mean values were calculated. The primary current value was chosen in order to have a total phosphorus current of the order of 1000 counts/s (high statistical counting precision). ^{12}C , ^{16}O and $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ masses (negative ions) were acquired simultaneously with ^{31}P .

Results

Sample characterisation

Embedding of the gel piece before SIMS microanalysis complicates and lengthens the determination of protein phosphorylation. We tried, instead, to simply use air- and oven-dried gels deposited on gold or stainless steel holders. This invariably resulted in strong electrical charging during SIMS analysis and results, when obtained at all, were difficult to reproduce (data not shown). The embedding procedure in a resin permits analysis of very thin samples and avoids the above drawbacks. We also used a standard dehydration protocol that relies on ethanol and/or acetone as used for the analysis of biological tissues. In this case, the dehydration produced an extensive shrinking of the unfixed gel piece that almost prevented the subsequent resin infiltration in the gel and resulted in a non-homogeneous sample that was difficult to section; again, results were difficult to reproduce (data not shown). However, an acceptable sample could be obtained if embedding was very gradual but this required 6 days. The new, simple protocol that we have developed is much quicker (2 days) and gives reproducible results very similar to those obtained with the gradual embedding protocol. Figure 1 is a SIMS image, obtained in the scanning mode, of a gel piece (control gel) embedded with this new protocol. The carbon and oxygen images show a fairly homogeneous sputtering of the sample surface. The nitrogen (mainly coming from the acrylamide) is imaged as usual in the form of $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ ion [e.g. Gojon et al., 1996]; this image (lower left part of Figure 1) shows a clear-cut separation between the gel piece (upper part of the image) and the LR White resin. This gives evidence of the continuity of the macromolecular networks from inside to outside of the gel, as stated in the Materials and Method section. A faint phosphorus contamination of the control gel is also visible in Figure 1 (lower right part of the Figure). This suggests that a further purification of the acrylamide would be useful.

Phosphorus content measurements with the test system

Phosphorus in SIMS analysis may be detected as $^{31}\text{P}^-$ ion. Quantitative comparison of the P^- count values obtained with different measurements (or images) corresponding to different samples is not directly feasible because of matrix and strong topographical effects [Thellier et al., 1993]. This means that for a given phosphorus concentration in a sample and for a given primary current density (current intensity per unit area) the secondary current of the analysed phosphorus may vary for one or even several orders of magnitude. To solve this

problem, a normalisation procedure must be used. It consists in choosing an internal reference that is generally an element with a fairly uniform and constant concentration in the different samples. Calculation of the ratio of the measured secondary current of phosphorus to that of the internal reference gives a value (the normalised phosphorus current) that is independent of the matrix and topographical effects provided these affect both currents in a similar manner. ^{12}C is known to be a convenient internal reference for organic matrices and biological samples [Fragu et al., 1988; Follet-Gueye et al., 1998]. A measured normalised phosphorus current at 10^{-3} means that the phosphorus (^{31}P) current is 1000 times lower than the ^{12}C current. Hence the normalised current is proportional to the ^{31}P concentration.

We estimated from the staining intensities that the two bands corresponding to casein and the pI markers contained a similar amount of protein (data not shown). Thus a difference between the normalised phosphorus currents reflects a difference in phosphorylation status of the proteins. We measured the normalised phosphorus current for: 1) the positive control (casein), 2) the negative control (pI markers), 3) the control gel (no protein in polyacrylamide), 4) embedding resin in contact with the gel containing casein, 5) embedding resin in contact with the gel containing pI markers and 6) pure embedding resin that had never been in contact with a polyacrylamide gel and that had been polymerised in a separate batch. We found mean value \pm standard error and (number of replicates) as, respectively: 1) $1.18 \cdot 10^{-3} \pm 0.32 \cdot 10^{-3}$ (4), 2) $5.3 \cdot 10^{-5} \pm 1.9 \cdot 10^{-5}$ (4), 3) $2.5 \cdot 10^{-4} \pm 0.6 \cdot 10^{-4}$ (9), 4) $4.2 \cdot 10^{-5} \pm 0.28 \cdot 10^{-5}$ (3), 5) $0.99 \cdot 10^{-5} \pm 0.4 \cdot 10^{-5}$ (3) and 6) $0.57 \cdot 10^{-5} \pm 0.46 \cdot 10^{-5}$ (4). Taken together these results show that the background level of the normalised phosphorus current is of the order of 10^{-5} . This value that could certainly be lowered by further purification of the chemicals used in the electrophoresis experiments. This is especially true for the control gel where the P level is comparable to that of the negative control. The presence of phosphorus in a protein contained in a gel band is easily detected (the normalised phosphorus current is here of the order of 10^{-3}). Therefore, even in the case of the experiments reported here, *i.e.* without any previous extensive purification of the chemicals, the concentration of the phosphorylated protein could have been lowered by a factor 50 to 100 and detection of a phosphorus level above that of the background would have remained possible. This result shows that the method has the potential to analyse the phosphorus status of minor proteins in gels an analysis which may be beyond the capacity of standard methods.

Determination of the kinetics of phosphorylation of a flax protein

Figure 2 shows the normalised phosphorus signal of the flax 57 kDa protein (see Materials and Methods) as a function of the time elapsed between the transfer of the seedlings and the protein extraction. All 2-DE gels were loaded with the same total amount (30 μg) of proteins; the concentration of the protein at the different times is therefore similar in the excised spots. Clearly, the shift toward a lower pI at times 5 and 10 minutes (visible in the gel areas shown in the lower part of Figure 2) is correlated with a significant increase in the normalised phosphorus current. This suggests that the temporary pI shift is due to a temporary phosphorylation of the protein.

Discussion

SIMS is a costly technique and it is clear that the use of conventional SIMS ion analysers is justified only for investigations that explore the possibility of coupling this technique with electrophoretic separation methods for proteins and other macromolecules. Provided such investigations are successful, the design and development of dedicated instruments may be anticipated.

Alternative preparation methods must also be investigated. Proteins might be extracted from the pieces excised from the gel or transferred to another support before SIMS analysis. Nevertheless, these operations, like the embedding procedure used here, are time-consuming and the risk of protein loss or modification may be an important factor. These alternative methods must therefore be compared carefully with the simple direct embedding of a gel piece.

Absolute quantification in SIMS is not straightforward; *i.e.* measurement of the intensity of a secondary ion does not permit the concentration of the species that produces this ion (the generative species) to be determined. Ratios of the currents of 2 secondary ions are, however, accurately proportional to the concentration ratios of the 2 corresponding generative species. Therefore, phosphorus may not only be detected qualitatively but it may be determined quantitatively relative to the amount of the protein. To perform this quantification, however, a secondary signal is needed that is specific for the protein and not for an other component of the embedded gel. A variety of technical solutions, based on the endogenous or exogenous labelling of the proteins with stable isotopes, may be envisaged and work toward this goal is currently in progress in our laboratory.

Many other post-translational modifications of proteins might be studied without altering the method described in this paper. SIMS can detect the isotopes of almost all the elements. Therefore, isotope-labelling of the chemical group transferred to a protein during a post-translational modification should allow us to detect the presence or the absence of this group in a protein contained in a spot. This method requires the *in vivo* transferred group to be specifically labelled (as with any other MS-based method) And evidence that a protein has been subjected to a post-translational modification is given by the direct detection of a labelled atom and not, as in other methods, by the difference between the masses of modified and unmodified peptides. Sensitivity is therefore higher, indeed, the main limitation to this sensitivity is due to the difficulty of obtaining very high purity chemicals that are needed to lower the background level of the isotope to be analysed.

References

- Chevallet M., Procaccio V., Rabilloud T. (1997) A nonradioactive double detection method for the assignment of spots in two-dimensional blots. *Anal. Biochem.* **251**, 69-72.
- Cohen P. (1989) Structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* **58**: 453-508.
- Cortay J. C., Rieul C., Duclos B., Cozzone A. J. (1986) Characterization of the phosphoproteins of *Escherichia coli* by electrophoretic analysis. *Eur. J. Biochem.* **159**: 227-237.
- Follet-Gueye, M.L.; Verdus, M.C.; Demarty, M.; Thellier, M.; Ripoll, C. (1998) Cambium preactivation in beech correlates with a strong temporary increase of calcium in cambium and phloem but not in xylem cells. *Cell Calcium* **24**, 205-215.
- Fragu P, Briancon C, Halpern S, Larras-Regard E. (1988) Changes iodine mapping rat thyroid during the course of iodine deficiency: imaging and relative quantification by analytical ion microscope. *Bio Cell* **62**: 145-155.
- Gammer, K.; Gritsch, M.; Peeva, A.; Kögler, R.; Hutter, H. (2002) SIMS investigations of gettering centers in ion implanted and annealed silicon. *J. Trace Microprobe Techn.* **20**, 47-55.
- Glenney J.R. Jr, Zokas L., Kamps M.P. (1988) Monoclonal antibodies to phosphotyrosine. *J. Immunol. Meth.* **109**, 277-285.
- Gojon A., Grignon N., Tillard P., Massiot P., Lefebvre F., Thellier M., Ripoll C. (1996) Imaging and microanalysis of ¹⁴N and ¹⁵N by SIMS microscopy in yeast and plant samples. *Cell. Mol. Biol.* **42** : 351-360.
- Hanks S. K., Hunter T. (1995) The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**:576-596.
- Hardie D. G. (1999) Plant protein serine/threonine kinases: classification and functions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **50**: 97-131.
- Hunter T. (1991) Protein kinase classification. *Meth. Enzymol.* **200**, 3-37.
- Hunter T., Plowman G. D. (1997) The protein kinases of budding yeast : six score and more. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 18-21.
- Hussain, S.T.; Larachi, F. A. (2001) Combined HREELS and SSIMS Study of CO Adsorption on Ag/Ru and Pd/Ru Surfaces. *J. Trace Microprobe Techn* **19**, 199-209.
- Komatsu s., Hosoya H. (1996) Phosphorylation by MAPKAP kinase 2 activates Mg(2+)-ATPase activity of myosin II. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **223**, 741-745.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lahm H-W., Langen H. (2000) Mass spectrometry: a tool for the identification of proteins separated by gels. *Electrophoresis* **21**, 2105-2114.
- Norris V., Freestone P., Grant S., Toth I., Trinei M., Le Sceller L., Nystrom T., Oshima A., Onoda T. (1998) Tyrosine phosphorylation in *Escherichia coli* has implications for the manipulation of intracellular signalling and structure in antibacterial therapies: the Jekyll and Hyde approach. *Emerg. Therap. Targets* **3**: 89-92.
- Pinna L. A., Ruzzene M. (1996) How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim. Biophys. Acta* **1314**: 191-225.
- Rabilloud T. (2000) Detecting proteins separated by 2-D gel electrophoresis. *Anal. Chem.* **72**, 48A-55A.
- Smith C. M., Shindyalov I. N., Veretnik S., Gribskov M., Taylor S. S., Ten Eyck L. F., Bourne P. E. (1997) The protein kinase resource. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 444-446.
- Smith R. D., Walker J. C. (1996) Plant protein phosphatases. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 101-125.

- Soskic V., Godovac-Zimmermann J. (2001) Improvement of an in-gel tryptic digestion method for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry peptide mapping by use of volatile solubilizing agents. *Proteomics* **1**, 1364-1367.
- Tafforeau M., Verdus M-C., Charlionet R., Cabin-Flaman A., Camille Ripoll. (2002) 2D-electrophoresis investigation of short-term response of flax seedlings to a cold shock. *Electrophoresis* (sous presse).
- Thellier M, Ripoll C, Quintana C, Sommer F, Chevallier P, Dainty J. (1993) Physical methods to locate metal atoms in biological systems. *Meth. Enzymol.* **227**, 535-586.
- Thellier, M.; Dérue, C., Tafforeau, M.; Le Sceller L.; Verdus, M.C.; Massiot, P.; Ripoll, C. (2001) Physical methods for in vitro analytical imaging in the microscopic range in biology, using radioactive or stable isotopes. *J. Trace Microprobe Techn.* **19**, 141-160.
- Verdus M.C., Thellier M., Ripoll C. (1997) Storage of environmental signals in flax. Their morphogenetic effect as enabled by a transient depletion of calcium. *Plant J.* **12**, 1399-1410.
- Yamamoto, H.; Saito T., Asaokah, H. (2001) Strongly enhanced secondary ion emission by molecular ion irradiation. *J. Trace Microprobe Techn.***19**, 571-579.
- Zhou H., Watts J.D., Aebersold R. (2001) A systematic approach to the analysis of protein phosphorylation. *Nature Biotech.* **19**: 375-378.

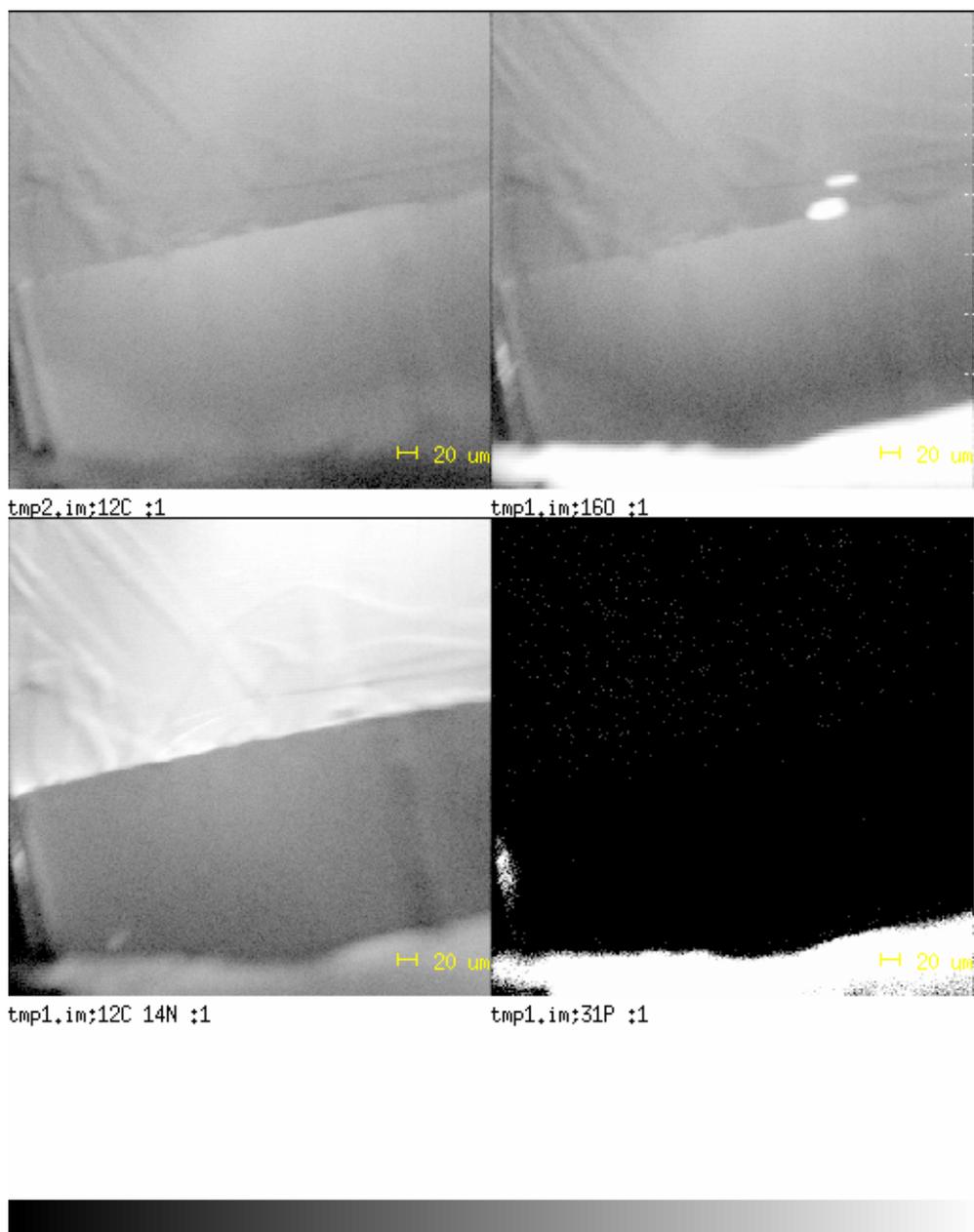


Figure 1. Scanning SIMS images of an embedded control gel sample. Upper left image, $^{12}\text{C}^-$; upper right, $^{16}\text{O}^-$; lower left $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$; lower right, $^{31}\text{P}^-$. The format of the images is 256×256 pixels; field of view $500 \times 500 \mu\text{m}$; acquisition time: ^{12}C , ^{16}O and $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ 300 s, ^{31}P 900 s; 10 keV Cs^+ bombardment. Logarithmic grey-level scale (values are cumulated counts during the acquisition time for each image), grey-level 0: 0.1 count, grey-level 255: 1000 counts for ^{12}C , ^{16}O and $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ and 10 counts for ^{31}P .

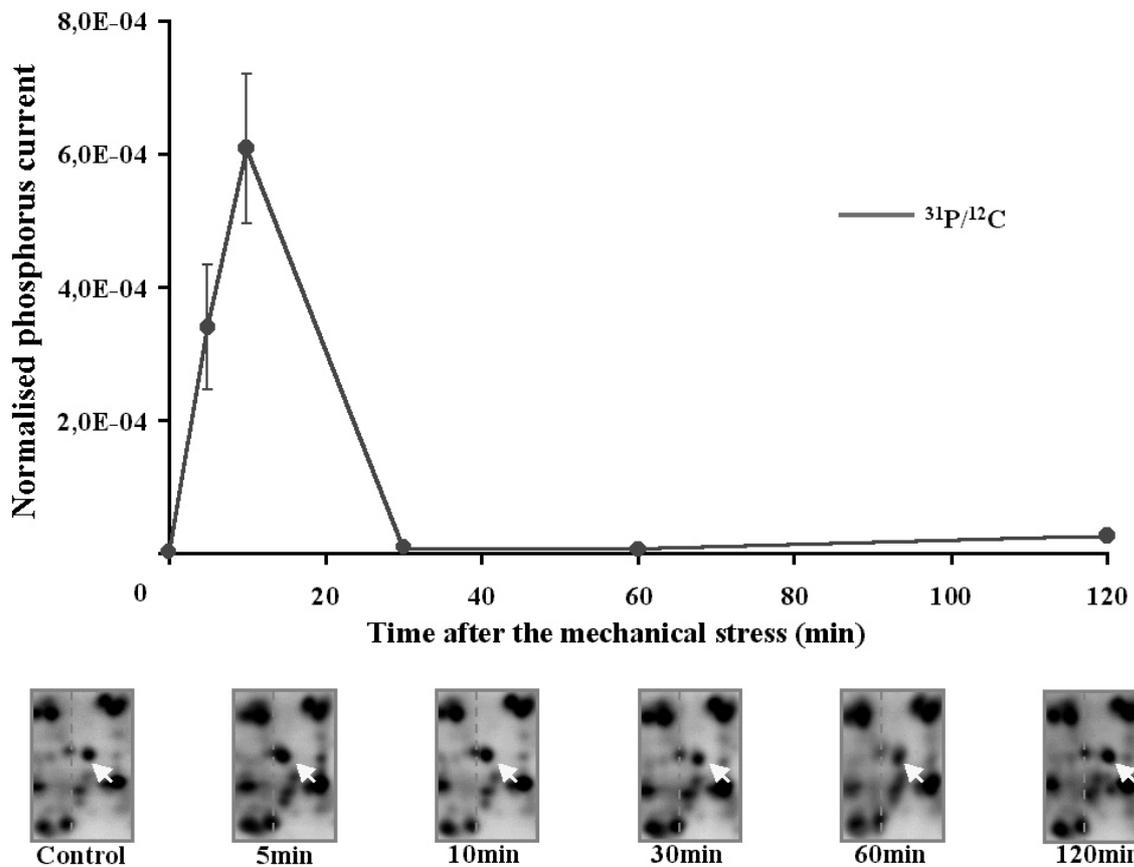


Figure 2. Normalised phosphorus signal ($^{31}\text{P}/^{12}\text{C}$) of a flax 57 kDa protein as a function of the time elapsed between the moment when the flax seedlings were subjected to a brief mechanical stress and that when they were harvested for protein extraction. Proteins were separated by 2-DE. The lower part of the figure shows the gel area containing the studied protein (arrow) at the different times (silver staining). Clearly, the pI (6.17) corresponding to the spot is lowered (the vertical dashed line is to highlight this) at times 5 and 10 min and this is correlated with a substantial increase of the normalised phosphorus signal above the background level.

Publication 3.

Calcium-related epidermal meristem production in flax is induced by cold shock or near-GHz radiation.

J. Trace Microprobe Techn. (sous presse).

Calcium-related epidermal meristem production in flax is induced by cold shock or near-GHz radiation

Marc Tafforeau^a, Marie-Claire Verdus^a, Vic Norris^a, Glenn White^b, Maurice Demarty^a, Michel Thellier^a and Camille Ripoll^{a*}

^a Laboratoire des Processus Intégratifs Cellulaires, UMR CNRS 6037, Université de Rouen, 76821 Mont Saint Aignan Cedex, France,

^b School of Physical Sciences, University of Kent, Canterbury, UK

**Correspondence and Reprints: Camille Ripoll, Laboratoire des Processus Intégratifs Cellulaires, UMR CNRS 6037, Université de Rouen, 76821 Mont Saint Aignan Cedex, France,*

tel: (33) [0]2 35 14 66 83; fax: (33) [0]2 35 14 70 20

e-mail: Camille.Ripoll@univ-rouen.fr

Abstract. Exposing seedlings of the flax, *Linum usitatissimum* L., to a variety of weak environmental stresses plus a 2-day calcium deprivation triggers the common response of production of epidermal meristems in the hypocotyl. Here, we show that the same response was induced by a 1 minute cold shock and the proteome was modified. Epidermal meristem production and similar modifications to the proteome were also induced by a single 2-hour exposure to radiation emitted at 0.9 GHz at non-thermal levels by a GSM telephone. The SIMS study of the distribution of the main inorganic cations in the hypocotyl of control and calcium-deprived seedlings suggest that the plant tends to maintain unchanged the balance of divalent to monovalent cations during the calcium deprivation. This system of using epidermal meristem production in the hypocotyls of flax is well suited to studying the biological effect of low intensity stimuli, electromagnetic radiation included.

Key words: cold shock / GSM telephone radiation / microwaves / flax / meristem / calcium / inorganic ions / SIMS / plants

Abbreviations: CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propane sulfonate; DMP, 2,2-dimethoxypropane; DTE, dithioerythritol; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; GSM, Global System for Mobile communication; SIMS, Secondary Ion Mass Spectrometry; TCA, trichloroacetic acid

1. Introduction

In their natural environment, plants are subjected to a variety of abiotic and biotic stresses such as wind, rain, mechanical contact, drought, thermal stresses, pricking by insects, wounds inflicted by phytophages, and infection by pathogens. These stresses produce cellular signalling events [1-5], such as the triggering of early calcium transients [6-12], that eventually result in a modification of growth rate and/or morphogenesis of the whole plant [13-15].

We have developed an experimental system that is particularly appropriate for revealing the effects of weak environmental stimuli [16, 17]. In this system, week-old seedlings of *Linum usitatissimum* L. var Ariane are subjected to a temporary (typically 2 days) calcium deprivation by replacing the complete growth medium with a calcium-depleted medium (after this depletion the plants are again grown on the complete medium). This results in the production of epidermal meristems in the hypocotyls (typically 20 after 3 weeks), providing the seedlings have previously undergone an exposure to different stresses or stimuli, such as drought or touch, respectively. In control experiments designed to minimise these stresses, the mean number of meristems produced per plant is 10 to 20 times lower than in plants which have been stimulated.

There is increasing concern among the population about possible biological effects of microwaves arising from mobile telephones. Recent studies have shown that a variety of processes occurring in animal systems were either sensitive [18, 19] or not [20, 21] to near-GHz radiation. Similar radiation frequencies, such as those close to 0.9 GHz in Europe, are commonly emitted by GSM telephones. To investigate the possibility that plants may also be affected by exposure to radiation at these frequencies, we used the sensitive experimental system briefly described above. Cold shock is known to involve calcium signalling pathways [6, 9, 11] and preliminary experiments suggested that this would be another abiotic stress leading to meristem production in our system. We reasoned that, in this case, a cold shock might be a useful positive control for exposure to radiation from GSM telephones. We report below how irradiation of flax seedlings from a GSM telephone induced a meristem production comparable to that induced in seedlings subjected to a brief cold shock. We have complemented this investigation : i) by SIMS imaging of the inorganic cations in the hypocotyl of flax seedlings subjected or not to calcium deprivation and ii) at the molecular level, by comparing the effects of cold shock and GSM telephone radiation on the hypocotyl proteome.

2. Materials and Methods

2.1. Plant growth and calcium deprivation

Plants were grown in a culture room at $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ under continuous artificial light ($32 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ intensity), except for a 3 day period of germination in the dark. The culture medium, slightly modified from the standard Homès medium, contained the macronutrients (mM) KNO_3 6.92; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2.33; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.62 and $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.18 and the micronutrients (μM) $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ 6.86; $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0; $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.04; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03; $\text{Fe}^{3+}\text{EDTA}$ 51.0 and H_3BO_3 27.33. Each batch of approximately 200 flax seeds was grown in its own culture box. Polystyrene culture boxes (Sercobox, Polylabo) and polypropylene meshes (Scrynel, Polylabo) were used.

Two series of experiments were performed; the first began on 5th May 2001 and the second on 22nd June 2001. Seeds were placed on polypropylene meshes fitted on the top of each box and the nutrient medium was brought into contact with them (days 1 and 2) to allow germination. The seedlings were then left to grow for a further 3 days *in situ*. On day 6, separate batches of seedlings were used for different treatments (see below): i) a 2 h irradiation using a GSM telephone, ii) a 1 min cold shock and iii) no treatment. After each of these treatments, several batches were used to perform protein extraction and analysis (see below) and other batches were subjected to a temporary calcium deprivation to induce the formation of meristems (note that proteins were only extracted from seedlings that had not been subjected to a calcium deprivation). To perform the temporary calcium depletion, the complete medium was substituted during days 7 and 8 (or 7, 8 and 9 for SIMS imaging) by a calcium deprived medium. The seedlings were then left to grow on the complete medium until day 29. In the calcium-deprived medium, calcium was replaced by potassium and the concentrations of nitrate, sulphate and phosphate were kept to the same value as in the complete medium. The variations in the total osmolarity and ionic strength were thus negligible. The medium was renewed every 2 days throughout the experiment. To count meristems, 10 seedlings were taken at random from each of the batches (on days 9, 11, 12, 13, 15, 18, 20, 22, 25, 27, 29) and immediately plunged in 50 % (v/v) aqueous ethanol, where they were left for 24 h or longer, they were then transparent enough to allow counting of the epidermal meristems using a Leica DMRB light microscope. Only meristems comprising at least 4 newly divided cells were counted.

2.2. Plant treatments

Seedlings were irradiated for 2 h on day 6 using a GSM telephone (Nokia 7110) mounted above them (at 17 cm from the mesh) without using metal. Low intensity sound was delivered to the telephone microphone just sufficient to maintain emission from the telephone and this assembly was wrapped in laboratory wiping paper to prevent acoustic and light emission. With these conditions, the telephone emitted at full broadcast strength continuously throughout the 2 h exposure. After the 2h irradiation, the seedlings on the meshes were either immediately used for protein extraction or left in place for meristem production as explained above.

To carry out the cold shock treatment, on day 6, the seedlings plus meshes were carefully removed from the boxes and transferred for one minute to the top of another box containing cold (4 °C) complete growth medium into which the roots were plunged. After this cold shock treatment, the meshes were replaced on their original boxes (at 22 °C) either for 120 min, after which the seedlings were used for protein extraction, or until day 29 in the case of meshes used for meristem production.

2.3. SIMS measurements

Sample preparation

A few flax seedlings were sampled and they were fixed and dehydrated according to the “vapour phase” technique [22]. Entire flax seedlings were introduced into a 250 mL glass vessel containing 10 mL of a 90% acrolein solution. The seedlings were fixed (4 h) in the vapour phase above the liquid acrolein. The acrolein was then pumped out of the vessel and replaced by 10 ml of 2,2-dimethoxypropane (DMP) acidified with a drop of concentrated HCl. The DMP vapours diffusing into the seedlings react with the sample water to give methanol and acetone (the reaction being catalysed by the protons provided by the diffusion of HCl), hence dehydrating the sample without any contact with a liquid phase. After 30 min the acidified DMP was renewed and the seedlings were allowed to remain in contact with DMP vapours for 60 additional min. After complete dehydration the seedlings were rapidly removed from the vessel and dipped into liquid propylene oxide at room temperature. Small fragments of seedling roots and hypocotyls were cut under propylene oxide. They were progressively embedded in Spurr’s resin: 50% resin in propylene oxide (4h), 75% (15h), 100% (pure resin was renewed 3 times a day during 2 days). Polymerisation was carried out at 60°C (24 h) in standard silicone moulds. Dry sections (approximately 2 µm in thickness) were

cut using a diamond knife (Diatome, Biel, Switzerland) mounted on an ultramicrotome (Leica, Ultracut S, Rueil Malmaison, France). The sections were collected using an eyelash and attached under dry conditions onto polished stainless steel rods using a double faced adhesive carbon base disk. The stainless steel rods supporting the sections were stored under vacuum before use.

SIMS imaging

SIMS analysis was carried out using a CAMECA IMS 4f ion analyser (CAMECA, Courbevoie, France). SIMS is a standard microanalytical and imaging technique used in physics [23-25] and biology [26]. Briefly, it consists of bombarding under high vacuum a solid specimen (here a thin section of a resin-embedded hypocotyl sample) with a beam of accelerated ions (primary ions) a few keV in energy. The physical interactions between the incident primary ions and the specimen surface involve complex processes of chemical-bond breaking and atom recombination, with the consequence that the most superficial atomic layers of the solid are sputtered out, at least in part, as monoatomic or polyatomic ions (the secondary ions). These secondary ions are collected and dispersed using a high performance mass spectrometer which enables the selection of the secondary ions under study. The selected secondary ions issuing from the bombarded area (less than $1 \mu\text{m}^2$ in the scanning mode) of the sample surface are counted using an appropriate device (electron multiplier) and the obtained value (i.e. the signal) is stored in the memory of a computer. The beam is rastered over the surface of the sample, thus producing a 256×256 pixels scanning digital image. Finally, the images are edited using grey-level or false-colour scales. The detection limit of the SIMS method is of the order of a few ppm for any isotope of most elements. This method is also characterised by an excellent mass resolution, which makes it possible to get rid of most problems of mass interference. In our present experiments, we have set the mass resolution at the value of 2000 (which means that two secondary ions with masses, m' and m , differing by only $m/2000$, were discriminated). Under such conditions, although there was an intense emission of organic interfering polyatomic ions (for instance $^{12}\text{C}_2^+$ interferes with $^{24}\text{Mg}^+$), it was possible to map specifically the distribution of the isotopes $^{23}\text{Na}^+$, $^{24}\text{Mg}^+$, $^{39}\text{K}^+$, $^{40}\text{Ca}^+$ in the flax hypocotyls under study. Matrix effects [27] and topographic effects were corrected using normalisation to carbon (i.e. calculation of the ratio of the secondary current of a given cation isotope to the current of ^{12}C chosen as an internal reference) as explained elsewhere [28]. The primary ions used were O_2^+ , 15 keV in energy. The lateral resolution in the images was approximately $0.3 \mu\text{m}$.

2.4. Protein extraction and 2-D electrophoresis

The meshes and the seedlings used for protein extraction, carried out according to [29, 30], were removed from their boxes and rapidly thrown into a polystyrene box containing liquid nitrogen into where the seedlings were frozen. The frozen plants were then transferred at -20°C and the hypocotyls were severed, crushed in liquid nitrogen and then homogenised with 10% TCA (trichloroacetic acid) and 0.07% 2- β -mercaptoethanol in cold (-20°C) acetone [19, 20]. Proteins were allowed to precipitate one hour at -20°C . After a 10 min centrifugation at 6,000g at 4°C , the pellets were washed twice with cold acetone containing 0.07% 2- β -mercaptoethanol for one hour at -20°C . The pellets were vacuum-dried during a night at -20°C and dissolved in 70 μL per mg of dry matter of an extraction buffer (urea 9,5 mol/L, DTE 50 mmol/L, CHAPS 5%, spermine base 25 mmol/L, 4% polyvinylpyrrolidone, and a trace of bromophenol blue) for one hour on a shaker. After a 30 min centrifugation at 200,000 g at 15°C , the protein concentrations were determined using the Bradford Protein Kit Assay (Bio-Rad).

Two-dimensional electrophoresis was adapted from O'Farrell [31]. Strips (IPG, Bio-Rad) 17 cm in length, with immobilised ampholytes to give a linear pH gradient in the range 5-8, were used to perform the first dimension electrophoresis in a Protean IEF Cell unit (Bio-Rad). The second dimension electrophoresis was performed on a 10% polyacrylamide gel. After silver staining [32], gels were scanned using an optical scanner with transparency adapter (Umax) at 300 dpi and analysed with the Melanie III software (Bio-Rad).

The pI of the proteins was estimated with the Melanie III software (Bio-Rad) and the significance of the differences observed after the different treatments were determined using a threshold criterion [33] to take into account the inherent variability of the 2-D electrophoresis [34]. Briefly, the threshold was obtained from the spot co-ordinates (MW, pI) of 71 proteins randomly chosen for their apparent relative immobility on 16 gels (extracts from several independent experiments were analysed). 50 of these proteins were used as a reference (by assigning a fixed pI value to them) to evaluate the artefactual variability in pI of the other 21 proteins. This gave the maximum ΔpI value that was not considered as significantly (95% confidence) different from zero. The threshold was set at three times this maximum value. Differences in the position of spots were taken to be significant if they exceeded this threshold on every occasion analysed (2 gels for each of the 3 or more independent experiments per treatment).

3. Results

3.1. Meristem production after cold shock or radiation from a GSM telephone

Seedlings that, on day 6, were either given a cold shock or exposed to radiation from a GSM telephone, produced 3 weeks after the end of the calcium deprivation (day 29) an average of 15 or 5 meristems, respectively (Figure 1). In a control in which the calcium deprivation step was omitted, neither treatment led to a significant production of meristems. Other controls included 1) no stress treatment and no calcium deprivation and 2) no stress treatment and a 2-day calcium deprivation; both gave less than an average of 0.5 meristems on day 29. To determine the statistical significance of the observed difference between the different treatments in a same experiment and between the same treatment in separate experiments, SigmaPlot software was used to obtain a non-linear regression of the data from each experiment to a curve generated by a two-parameter exponential equation that corresponded to a heuristic mathematical model. The best regression curve and the corresponding 95 % confidence intervals were computed for each experiment. Only the highest and lowest 95 % confidence curves of those calculated for each separate experiment in a given treatment are shown in Figure 1; the other confidence curves, which lie between these extremes, are not shown. These analyses revealed no significant difference between the results of giving the same treatment in separate experiments. They also confirmed the difference between the results of 2 h irradiation and those of the cold shock and the controls as shown by the absence of an overlap of the areas bounded by the highest and lowest 95 % confidence curves for a given treatment (Figure 1). Mechanical stimulation can induce meristem production in calcium deprivation conditions [16, 17]. Care was therefore taken to ensure that the level of mechanical perturbation in all experiments was as low as in the controls (no treatment). Thus meristem production observed after cold shock of GSM telephone exposure of plants was not due to artefactual mechanical stimulation. To eliminate the possibility of substance release from the culture boxes, a series of experiments (the first series, see Materials and Methods) was done with new boxes whilst a second series was done with boxes that had been used many times previously; the state of the box had no effect. The GSM telephone delivered a mean power density of a maximum of 1 mW/cm^2 at the level of the meshes (estimated from manufacturer's data assuming a 2 W isotropic radiation). We measured, in a separate experiment, the rate of heat dissipation from the culture boxes in the culture room (results not shown) and allowing for this and assuming the conversion of all the

radiant energy incident on the box to heat, the temperature increase in the medium would have been less than 0.2 °C after 2 hours. A thermal effect is thus unlikely.

These results show that flax seedlings respond to the combination of either a 2 h GSM telephone radiation or a 1 min cold shock plus a 2-day calcium deprivation in the same way as they respond to other combinations of a stimulus such as touch, wind or drought plus calcium deprivation, namely, by epidermal meristem production in the hypocotyls [17].

3.2. Ion distributions

Figure 2 shows the scanning SIMS images of the distribution of the isotopes of the inorganic cations ($^{23}\text{Na}^+$, $^{24}\text{Mg}^+$, $^{39}\text{K}^+$, $^{40}\text{Ca}^+$) in the epidermis and cortical tissue of the mid part of a flax hypocotyl 9 days old (it is in this part of the hypocotyl that the epidermal meristems develop). Figure 3 shows a similar area than that showed in Figure 2, but for seedlings that had been subjected to a calcium deprivation from days 6 to 9. Normalisation to carbon permits the quantitative comparison of the images in Figures 2 and 3 and the determination of the variation of the mean ion concentrations induced by calcium deprivation (mean concentration variations were determined taking into account the difference in the tissue surface areas that were visible in the images). This shows that even though the calcium concentration in the culture medium was reduced by a factor of 100, from 2.33 mM to a contamination value of 20 μM (unpublished result), the mean concentration in tissues was only reduced by a factor of 2.5. Almost half of the calcium in these tissues is thus non (or very slowly) exchangeable, probably because it is bound to the cell walls. The total calcium concentration in the cytoplasm may be, however, more substantially lowered than in the walls; but the insufficient spatial resolution of the IMS 4f ion analyser did not permit to give evidence of this (in the cells shown in Figures 2 and 3, the cytoplasm forms a very thin compartment, less than 1 μm in thickness, separating the cell wall and a vacuole that occupies most of the cell volume). Other results of the effect of calcium deprivation on the mean ion concentrations include: i) the Mg concentration is increased by a factor of 1.4 (and thus the Ca/Mg concentration ratio is lowered by 70%), suggesting that at least part of the calcium in the tissues may be replaced by magnesium, ii) the Na concentration is lowered by a factor of 1.6, showing a tendency of the plant to maintain the ratio Ca/Na to a constant value [35] and iii) the K concentration (lowered by a factor of 1.25) is less affected than that of Na. The potassium concentration in the calcium deprived culture medium is, however, 11.58 mM instead of 6.92 mM in the normal medium. Therefore, the decrease in potassium concentration is probably similar to that observed for sodium. Together, these results suggest

that the plant tends to maintain unchanged the balance of divalent to monovalent cations during calcium deprivation.

3.3. Proteome changes

To determine whether the sensitivity of flax to exposure to radiation from GSM telephones is translated into changes in the proteome – and, if so, whether certain of these changes are common to cold shock – we used 2-D gel electrophoresis to separate proteins extracted from flax seedlings given either a 2 h irradiation by the GSM telephone or a 1 min cold shock or ‘no treatment’; the seedlings were *not* deprived of calcium since such deprivation alone results in changes to the flax proteome (unpublished results) that could be confused with responses to irradiation or cold shock. Differences in the distribution of the proteins in these conditions were observed (Figure 4). The pI of the proteins affected was estimated with the Melanie III software (Bio-Rad) and the significance of the differences observed was then determined using a threshold criterion to take into account the inherent variability of the 2-D electrophoresis (see Materials and Methods). The proteins P1, P2 and P3 in Figure 4 satisfy this criterion. In these cases, one spot appeared and another disappeared at a neighbouring location and at the same molecular mass corresponding, for example, to a shift in the pI of a protein. P1 and P2 were shifted towards a lower pI after both the cold shock and the 2 h irradiation whilst P3 was shifted only after irradiation. The most economical interpretation of these results is that these proteins underwent a post-translational modification such as phosphorylation following the particular treatment (although degradation of one protein and synthesis of another cannot be formally excluded). Conceivably, the shifts in the pI of P1 and P2 reflect a post-translational modification common to the responses to cold shock and to the radiation emitted by the GSM telephone. The shift in the pI of P3 would then reflect a protein modification induced by irradiation but not induced by cold shock whilst, reciprocally, other proteins were modified in response to cold shock but not irradiation.

4. Discussion

The system of using epidermal meristem production in the hypocotyls of flax is particularly effective for revealing the transduction of a wide range of low intensity stimuli by seedlings [17]. We have shown that delaying the calcium deprivation step for up to 8 days after a touch stress results in essentially the same response as when the calcium deprivation step is immediately after the touch stress [17]. We interpreted this result as evidence for the

long-term storage of a variety of environmental signals that might help in the generation of an integrated response. Other evidence for ion (Ca)-related signal storage in plants has been reported in *Bidens* [15, 36] and in *Arabidopsis* [37]. The meristem production in response to a brief cold shock, as reported here, is fully in line with this idea of the storage and the subsequent integration of many environmental stimuli to generate an appropriate phenotype. Radiation at 0.9 GHz from GSM telephones is not, however, a feature of the natural environment from which plants have adapted to obtain information. Nevertheless, our results show that, at least in our flax system, plants can also respond to radiation from GSM telephones at non-thermal levels. The similarity between the meristem production in response to stresses, including cold shock, and to exposure to GSM telephone radiation extends past the kinetics of production to cover changes at the level of the proteome. Indeed, a post-translational modification common to cold shock or irradiation is indicated by the shift of proteins P1 and P2 towards a lower pI after either treatment.

The mechanism of the interaction of the GSM telephone radiation with plants is unknown but probably involves signalling pathways, as has been suggested for animal cells exposed to radiation at a similar frequency [19]. A pathway based on calcium might seem an evident candidate since the calcium deprivation step is essential for the response of epidermal meristem production in flax seedlings. However, it should be noted that we observed radiation-induced changes to the proteome even in the absence of the calcium deprivation step.

The 0.9 GHz radiation emitted from a GSM telephone takes the form of pulses with a frequency of 217 Hz [38] and it is therefore formally possible that the flax seedlings actually responded to the frequency of the pulses. Against this, however, it should be noted that the *continuous* irradiation of flax seedlings at 105 GHz from a Gunn oscillator combined with calcium deprivation also led to epidermal meristem production in flax seedlings [Tafforeau et al., in preparation]. The most likely explanation is that plants can be perturbed by low intensity irradiation at a broad range of GHz frequencies. Using a radiation generator at controlled frequencies (including that of GSM telephone) would therefore be useful to check plant sensitivity to radiation over a large spectrum of wavelengths.

It should be emphasised that the results reported here do not show that GSM telephone radiation has an adverse effect on plants. Flax seedlings gently touched or stimulated by wind showed neither a change in growth rate nor an otherwise impaired phenotype; nevertheless, these seedlings developed meristems after they were temporarily deprived of calcium.

Acknowledgements.

We thank Marc Knight, Derek Martin and Ulrich Lüttge for discussions, Gérard Grancher for help with statistics and David Gibouin for SIMS technical assistance. Marc Tafforeau was supported by a fellowship from the Ministère de la Recherche, France.

References

- [1] Jonak, C.; Kiegerl, S.; Ligterink, W.; Barker, P.J.; Huskisson, N.S.; Hirt, H. Stress signaling in plants: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 11274-11279.
- [2] Mizoguchi, T.; Ichimura, K.; Shinozaki, K. Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases. *Trends Biotech.* **1997**, *15*, 15-19.
- [3] Meskiene, I.; Hirt, H. MAP kinase pathways: molecular plug and play chips for the cell. *Plant Mol. Biol.* **2000**, *42*, 791-806.
- [4] Braam, J.; Davis, R.M. Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in Arabidopsis. *Cell* **1990**, *60*, 357-364.
- [5] Braam, J.; Sistrunk, M.L.; Polisenky, D.H.; Xu, W.; Purugganan, M.M.; Antosiewicz, D.M.; Campbell, P.; Johnson, K.A. Life in a changing world: TCH gene regulation of expression and responses to environmental signals. *Physiol. Plant.* **1996**, *98*, 909-916.
- [6] Knight, M.R.; Campbell, A.K.; Smith, S.M.; Trewavas, A.J. Transgenic plant aequorin report the effect of touch and cold shock and fungal elicitors on cytosolic calcium. *Nature* **1991**, *352*, 524-526.
- [7] Knight, M.R.; Smith, S.M.; Trewavas, A.J. Wind induced plant motion immediately increases cytosolic calcium. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 4967-4971.
- [8] Takahashi, K.; Isobe, M.; Knight, M.R.; Trewavas, A.J.; Muto, S. Hypoosmotic shock induces increases in cytosolic Ca²⁺ in tobacco suspension-cultured cells. *Plant Physiol.* **1992**, *113*, 587-594.
- [9] Knight, H.; Trewavas, A.J.; Knight, M.R. Cold calcium signalling in Arabidopsis involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell* **1996**, *8*, 489-503.
- [10] Malhó, R.; Moutinho, A.; van der Luit, A.; Trewavas, A.J. Spatial characteristics of calcium signalling: the calcium wave as a basic unit in plant cell calcium signalling. *Phil. Trans. Royal Soc. London* **1998**, *B 353*, 1463-1473.
- [11] Plieth, C.; Hansen, U.P.; Knight, H.; Knight, M.R. Temperature sensing in plants: the primary characteristics of signal perception and calcium response. *Plant J.* **1998**, *18*, 491-497.
- [12] Mithöfer, A.; Ebel, J.; Bhagwat, A.A.; Boller, T.; Neuhaus-Url, G. Transgenic aequorin monitors cytosolic calcium transients in soybean cells challenged with β -glucan or chitin elicitors. *Planta* **1999**, *207*, 566-574.
- [13] Adams, J. Adventitious shoots on hypocotyl of flax and tomato. *Bot. Gaz.* **1924**, *78*, 461-462.
- [14] Jaffe, M.J. Wind and other mechanical effects in the development and behavior of plants with special emphasis of the role of hormones. In *Encyclopedia of Plant Physiology*; Pharis, R.P., Reid D.M., Eds.; Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, 1985; 444-484.
- [15] Thellier, M.; Le Sceller, L.; Norris, V.; Verdu, M.C.; Ripoll, C. Long-distance transport, storage and recall of morphogenetic information in plants. The existence of a sort of primitive plant « memory ». *C. R. Acad. Sci. Paris (Sciences de la Vie/Life Sciences)* **2000**, *323*, 81-91.

- [16] Verdus, M.C.; Cabin-Flaman, A.; Ripoll, C.; Thellier, M. Calcium-dependent storage/retrieval of environmental signals in plant development. *C. R. Acad. Sci. Paris (Sciences de la Vie/Life Sciences)* **1996**, *319*, 779-782.
- [17] Verdus, M.C.; Thellier, M.; Ripoll, C. Storage of environmental signals in flax. Their morphogenetic effect as enabled by a transient depletion of calcium. *Plant J.* **1997**, *12*, 1399-1410.
- [18] Veyret, B.; Bouthet, C.; Deschaux, P.; de Seze, R.; Geffard, M.; Jousset-Dubien, J.; Le Diraison, M.; Moreau, J.M.; Caristan, A. Antibody Responses of Mice Exposed to Low-power Microwaves under Combined Pulse-and-amplitude Modulation. *Bioelectromagnetics* **1991**, *12*, 47-56.
- [19] De Pomerai, D.; Daniells, C.; David, H.; Allan, J.; Duce, I.; Mutwakil, M.; Thomas, D.; Sewell, P.; Tattersall, J.; Jones, D.; Candido, P. Non-thermal Heat-shock Response to Microwaves. *Nature* **2000**, *405*, 417-418.
- [20] Chagnaud, J.L.; Veyret, B. In Vivo exposure of rats to GSM-modulated Microwaves: Flow Cytometry Analysis of Lymphocyte Subpopulations and of Mitogen Stimulation. *Int. J. Radiat. Biol.* **1999**, *75*, 111-113.
- [21] Chagnaud, J.L.; Moreau, J.M.; Veyret, B. No Effect of Short-term Exposure to GSM-modulated Low-power Microwaves on Benzo(a)pyrene-induced Tumours in rat. *Int. J. Radiat. Biol.* **1999**, *75*, 1251-1256.
- [22] Dérue, C.; Gibouin, D.; Verdus, M.C.; Lefebvre, F.; Demarty, M.; Ripoll, C.; Thellier, M. Appraisal of SIMS applicability to boron studies in plants. *Microsc. Res. Techn.* **2002**, (in press).
- [23] Hussain, S.T.; Larachi, F. A. Combined HREELS and SSIMS Study of CO Adsorption on Ag/Ru and Pd/Ru Surfaces. **2001**, *19*, 199-209.
- [24] Yamamoto, H.; Saito T., Asakah, H. Strongly enhanced secondary ion emission by molecular ion irradiation. *J. Trace Microprobe Techn.* **2001**, *19*, 571-579.
- [25] Gammer, K.; Gritsch, M.; Peeva, A.; Kögler, R.; Hutter, H. SIMS investigations of gettering centers in ion implanted and annealed silicon. *J. Trace Microprobe Techn.* **2002**, *20*, 47-55.
- [26] Thellier, M.; Dérue, C., Tafforeau, M.; Le Sceller L.; Verdus, M.C.; Massiot, P.; Ripoll, C. Physical methods for in vitro analytical imaging in the microscopic range in biology, using radioactive or stable isotopes. *J. Trace Microprobe Techn.* **2001**, *19*, 141-160.
- [27] Thellier M, Ripoll C, Quintana C, Sommer F, Chevallier P, Dainty J. Physical methods to locate metal atoms in biological systems. *Meth. Enzymol.* **1993**; *227*, 535-586.
- [28] Follet-Gueye, M.L.; Verdus, M.C.; Demarty, M.; Thellier, M.; Ripoll, C. Cambium preactivation in beech correlates with a strong temporary increase of calcium in cambium and phloem but not in xylem cells. **1998**, *Cell Calcium* *24*, 205-215.
- [29] Damerval, C.; de Vienne, D.; Zivy, M.; Thiellement, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* **1986**, *7*, 52-54.
- [30] Granier, F. Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **1988**, *9*, 712-718.
- [31] O'Farrell, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 4007-4021.
- [32] Oakely, B.R.; Kirsch, D.R.; Morris, N.R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **1980**, *105*, 361-363.
- [33] Tafforeau, M.; Verdus, M.C.; Charlionet, R.; Cabin-Flaman, A.; Ripoll, C. 2D-electrophoresis investigation of short-term response of flax seedlings to a cold shock. **2002**. *Electrophoresis* (in press).

- [34] Voss, T.; Haberl, P. Observations on the reproducibility and matching efficiency of two-dimensional electrophoresis gels: Consequences for comprehensive data analysis. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 3345-3350.
- [35] Follet-Gueye, M.L.; Demarty, M.; Verdus, M.C.; Ripoll, C.; SIMS imaging of Ca and Na, and effect of the ionic interaction Ca/Na on wall maturation of phloem fibres and xylem cells of hypocotyls of beech seedlings. *C.R .Acad. Sci. Paris, Sciences de la Vie/Life Sciences* **1999**, *322*, 383-392.
- [36] Desbiez, M-O.; Kergosien, Y.; Champagnat, P.; Thellier, M. Memorization and delayed expression of regulatory messages in plants. *Planta* **1984**, *160*, 392-399.
- [37] Knight, H.; Brandt, S.; Knight, M.R. A history of stress alters drought calcium signalling pathways in *Arabidopsis*. *Plant J.* **1998**, *16*, 681-687.
- [38] Hyland, G.J. Physics and biology of mobile telephony. *Lancet* **2000**, *356*, 1833-1836.

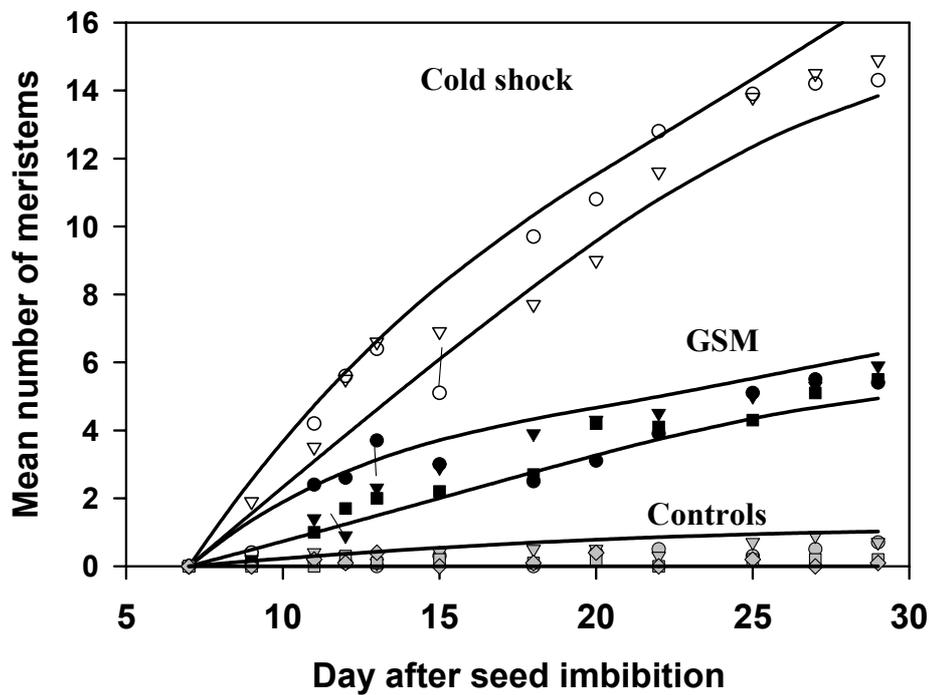


Figure 1. Mean number of meristems per hypocotyl as a function of time. A total of 1760 seedlings were analysed. Each point is the mean of 10 measurements. The points corresponding to a given treatment are open (cold shock), black filled (GSM irradiation), grey filled (controls). Each separate experiment is represented by a different symbol. The lines are the lowest and the highest 95% confidence curves obtained after a heuristic 2-parameter exponential model was fitted to the data using the Levenberg-Marquardt algorithm of the SigmaPlot software. Determination coefficients of the model were between 0.915 and 0.988 for all cold shock and GSM telephone irradiation experiments; for the controls, determination coefficients were lower but the mean number of meristems was less than 0.5 on day 29.

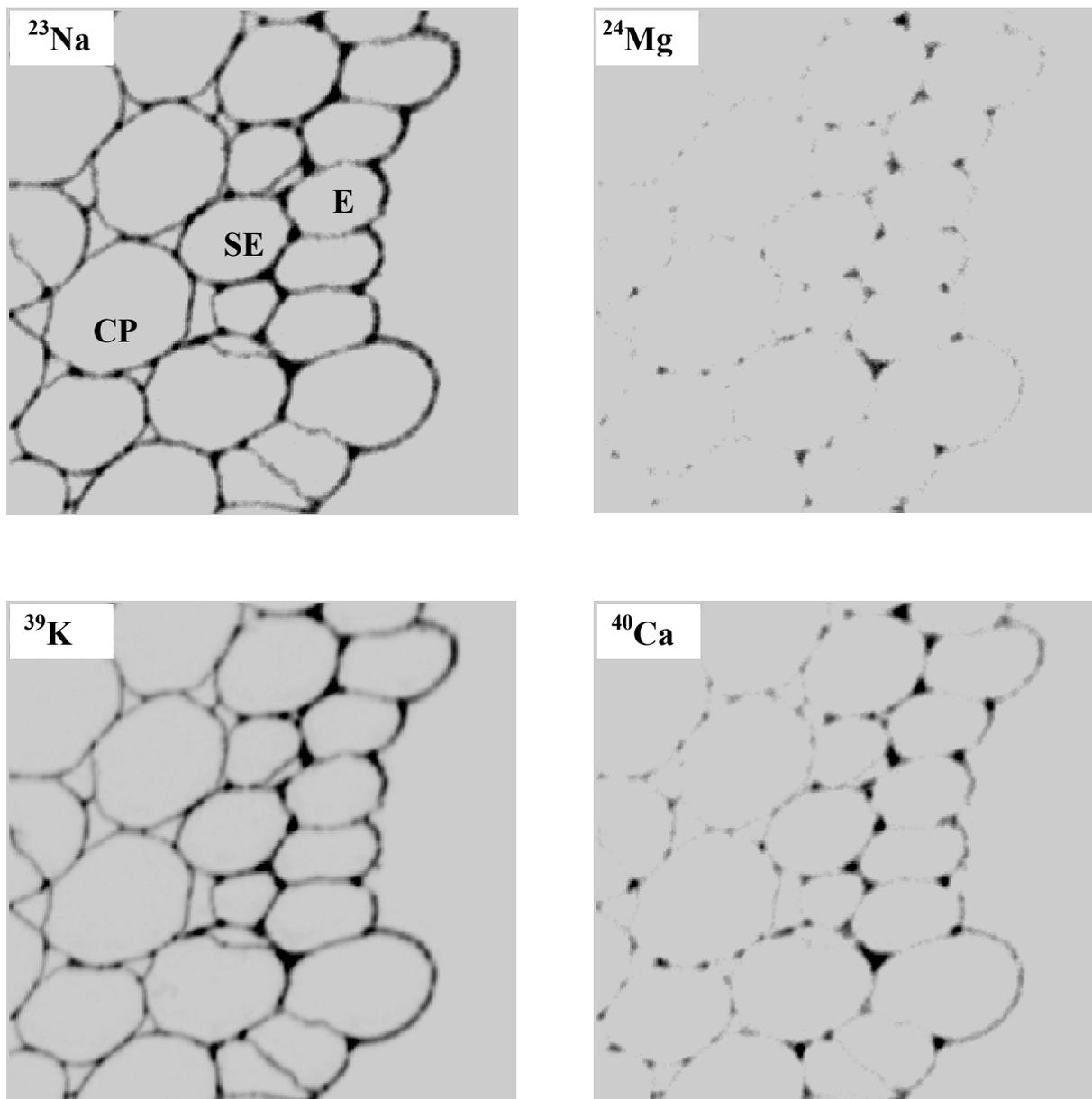


Figure 2. SIMS images (scanning mode) of the isotopes of the inorganic cations ($^{23}\text{Na}^+$, $^{24}\text{Mg}^+$, $^{39}\text{K}^+$, $^{40}\text{Ca}^+$) in the epidermis and cortical tissue of the mid part of a flax hypocotyl 9 days old. The field of view is $100 \times 100 \mu\text{m}$. The acquisition time was 300 s for all cations. Each pixel value has been multiplied by 4.481 in order to give a total count of 497610 during 900 s for the ^{12}C mass, identical to that measured in case of Figure 3 (equalisation procedure). Inverse linear grey-level scale; black is level 255 corresponding to a count value of 451 (for $^{23}\text{Na}^+$), 82 (for $^{24}\text{Mg}^+$), 3317 (for $^{39}\text{K}^+$) and 330 (for $^{40}\text{Ca}^+$). In the image of a given species, the grey level is proportional to the local concentration of this species, but identical grey level values for 2 *different* species do not mean that the concentrations are equal because of SIMS effects (differences in ionisation yield). E: epidermis; SE: subepidermal layer; CP: cortical parenchyma.

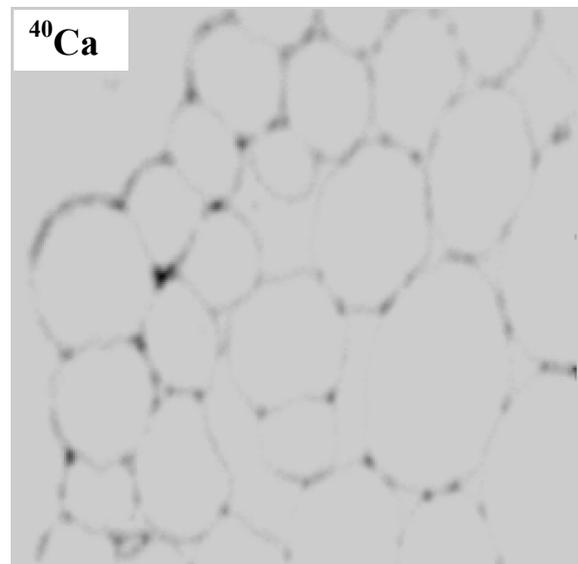
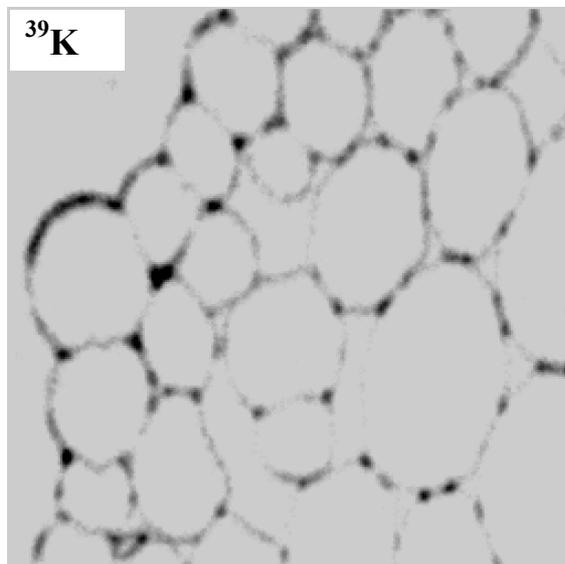
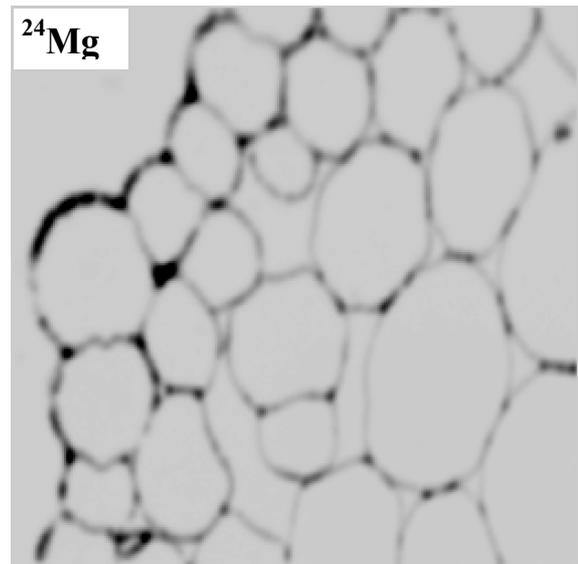
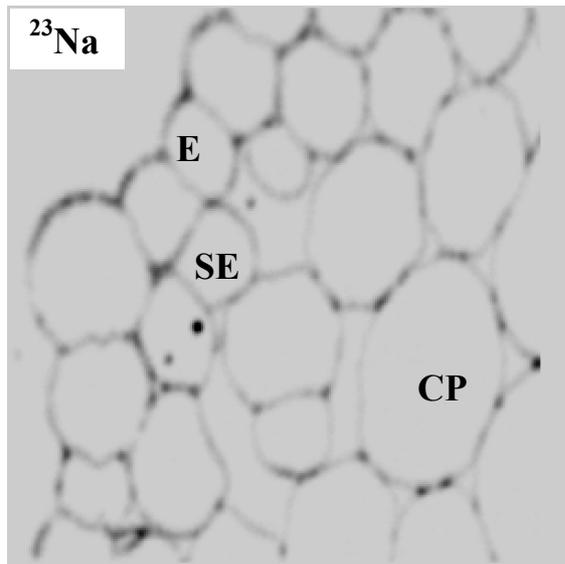


Figure 3. Same as Figure 2, except that the flax seedlings have been subjected to a calcium deprivation from day 7 to day 9. The image for a given species is directly comparable to the corresponding image in Figure 3 because of equalisation based on ^{12}C emission and of the use of the same grey-level scale.

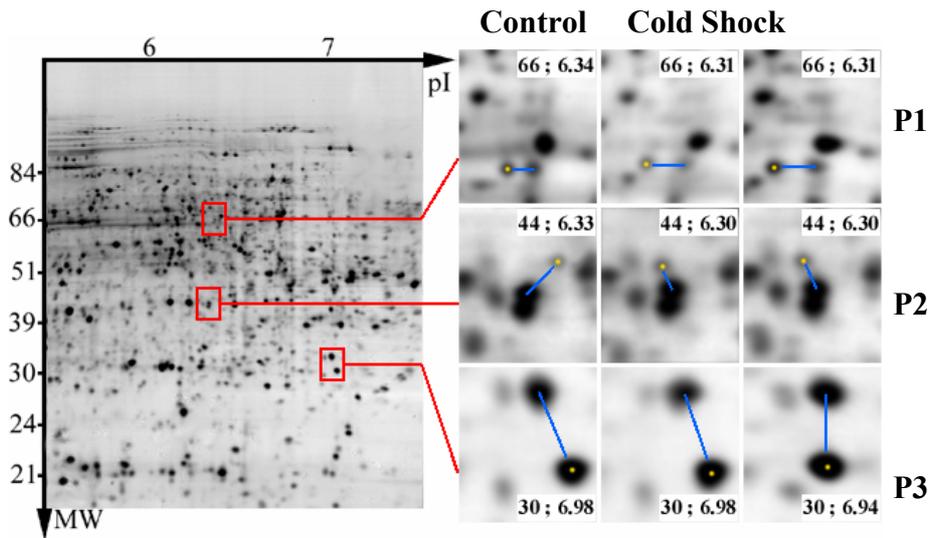


Figure 4. 2-D electrophoresis of flax proteins after cold shock and telephone irradiation. An entire control gel is shown in which the proteins were extracted from plants that were given neither cold shock nor irradiation. Selected enlarged areas correspond to an area of the control gel (left column); the other columns correspond to the same areas in other gels: cold shock (middle column) or 2 h irradiation (right column) by the GSM telephone. Neither the treated nor the control plants were subjected to the calcium deprivation in these experiments. Numerical values in each inset are (Mw; pI) for the protein indicated by the yellow dot. The lines are to highlight the changes.

Publication 4.

Detection of low intensity GHz radiation by plants.

(soumis à *Bioelectromagnetics*).

Detection of low intensity GHz radiation by plants.

Marc Tafforeau^a, Marie-Claire Verdus^a, Vic Norris^a, Glenn J White^b, Maurice Demarty^a, Michel Thellier^a and Camille Ripoll^{a*}

^a Laboratoire des Processus Intégratifs Cellulaires, UMR CNRS 6037, Université de Rouen, 76821 Mont Saint Aignan Cedex, France,

^b School of Physical Sciences, University of Kent, Canterbury, UK

**Correspondence and Reprints: Camille Ripoll, Laboratoire des Processus Intégratifs Cellulaires, UMR CNRS 6037, Université de Rouen, 76821 Mont Saint Aignan Cedex, France,*

tel: (33) [0]2 35 14 66 81; fax: (33) [0]2 35 14 70 20

e-mail: Camille.Ripoll@univ-rouen.fr

Detection of GHz radiation by plants

Abstract. Exposing seedlings of the flax, *Linum usitatissimum* L., to a variety of weak environmental stresses, in addition to a 2-day calcium deprivation. Triggers the common response of production of epidermal meristems in the hypocotyl. Here, we show that a similar response was induced by a 1 minute cold shock and by a single 2 hour exposure to radiation emitted at 105 GHz at non-thermal levels by a Gunn oscillator.

cold shock / GHz radiation / microwaves / flax / meristem / calcium / plants

Introduction

In their natural environment, plants are subjected to a variety of abiotic and biotic stresses such as wind, rain, mechanical contact, drought, thermal stresses, pricking by insects, wounds inflicted by phytophages, and infection by pathogens. These stresses produce cellular signalling events (Jonak et al., 1996; Mizoguchi et al., 1997; Meskiene and Hirt, 2000; Braam and Davis, 1990; Braam et al., 1996), such as the triggering of early calcium transients (Knight et al., 1991, 1992, 1996; Takahashi et al., 1992; Malho et al., 1998; Plieth et al., 1998; Mithöfer et al., 1999), that eventually result in a modification of growth rate and/or morphogenesis of the whole plant (Adams, 1924; Jaffe, 1985; Thellier et al., 2000).

We have developed an experimental system that is particularly appropriate for revealing the effects of weak environmental stimuli (Verdus et al., 1996, 1997). In this system, week-old seedlings of the flax *Linum usitatissimum* L. var Ariane are subjected to a temporary (typically 2 days) calcium deprivation by replacing the complete growth medium with a calcium-depleted medium (after this depletion the plants are again grown on the complete medium). This results in the production of epidermal meristems in the hypocotyls (typically 20 after 3 weeks), providing the seedlings have previously undergone an exposure to different stresses or stimuli, such as drought or touch, respectively. In control experiments designed to minimise these stresses, the mean number of meristems produced per plant is 10 to 20 times lower than in plants which have been stimulated.

Electromagnetic radiation in the 100 GHz range is already widely used in a variety of communications systems and environmental sensors, such as telecommunications links and earth resources monitoring applications, and it is therefore important to explore the effects of exposure of biological systems to radiation at such frequencies. To investigate the possibility that plants may be affected by exposure to a frequency in this range, we have used the sensitive experimental system described above. We used cold shock as a positive control since this is known to involve calcium signalling pathways (Knight et al., 1991, 1996; Plieth et al., 1998) and preliminary experiments suggested that this would be another abiotic stress leading to meristem production in our system. We report below how irradiation of flax seedlings with a Gunn oscillator at 105 GHz has induced meristem production comparable to that induced in seedlings subjected to a brief cold shock.

Materials and Methods

Plant growth and calcium deprivation

Plants were grown in a culture room at $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ under continuous artificial light ($32 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ intensity), except for a 3 day period of germination in the dark. The culture medium, slightly modified from the standard Homès medium, contained the macronutrients (mM) KNO_3 6.92; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2.33; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.62 and $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.18 and the micronutrients (μM) $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ 6.86; $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0; $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.04; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03; $\text{Fe}^{3+}\text{EDTA}$ 51.0 and H_3BO_3 27.33. Each batch of approximately 200 flax seeds was grown in its own culture box. Polystyrene culture boxes (Sercobox, Polylabo) and polypropylene meshes (Scrynel, Polylabo) were used.

Two series of experiments were performed. Seeds were placed on polypropylene meshes fitted on the top of each box and the nutrient medium was brought into contact with them (days 1 and 2) to allow germination. The seedlings were then left to grow for a further 3 days *in situ*. On day 6, separate batches of seedlings were used for different treatments (see below): i) a 2 h irradiation using a Gunn oscillator, ii) a 1 min cold shock and iii) no treatment. After each of these treatments, several batches were subjected to a temporary calcium deprivation to induce the formation of meristems. To perform the temporary calcium depletion, the complete medium was substituted during days 7 and 8 by a calcium deprived medium. The seedlings were then left to grow on the complete medium until day 29. In the calcium-deprived medium, calcium was replaced by potassium and the concentrations of nitrate, sulphate and phosphate were kept to the same value as in the complete medium. The variations in the total osmolarity and ionic strength were thus negligible. The medium was renewed every 2 days throughout the experiment. To count meristems, 10 seedlings were taken at random from each of the batches (on days 9, 11, 12, 13, 15, 18, 20, 22, 25, 27, 29) and immediately plunged in 50 % (v/v) aqueous ethanol, where they were left for 24 h or longer, they were then transparent enough to allow counting of the epidermal meristems using a Leica DMRB light microscope. Only meristems comprising at least 4 newly divided cells were counted.

Plant treatments

Seedlings were irradiated at 105 GHz for 2 h on day 6 using a 50 mW Gunn oscillator mounted above them. The output power was monitored using a Goly cell millimetre wave detector. The output angle of the 105 GHz beam was 12° , leading to a mean power density of

1 mW.cm⁻² at the base of the hypocotyls (the radiated power density was not uniform and varied by 50% from the centre to the periphery of the irradiated area). After the 2h irradiation, the seedlings were left in place for meristem production as explained above. To carry out the cold shock treatment, on day 6, the seedlings plus meshes were cautiously removed from the boxes and transferred for one minute to the top of another box containing cold (4 °C) complete growth medium into which the roots were plunged. After this cold shock treatment, the meshes were replaced on their original boxes (at 22 °C) until day 29 to allow meristem production.

Results

Seedlings that, on day 6, were either given a cold shock or exposed to radiation from the Gunn oscillator, produced an average of 15 or 7 meristems, respectively (Figure 1), 3 weeks after the end of the calcium deprivation (day 29). In a control in which the calcium deprivation step was omitted, neither treatment led to a significant production of meristems (not shown). Other controls included 1) no stress treatment and no calcium deprivation and 2) no stress treatment and a 2-day calcium deprivation; both gave less than an average of 0.7 meristems on day 29 (Figure 1). To determine the statistical significance of the observed difference between the different treatments in the same experiment and between the same treatment in separate experiments, SigmaPlot software was used to obtain a non-linear regression of the data from each experiment to a curve generated by two-parameter exponential equation that corresponded to a heuristic mathematical model. The best regression curve and the corresponding 95 % confidence intervals were computed for each experiment. Only the highest and lowest 95 % confidence curves of those calculated for each separate experiment in a given treatment are shown in Figure 1; the other confidence curves, which lie between these extremes, are not shown. This analysis revealed no significant difference between the results of giving the same treatment in separate experiments. They also confirmed the difference between the results of 2 h irradiation and those of the cold shock and the controls as shown by the absence of an overlap of the areas bounded by the highest and lowest 95 % confidence curves for a given treatment (see Figure 1). Mechanical stimulation can induce meristem production in calcium deprivation conditions [16,17]. Care was therefore taken to ensure that the level of mechanical perturbation in all experiments was as low as in the controls (no treatment). Thus meristem production observed after cold shock or exposure to 105 GHz was not due to artefactual mechanical stimulation. The Gunn oscillator delivered

a mean power density of a maximum of 1 mW/cm² at the level of the meshes. We measured, in a separate experiment, the rate of heat dissipation from the culture boxes in the culture room (results not shown) and allowing for this and assuming the conversion of all the radiant energy incident on the box to heat, the temperature increase in the medium would have been less than 0.2 °C after 2 hours. These results were corroborated by the simple following calculation. The average cross-sectional area of a six-day old flax plantlet is 0.005 cm² and its mass 0.06 g. A mean irradiation of 1 mW/cm², thus gives a specific absorption rate for each plant of $0.001 \times 0.005 / 0.00006 = 0.09$ W/kg. A specific absorption rate of 4 W/kg produces a temperature increase of 1°C in humans (Australian Radiation Protection and Nuclear Safety Agency document, www.arpana.gov.au/mph_sys.htm) and using this figure for plantlets gives an estimated increase in temperature of 0.02 °C; even though the exposed surface would have been 10 times larger, the temperature increase would be less than 0.2°C (note that the increase should be less than this since the surface/volume ratio of plantlets is greater than that of humans). A thermal effect is thus unlikely.

These results show that flax seedlings respond to the combination of either a 2 h radiation at 105 GHz or a 1 min cold shock plus a 2-day calcium deprivation in the same way as they respond to other combinations of a stimulus such as touch, wind or drought plus calcium deprivation, namely, by epidermal meristem production in the hypocotyls (Verdus et al., 1997).

Discussion

The system of using epidermal meristem production in the hypocotyls of flax is particularly effective for revealing the transduction of a wide range of low intensity stimuli by seedlings (Verdus et al., 1997). We have shown that delaying the calcium deprivation step for up to 8 days after a touch stress results in essentially the same response as when the calcium deprivation step is immediately after the touch stress (Verdus et al., 1997). We interpreted this result as evidence for the long-term storage of a variety of environmental signals that might help in the generation of an integrated response. Other evidence for ion (Ca)-related signal storage in plants has been reported in *Bidens* (Desbiez et al., 1984; Thellier et al., 2000) and in *Arabidopsis* (Knight et al., 1998). The meristem production in response to a brief cold shock, as reported here, is fully in line with this idea of the storage and the subsequent integration of many environmental stimuli to generate an appropriate phenotype. Radiation at 105 GHz from Gunn oscillators is not, however, a feature of the natural environment from which plants have

adapted to obtain information. Nevertheless, our results show that, at least in our flax system, plants can also respond to radiation at 105 GHz at non-thermal levels.

The mechanism of the interaction of 105 GHz radiation with plants is unknown but probably involves signalling pathways. A pathway based on calcium might seem an evident candidate since the calcium deprivation step is essential for the response of epidermal meristem production in flax seedlings. It should be emphasised, however, that the results reported here do not show that radiation at 105 GHz has an adverse effect on plants. Flax seedlings gently touched or stimulated by wind showed neither a change in growth rate nor an otherwise impaired phenotype; nevertheless, these seedlings developed meristems after they were temporarily deprived of calcium. That said, it is remarkable that exposure to non-ionising radiation at non-thermal levels can have the same morphological consequences as exposure to natural stimuli such as wind and rain.

Acknowledgements. We thank Marc Knight and Derek Martin for discussions and Gérard Grancher for help with statistics. Marc Tafforeau was supported by a fellowship from the Ministère de la Recherche, France.

References

- Adams J. 1924. Adventitious shoots on hypocotyl of flax and tomato. *Bot Gaz* 78: 461-462.
- Braam J, Davis RM. 1990. Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*. *Cell* 60: 357-364.
- Braam J, Sistrunk ML, Polisenky DH, Xu W, Purugganan MM, Antosiewicz DM, Campbell P, Johnson KA. 1996. Life in a changing world : TCH gene regulation of expression and responses to environmental signals. *Physiol Plant* 98: 909-916.
- Desbiez M-O, Kergosien Y, Champagnat P, Thellier M. 1984. Memorization and delayed expression of regulatory messages in plants. *Planta* 160: 392-399.
- Jaffe MJ. 1985. Wind and other mechanical effects in the development and behavior of plants with special emphasis of the role of hormones. In: Pharis RP., Reid DM, editors. *Encyclopedia of Plant Physiology*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag. p 444-484.
- Jonak C, Kiegerl S, Ligterink W, Barker PJ, Huskisson NS, Hirt H. 1996. Stress signaling in plants : A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc Nat Acad Sci USA* 93: 11274-11279.
- Knight H, Brandt S, Knight MR. 1998. A history of stress alters drought calcium signalling pathways in *Arabidopsis*. *Plant J* 16: 681-687.
- Knight H, Trewavas AJ, Knight MR. 1996. Cold calcium signalling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell* 8: 489-503.
- Knight MR, Campbell AK, Smith SM, Trewavas AJ. 1991. Transgenic plant aequorin report the effect of touch and cold shock and fungal elicitors on cytosolic calcium. *Nature* 352: 524-526.
- Knight MR, Smith SM, Trewavas AJ. 1992. Wind induced plant motion immediately increases cytosolic calcium. *Proc Nat Acad Sci USA* 89: 4967-4971.
- Malhó R, Moutinho A, van der Luit A, Trewavas AJ. 1998. Spatial characteristics of calcium signalling : the calcium wave as a basic unit in plant cell calcium signalling. *Phil Trans Royal Soc London B* 353: 1463-1473.
- Meskiene I, Hirt H. 2000. MAP kinase pathways: molecular plug and play chips for the cell. *Plant Mol Biol* 42: 791-806.
- Mithöfer A, Ebel J, Bhagwat AA, Boller T, Neuhaus-Url G. 1999. Transgenic aequorin monitors cytosolic calcium transients in soybean cells challenged with β -glucan or chitin elicitors. *Planta* 207: 566-574.
- Mizoguchi T, Ichimura K, Shinozaki K. 1997. Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases. *Trends Biotech* 15: 15-19.
- Plieth C, Hansen UP, Knight H, Knight M.R. 1998. Temperature sensing in plants: the primary characteristics of signal perception and calcium response. *Plant J* 18: 491-497.
- Takahashi K, Isobe M, Knight M.R, Trewavas AJ, Muto S. 1992. Hypoosmotic shock induces increases in cytosolic Ca^{2+} in tobacco suspension-cultured cells. *Plant Physiol* 113: 587-594.
- Thellier M, Le Sceller L, Norris V, Verdus M-C, Ripoll C. 2000. Long-distance transport, storage and recall of morphogenetic information in plants. The existence of a sort of primitive plant « memory ». *C R Acad Sci Paris (Sciences de la Vie/Life Sciences)* 323: 81-91.
- Verdus M-C, Cabin-Flaman A, Ripoll C, Thellier M. 1996. Calcium-dependent storage/retrieval of environmental signals in plant development. *C R Acad Sci Paris (Sciences de la Vie/Life Sciences)* 319: 779-782.
- Verdus M-C, Thellier M, Ripoll C. 1997. Storage of environmental signals in flax. Their morphogenetic effect as enabled by a transient depletion of calcium. *Plant J* 12: 1399-1410.

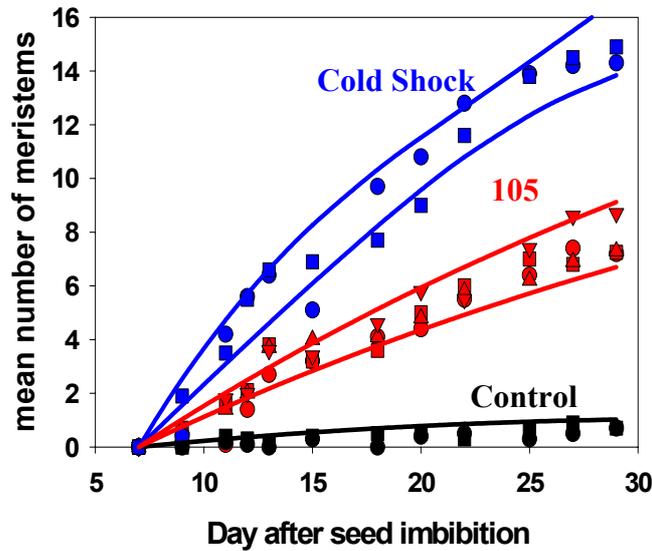


Figure 1. Mean number of meristems per hypocotyl as a function of time. A total of 1144 seedlings were analysed. Each point is the mean of 10 measurements. The points corresponding to a given treatment are of the same colour (each separate experiment is represented by a different symbol). The coloured lines around these points are the lowest and the highest 95% confidence curves obtained after a heuristic 2-parameter exponential model was fitted to the data of each separate experiment using the Levenberg-Marquardt algorithm of the SigmaPlot software. Determination coefficients of the model were between 0.915 and 0.988 for all cold shock and 105 GHz irradiation experiments; for the controls, determination coefficients were lower but the mean number of meristems was less than 0.5 on day 29. Curves and symbols: irradiation by the Gunn oscillator, red; cold shock, blue; other controls, black.

Publication 5.

Identification of *Arabidopsis* proteins affected by cold shock and GSM telephone radiation.

(soumis à *International journal of radiation biology*).

Identification of *Arabidopsis* proteins affected by cold shock and GSM telephone radiation.

Marc Tafforeau^a, Vic Norris^a, Marie-Claire Verdus^a, Glenn White^b, Maurice Demarty^a, Michel Thellier^a and Camille Ripoll^{a*}

^a Laboratoire des Processus Intégratifs Cellulaires, UMR CNRS 6037, Université de Rouen, 76821 Mont Saint Aignan Cedex, France,

^b School of Physical Sciences, University of Kent, Canterbury, UK

**Correspondence and Reprints: Camille Ripoll, Laboratoire des Processus Intégratifs Cellulaires, UMR CNRS 6037, Université de Rouen, 76821 Mont Saint Aignan Cedex, France,*

tel: (33) [0]2 35 14 66 83; fax: (33) [0]2 35 14 70 20

e-mail: Camille.Ripoll@univ-rouen.fr

Summary

A variety of weak environmental stresses that include cold shock and exposure to radiation from a GSM telephone or a Gunn oscillator trigger the common response of production of epidermal meristems in the hypocotyls of seedlings of the flax *Linum usitatissimum* L. To begin to unravel the mechanisms responsible, the model plant *Arabidopsis thaliana* was subjected to cold shock and to exposure to radiation from a GSM telephone. Analysis of the proteome revealed that six proteins were affected. Carbonic anhydrase, an enzyme known to be involved in signalling, was one of the proteins affected by both treatments whilst spermidine synthase and a protein homologous to pherophorins that amplify sex pheromones in the green alga *Volvox* were only affected by irradiation.

Introduction

A variety of stresses generate signals in plants (Braam and Davis 1990, Jonak *et al.* 1996, Mizoguchi *et al.* 1996, Braam *et al.* 1997, Meskiene and Hirt 2000) that eventually result in a modification of growth rate and/or morphogenesis (Adams 1924, Jaffe 1985, Thellier *et al.* 2000). These stresses include wind, rain, mechanical contact, drought, pricking by insects, wounds inflicted by phytophages, and infection by pathogens. They also include cold shock and exposure to low levels of non-ionising radiation at 105 GHz emitted continuously from a Gunn oscillator (Tafforeau *et al.* in preparation) and at around 900 MHz as 217 Hz pulses from a GSM telephone (Tafforeau *et al.* in preparation).

In seedlings of the flax, *Linum usitatissimum* L., the morphological response common to many stresses or apparent stresses is the production of epidermal meristems in the hypocotyls (Verdus *et al.* 1996, 1997). This response, which is also elicited by cold shock and exposure to radiation at low intensities (Tafforeau *et al.* in preparation), involves calcium which is central to signal transduction in plants (Knight *et al.* 1991, 1996, 1997, Takahashi *et al.* 1997, Malho *et al.* 1998, Plieth *et al.* 1999, Mithöfer *et al.* 1999). Whilst flax is suitable for morphological studies, its proteome is largely unknown and it is difficult to identify the proteins that mediate this response (Tafforeau *et al.* 2002). Clearly, a different model system is needed to elucidate the molecular mechanisms responsible for responses to cold shock and exposure to non-ionising radiation.

The genome of *Arabidopsis thaliana* is the leading model system for the study of the plant proteome. Here, we report our use of *Arabidopsis* to identify proteins involved in mediating cold shock and/or exposure to non-ionising radiation. These proteins include three enzymes known to be implicated in signal transduction or differentiation, carbonic anhydrase (Breton *et al.* 2001), spermidine synthase 2 (Hanzawa *et al.* 2000) and a phosphorin-like protein (Godl *et al.*, 1995).

Material and Methods

Plant growth and cold shock treatment

Arabidopsis thaliana seeds were allowed to germinate in Petri dishes 9 cm in diameter on a disk of ashless filter paper moistened with the culture medium. This medium was modified slightly from the standard Homès medium and contained the macronutrients (mM) KNO₃ 6.92; Ca(NO₃)₂·4H₂O 2.33; MgSO₄·7H₂O 1.62 and NaH₂PO₄·2H₂O 2.18 and the micronutrients (μM) MnSO₄·H₂O 6.86; CuSO₄·5H₂O 1.0; ZnSO₄·7H₂O 1.04;

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03; $\text{Fe}^{3+}\text{EDTA}$ 51.0 and H_3BO_3 27.33. After 3 weeks of growth, a cold shock was performed: a Petri dish containing approximately 200 plants was put in contact with ice water for 1 minute and then left for 9 additional minutes at 22°C in the growth room (batch At10CS). Then the Petri dish was plunged into liquid nitrogen and the seedlings subsequently stored at -80°C. A control experiment (batch AtNCS) was carried out under identical conditions apart from omission of the cold shock. The hypocotyls plus the cotyledons were collected at -20°C.

GSM treatment

Seedlings were irradiated for 2 h using a GSM telephone (Nokia 7110) mounted above them (at 17 cm from the mesh) without using metal. Low intensity sound was delivered to the telephone microphone just sufficient to maintain emission from the telephone and this assembly was wrapped in laboratory wiping paper to prevent acoustic and light emission. Under these conditions, the telephone emitted at full broadcast strength continuously throughout the 2 h exposure. After the 2h irradiation, proteins were extracted immediately from the seedlings (batch AtGSM).

Extraction of soluble proteins of Arabidopsis:

Arabidopsis seedlings were crushed in liquid nitrogen, and then homogenised with 10% TCA (trichloroacetic acid) and 0.07% 2-β-mercaptoethanol in cold (-20°C) acetone (Damerval *et al.* 1986, Granier 1988). Proteins were allowed to precipitate for one hour at -20°C. After a 10 min centrifugation at 6,000g at -10°C, the pellets were washed twice with cold acetone containing 0.07% 2-β-mercaptoethanol for one hour at -20°C. The supernatants were discarded and the pellets were vacuum-dried overnight at -20°C and dissolved in 70μL per mg of dry matter of an extraction buffer (urea 9,5 mol/L, DTE 50 mmol/L, CHAPS 5%, spermine base 25 mmol/L, 4% polyvinylpyrrolidone, and a trace of bromophenol blue) for one hour on a shaker (Rabilloud 1996). After a 30 min centrifugation at 200,000 g at 15°C, the protein concentrations were determined using the Bradford Protein Kit Assay (Bio-Rad). The samples were kept at -80°C until used.

2D-electrophoresis

Two-dimensional electrophoresis was carried out according to O'Farrell (1975). Strips (IPG, Bio-Rad) 17 cm in length, with immobilised ampholytes to give a linear pH gradient in the range 5-8, were used to perform the first dimension electrophoresis. Each strip was

rehydrated with 400 μ L of rehydration buffer (urea 9 mol/L, DTE 15 mmol/L, CHAPS 2%, Ampholines 0.8% (v/v), and a trace of bromophenol blue) containing 30 μ g of protein. A Protean IEF Cell unit (Bio-Rad) with a total (volt)x(hour) value of 80 kVh was used for the isoelectric focusing of the proteins. Before performing the second dimension, the strips were first equilibrated during 15 min in a buffer containing tris HCl (pH 8.8, 50 mmol/L), urea 6 mol/L, glycerol 24% (m/v), SDS 2%, 2% DTE and then 15 min again in the same buffer except for the substitution of the 2% DTE by 2.5% of iodoacetamide plus a trace of bromophenol blue. The second dimension electrophoresis was then performed on a 10% polyacrylamide gel: 1) 50 minutes with a current intensity of 10 mA per gel at a temperature in the range 9-11°C, and 2) 4 hours with a current intensity of 20mA per gel. Gels were stained using an ammoniacal silver staining protocol (Oakely 1980) then scanned using an optical scanner in transmissive mode (Umax) at 300dpi and analysed with Melanie III software (Bio-Rad).

N-terminal sequencing

After completion of the second dimension of the 2-D electrophoresis, *Arabidopsis* proteins were transferred for 2h from the gel to a PVDF membrane using a semi-dry blotting apparatus (Bio-Rad) and a buffer consisting of Tris (Base) 48mmol/L, glycine 39mmol/L, SDS 0,1%, and 2-propanol 20%. After staining the PVDF membrane (Coomassie brilliant blue R250), spots were selected and the N-terminal sequence of the corresponding proteins determined using the Edman procedure (Procise 492, Perkin Elmer Applied Biosystems). Swiss-Prot, GenBank and EMBL protein databases were used to identify the proteins.

Results

Six spots were affected by the cold shock or exposure to radiation from the GSM telephone (Figure 1 and Table 1). Spots P1, P3 and P6 shifted towards a lower pI after both treatments whilst P2 disappeared. Spots P4 and P5 were affected by the irradiation but not the cold shock. P4 appeared after the irradiation whilst P5 disappeared after it. These changes to the proteome may, of course, be due either to synthesis/degradation or to post-translational modifications in which one spot masks another.

Attempts were made to sequence the six proteins. P1 and P2 proved to be insufficiently abundant. The sequence obtained for P6 was xxEDAQxD(PF)DQT but a corresponding protein could not be found in the databases. The sequence of P3, ALQTGTSxDxK, matches

that of the mature form of carbonic anhydrase (Swiss Prot P27140, ALQTGTSSDKK) after cleavage of its chloroplast signal sequence of 113 amino acids. There are now believed to be at least four classes of carbonic anhydrase (Tripp *et al.* 2001) of which the α , β and γ classes are present in *A. thaliana* (Hewett-Emmett and Tashian 1996). P3 corresponds to an enzyme of the α class.

The N-terminal sequence of P4 x(YPKL)(NE)(TYL)(PA)(TV)K(EA)(DQ) matches 7 out of 8 amino acids (the underlined sequence) of a 23 kDa protein in the Swiss Prot database (access number Q93ZL7, MEDVMKFVDWLDKELATLAD) although it is offset by 11 amino acids from the deduced N-terminus. However, it also matches the same sequence in a 62kDa protein (Q9SX62) but from amino acid 370 on. Comparison of these proteins shows that Q93ZL7 corresponds to the C-terminal half of Q9SX62. The sequence of Q9SX62 is annotated as pherophorin-like. Pherophorins are glycoproteins that contain a C-terminal domain with homology to the sex-inducing pheromone. In the multicellular green alga *Volvox carteri* and, in the case of pherophorin II, the pheromone-like domain becomes proteolytically liberated from the parent glycoprotein, probably as part of a signal amplification process (Godl *et al.*, 1995). Given the homology between Q9SX62 and pherophorins such as O49524, we suggest that P4 corresponds to a pherophorin proteolytically cleaved during signal transduction.

P5 is very probably spermidine synthase 2 (O48661) which has an N-terminal sequence, x(FIP)(PL)PVKx(LP)(VIT)H, that matches 5 out of 8 amino acids (MSSTQEASVTDLPVKRPEA) and that is offset by 9 amino acids from the deduced N-terminus. There appear to be two genes encoding spermidine synthases in *A. thaliana* with 87% identity (the N-terminus sequence of the other spermidine synthase is MDAKETSATD LKRPREEDDN) (Hashimoto 1998).

Discussion

The wide range of physical stimuli affecting the morphogenesis of flax seedlings include wind, drought, mechanical contact and wounding, cold shock (Verdus *et al.* 1966, 1997) and exposure to low levels of non-ionising radiation at around 900 MHz from a GSM telephone (Tafforeau *et al.* in preparation) and to 105 GHz from a Gunn oscillator (Tafforeau *et al.* in preparation). To get to grips with the biochemical mechanisms likely to underlie these morphogenetic responses we have resorted to *A. thaliana* which, with its intensely

studied genome, offers several advantages for the study of mechanisms of signal transduction in plants. These advantages apply to the case where changes in the proteome are suspected and where 2-D gel electrophoresis can be performed. Recently, we have refined this technique statistically in order to be more confident of the significance of changes (Tafforeau *et al.* 2002). This allows us to conclude that in *A. thaliana* at least six spots are affected by cold shock and/or radiation treatment.

Three of these spots reveal an apparent shift to a lower pI in response to both treatments. This shift is consistent with a post-translational modification such as phosphorylation although we cannot formally exclude the possibility of the separate degradation of one protein and synthesis of another. Carbonic anhydrase is one of these proteins. This enzyme catalyses the reversible hydration of carbon dioxide to form bicarbonate and protons. It is therefore central to the fixation of carbon dioxide and to the regulation of acidity. The enzyme affected by both the treatments is a form localised to the chloroplast. In soybean root modules, the spatio-temporal distribution of carbonic anhydrase is consistent with a role for the enzyme in differentiation (Kavroulakis *et al.* 2000). A plant carbonic anhydrase has been shown to interact with the decarboxylating enzymes, arginine decarboxylase, lysine decarboxylase and ornithine decarboxylase which give carbon dioxide the corresponding diamine, including putrescine (Botre and Mazzei 1999, Ndong *et al.* 2001).

Spermidine synthase 2 was one of the two proteins affected by the irradiation but not the cold shock and the spot corresponding to this enzyme (or to one form of this enzyme) disappeared during the irradiation. The diamine putrescine is converted into spermidine and spermine through the consecutive activity of spermidine synthase (putrescine aminopropyltransferase) and spermine synthase using decarboxylated *S*-adenosyl methionine as an aminopropyl donor. This enzyme has been implicated in differentiation in plants that include pea fruits (Alabadi and Carbonell 1999) and *Nicotiana glauca* (Hashimoto *et al.* 1998) and in the response to abiotic stress in *Brassica napus* and *Petunia hybrida* (Watanabe *et al.* 2002). Changes in polyamine levels in transgenic plants affect stem elongation, leaf morphology and root growth (for references see Hanzawa *et al.* 2000). In *A. thaliana*, the related *spermine* synthase has been shown to be essential to internode elongation through cell expansion (Hanzawa *et al.* 2000), a process that in *Bryonia dioica*, is inhibited by another physical treatment, namely gentle rubbing (Boyer *et al.* 1983). Spermidine synthase from soybean is stimulated by calcium and it has been suggested that metal ions regulate the synthesis of polyamines (Yoon *et al.* 2000). It may be significant that a calcium deprivation step is essential for the response of epidermal meristem production in flax seedlings.

However, it should be noted that, even in the absence of the calcium deprivation step, we observed radiation-induced changes to the proteomes of both *L. usitatissimum* L. (Tafforeau *et al.* 2002) and, as reported here, *A. thaliana*.

A pherophorin-like protein was also generated in response to the irradiation. The sex-inducing pheromone of the multicellular green alga *V. carteri* is a glycoprotein that triggers development of males and females at a concentration $<10^{-16}$ M. The pheromone induces synthesis of certain pherophorins that contain a C-terminal domain with homology to the sex-inducing pheromone and, in the case of pherophorin II, the pheromone-like domain is proteolytically liberated, probably to amplify the signal. It seems likely that a similar proteolysis is responsible for the appearance of the pherophorin-like protein observed here. This conclusion is strengthened by the finding that the pherophorin and other genes in *V. carteri* under the control of the sex-inducing pheromone are also induced by a mild mechanical stress (Amon *et al.*, 1998). This led to the suggestion that the sex-inducing pheromone and wounding use a common signal transduction pathway (Amon *et al.*, 1998).

The possible involvement of carbonic anhydrase and spermidine synthase in response to both cold shock and irradiation in the former case and to irradiation alone in the latter implicates, directly or indirectly, polyamines, whilst the involvement of a pherophorin-like protein in irradiation implicates a common signal transduction pathway for stresses based on pheromones. Further investigation should clarify the role of these proteins and the interactions between them in the common response to physical stresses.

References

- Adams, J., 1924, Adventitious shoots on hypocotyl of flax and tomato. *Bot. Gaz.*, 78, 461-462.
- Alabadi, D. and Carbonell, J., 1999, Differential expression of two spermidine synthase genes during early fruit development and in vegetative tissues of pea. *Plant Mol. Biol.*, 39, 933-943.
- Amon, P., Haas, E. and Sumper, M. 1998, The Sex-Inducing Pheromone and Wounding Trigger the Same Set of Genes in the Multicellular Green Alga *Volvox*, *Plant Cell*, 10, 781-790.
- Botre, F., and Mazzei, F., 1999, Interactions between carbonic anhydrase and some decarboxylating enzymes as studied by a new bioelectrochemical approach. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 48, 463-467.
- Boyer, N., Desbiez, M.O., Hofinger, M. and Gaspar, T., 1983, Effect of lithium on thigmomorphogenesis in *Bryonia dioica*, ethylene production and sensitivity. *Plant Physiol.*, 72, 522-525.
- Braam, J. and Davis, R.M., 1990, Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*. *Cell*, 60, 357-364.
- Braam, J., Sistrunk, M.L., Polisensky, D.H., Xu, W., Purugganan, M.M., Antosiewicz, D.M., Campbell, P., and Johnson, K.A., 1997, Plant responses to environmental stress : regulation and functions of the *Arabidopsis* TCH genes. *Planta*, 203, S35-S41.
- Breton, S., 2001, The cellular physiology of carbonic anhydrases. *J. Pancreas*, 2, 159-164.
- Damerval, C., de Vienne, D., Zivy, M. and Thiellement, H., 1986, Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, 7, 52-54.
- Godl K, Hallmann A, Rappel A, and Sumper M., 1995, Pherophorins: a family of extracellular matrix glycoproteins from *Volvox* structurally related to the sex-inducing pheromone. *Planta*, 196, 781-787.
- Granier, F., 1988, Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 9, 712-718.
- Hanzawa, Y., Takahashi, T., Michael, A.J., Burtin, D., Long, D., Pineiro, M., Coupland, G. and Komeda, Y., 2000, *ACAULIS5*, an *Arabidopsis* gene required for stem elongation, encodes a spermine synthase. *EMBO J.*, 19, 4248-4256.
- Hashimoto, T., Tamaki, K., Suzuki, K. and Yamada, Y., 1998, Molecular cloning of plant spermidine synthases. *Plant Cell Physiol.*, 39, 73-79.
- Hewett-Emmett, D. and Tashian, R.E., 1996, Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the alpha-, beta-, and gamma-carbonic anhydrase gene families. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 5, 50-77.
- Jaffe, M.J., 1985, Wind and other mechanical effects in the development and behavior of plants with special emphasis of the role of hormones. In: Pharis R.P., Reid D.M., editors. *Encyclopedia of Plant Physiology*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag. p 444-484.
- Jonak, C., Kiergel, S., Ligterink, W., Barker, P.J., Huskisson, N.S., and Hirt, H., 1996, Stress signaling in plants : a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 11274-11279.
- Kavroulakis, N., Fletmetakis, E., Aivalakis, G. and Katinakis, P., 2000, Carbon metabolism in developing soybean root nodules: the role of carbonic anhydrase. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 13, 14-22.

- Knight, M.R., Campbell, A.K., Smith, S.M., and Trewavas, A.J., 1991, Transgenic plant aequorin reports the effects of cold shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature*, 352, 524-526.
- Knight, H., Trewavas, A.J., and Knight, M.R., 1996, Cold calcium signalling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell*, 8, 489-503.
- Knight, H., Trewavas, A.J., and Knight, M.R., 1997, Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J.*, 12, 1067-1078.
- Malhó, R., Moutinho, A., van der Lui, A., and Trewavas, A.J., 1998, Spatial characteristics of calcium signaling: The calcium wave as a basic unit in plant cell calcium signalling. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B*, 353, 1463-1473.
- Mithöfer, A., Ebel, J., Bhagwat, A.A., Boller, T. and Neuhaus-Url, G., 1999, Transgenic aequorin monitors cytosolic calcium transients in soybean cells challenged with β -glucan or chitin elicitors. *Planta*, 207, 566-574.
- Mizoguchi, T., Irie, K., Hirayama, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Matsumoto, K., and Shinozaki, K., 1996, A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 765-769.
- Meskiene, I. and Hirt, H., 2000, MAP kinase pathways: molecular plug-and-play chips for the cell. *Plant Mol. Biol.*, 42, 791-806.
- Ndong, C., Danyluk, J., Huner, N.P. and Sarhan, F., 2001, Survey of gene expression in winter rye during changes in growth temperature, irradiance or excitation pressure. *Plant Mol. Biol.*, 45, 691-703.
- Oakely, B.R., Kirsh, D.R. and Morris, N.R., 1980, A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 105, 361-363.
- O'Farrell, P.H., 1975, High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250, 4007-4021.
- Plieth, C., 1999, Temperature sensing by plants: calcium-permeable channels as primary sensors – a model. *J. Membr. Biol.*, 172, 121-127.
- Rabilloud, T., 1996, Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. *Electrophoresis*, 17, 813-829.
- Tafforeau M., Verdus M.C., Charlionet R., Cabin-Flaman A. and Ripoll. C., 2002, 2D-electrophoresis investigation of short-term response of flax seedlings to a cold shock. *Electrophoresis*, (in press).
- Takahashi, K., Isobe, M., Knight, M.R., Trewavas, A.J., and Muto, S., 1997, Hypo-osmotic shock induces increases in cytosolic Ca^{2+} in tobacco suspension culture cells. *Plant Physiol.*, 113, 587-594.
- Thellier, M., Le sceller, L., Norris, V., Verdus, M.C. and Ripoll, C., 2000, Long-distance transport, storage and recall of morphogenetic information in plants. The existence of a sort of primitive plant 'memory'. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 323, 81-91.
- Tripp, B.C., Smith, K. and Ferry, G.J., 2001, Carbonic Anhydrase: New Insights for an Ancient Enzyme. *J. Biol. Chem.*, 276, 48615-48618.
- Verdus, M.C., Cabin-Flaman, A., Ripoll, C., Thellier, M., 1996, Calcium-dependent storage/retrieval of environmental signals in plant development. *C. R. Acad. Sci. Paris (Sciences de la Vie/Life Sciences)* 319, 779-782.
- Verdus M-C., Thellier M., Ripoll C., 1997, Storage of environmental signals in flax. Their morphogenetic effect as enabled by a transient depletion of calcium. *Plant J.* 12, 1399-1410.

- Watanabe, M., Suzuki, K., Kawasaki, H. and Watanabe, Y., 2002, Differential responses of *Brassica napus* and *Petunia hybrida* to leaf protoplast isolation stress. *Physiol. Plant.*, 114, 645-651.
- Yoon, S.O., Lee, Y.S., Lee, S.H. and Cho, Y.D., 2000, Polyamine synthesis in plants: isolation and characterization of spermidine synthase from soybean (*Glycine max*) axes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1475, 17-26.

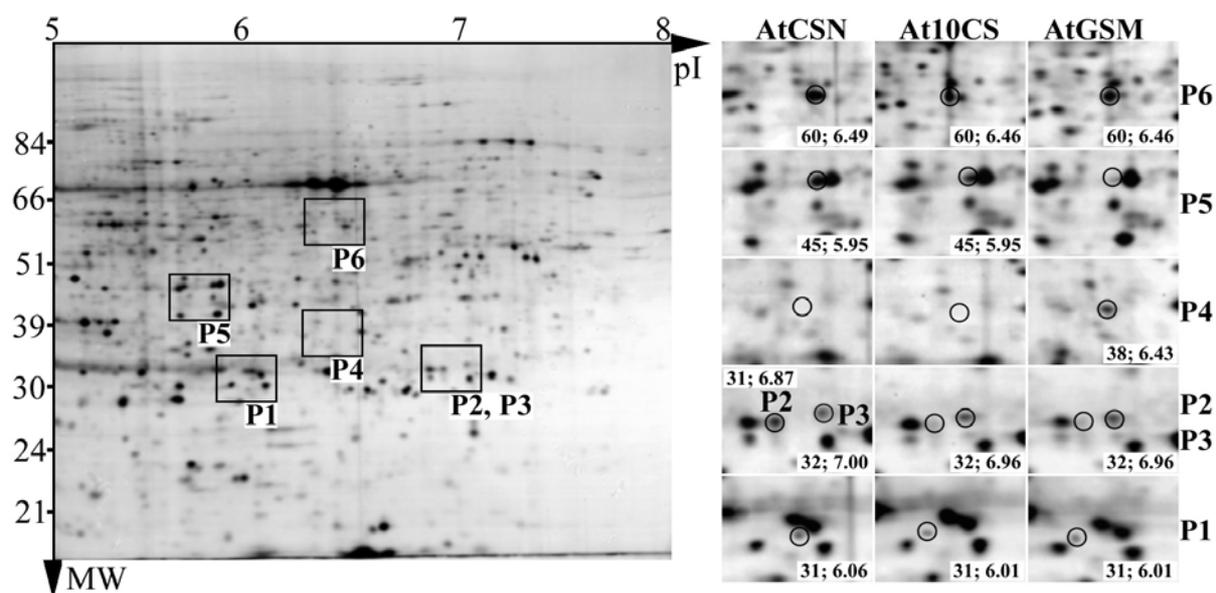


Figure 1. Two dimensional electrophoresis gel obtained with proteins extracted from *Arabidopsis* in a control experiment without cold shock or GSM irradiation as revealed by silver staining. The 5 areas framed in the gel to the left of the figure are enlarged on the right for a typical control (AtNCS), 9 min after a 1 min cold shock (At10CS) and after 2 hours of GSM irradiation (AtGSM). 6 changes are circled.

Table 1. Characteristics of the changes in the *Arabidopsis* proteome 9 min after a 1 min cold shock and immediately after a 2h exposure to GSM telephone radiation.

Protein	MW (kDa)	pI	Observed changes after CS	Observed changes after GSM
P1	31	6.06	pI value lowered to 6.01	pI value lowered to 6.01
P2	31	6.87	Spot no longer visible	Spot no longer visible
P3 (P27140)	32	7.00	pI value lowered to 6.96	pI value lowered to 6.96
P4 (Q9SX62)	38	6.43	No change	Spot appears
P5 (O48661)	45	5.95	No change	Spot no longer visible
P6	60	6.49	pI value lowered to 6.46	pI value lowered to 6.46

Résumés

Etude des phases précoces de la transduction des signaux environnementaux chez le lin : une approche protéomique

Les plantes perçoivent et enregistrent les *stimuli* environnementaux. Du fait de leur immobilité, elles y répondent principalement par des modifications de leur croissance et de leur morphogenèse. La modification transitoire de la concentration du calcium libre dans divers compartiments cellulaires semble avoir un rôle fondamental dans les mécanismes de perception. Les systèmes de transduction des signaux font aussi intervenir des kinases pour véhiculer l'information jusqu'au noyau cellulaire et générer une réponse spécifique.

Dans ce travail nous avons étudié l'effet de *stimuli* abiotiques (stress mécaniques, de froid ou exposition à des micro-ondes de fréquence 0.9 et 105 GHz à une puissance non thermique) chez le lin (*Linum usitatissimum* L.) et *Arabidopsis thaliana*. Chez le lin, le modèle de la production de méristèmes épidermiques hypocotylaires nous a permis d'analyser les effets des différents *stimuli* en l'absence ou en présence d'inhibiteurs de canaux calciques et de chélateur du calcium. En parallèle nous avons développé l'analyse protéomique de l'hypocotyle de lin. Ainsi, nous avons établi un critère statistique permettant d'améliorer la fiabilité de détermination des changements observés sur une carte protéique obtenue par 2-DE. De plus, afin de déterminer si certains changements observés correspondent à des phosphorylations, nous avons mis au point une nouvelle technique d'analyse par spectrométrie de masse d'ions secondaires permettant de détecter directement la présence de phosphore dans un spot après une séparation électrophorétique et qui pourrait permettre la mise en évidence de phosphorylations difficiles à observer par les méthodes conventionnelles.

L'analyse protéomique chez le lin a révélé que 4 protéines au moins interviennent dans la réponse rapide aux *stimuli* mécaniques, 7 à un choc de froid et 3 à une irradiation à 0.9 GHz. Les effets des inhibiteurs de canaux calciques et de l'EGTA portent sur 5 protéines et ceux d'une déplétion calcique (nécessaire pour induire la formation de méristèmes) sur 7. Cependant 5 parmi ces protéines sont affectées de la même façon par deux à quatre de ces *stimuli* et ont probablement un rôle fondamental dans le traitement des signaux abiotiques chez le lin. Parmi ces protéines une seule impliquée dans la réponse à un choc de froid a été identifiée comme étant la saccharopine déshydrogénase.

L'absence de bases de données sur le lin rend difficile l'identification des protéines modifiées par les *stimuli*. Ainsi en utilisant le modèle *Arabidopsis thaliana* nous avons mis en évidence des modifications concernant quatre protéines après un choc de froid et outre ces quatre, deux autres après une irradiation de 2 h à 0.9 GHz. Parmi les protéines modifiées par ces deux *stimuli*, 2 ont été identifiées : l'anhydrase carbonique et la spermidine synthase. De plus l'une des protéines affectées spécifiquement par le rayonnement à 0.9 GHz est une protéine homologue aux phérophorines.

Nous avons ainsi apporté des données nouvelles permettant d'avancer dans la compréhension des phases précoces du traitement des signaux abiotiques chez les plantes. En particulier nous avons montré que, de façon inattendue, les plantes perçoivent le rayonnement électromagnétique dans le domaine des GHz en utilisant probablement les voies de transduction des signaux abiotiques.

Mots clés

Lin, *Arabidopsis*, plantes, méristèmes, électrophorèse bidimensionnelle, stress abiotiques, micro-ondes, choc de froid, inhibiteur de canaux calciques.

Investigation of the initial phase in the transduction of environmental stimuli in flax: a proteomic approach

Plants perceive and record environmental *stimuli* and, since they are unable to move, generally respond to these *stimuli* by modifying their growth and morphology. A key role in the perception of these *stimuli* is played by changes in the concentration of free calcium in different intracellular compartments as well as by signal transduction systems that depend on kinases to transmit information to the nucleus where a specific response is generated.

In the work presented here, we have studied the effect on flax (*Linum usitatissimum* L.) or on *Arabidopsis thaliana* of abiotic stress (mechanical stress, exposure to low temperature, or exposure to non-thermal intensities of electromagnetic radiation at frequencies of 0.9 or 105 GHz). We have used the model of epidermal meristem production in flax to determine the effects of these different stresses in the presence or absence of calcium channel inhibitors or of calcium chelators. We have also developed a proteomic analysis of the flax hypocotyl in which we have formulated a statistical treatment to assess the significance of changes on 2-D gels of proteins. In parallel, we have developed a new method to see if these changes correspond to post-translational modifications by phosphorylation. This method, which is based on secondary ion mass spectrometry, can detect phosphorus in a spot or band after electrophoretic separation on a gel and may therefore be used to detect protein phosphorylation that can be difficult to detect by more traditional techniques.

Our proteomic analysis of flax revealed that at least 4 proteins are involved in the rapid response to mechanical *stimuli*, 7 to a cold shock and 3 to irradiation at 0.9 GHz. 5 proteins were affected by calcium channel inhibitors and by the calcium chelator EGTA whilst 7 proteins were affected by a calcium depletion (which is required for the induction of meristems). Several of these *stimuli* (from two to four) had the same effect on the same group of 5 of these proteins, consistent with this group playing a fundamental role in signal transduction of abiotic stresses in flax. One of the proteins modified in response to cold shock was identified as saccharopine dehydrogenase.

The absence of an appropriate database makes the identification of flax proteins difficult. We therefore resorted to the model plant, *Arabidopsis thaliana*, where we found 4 proteins affected both by cold shock and by irradiation for 2 h at 0.9 GHz, and 2 other proteins only affected by the irradiation. Two of the proteins affected by both *stimuli* were identified as carbonic anhydrase and as spermidine synthase. One of the proteins affected only by the irradiation at 0.9 GHz is homologous to the pherophorins.

The data we have obtained contribute to our understanding of the initial phases of signal transduction of abiotic stresses in plants. In particular, we have made the unexpected discovery that plants perceive electromagnetic radiation at GHz frequencies and that they probably do this by using abiotic signal transduction pathways.

Key words:

Flax, *Arabidopsis*, plants, meristems, 2D-electrophoresis, abiotic stress, microwaves, cold shock, channel calcium inhibitor.

Figures

Tableau 1.

Exemples de *stimuli* physiologiques qui entraînent des augmentations transitoires de la concentration cytosolique en calcium (d'après Sanders *et al.*, 1999).

Stimulus	Example of Response	Reference
Red light	Photomorphogenesis	Shacklock et al. (1992)
Abscissic acid	Stomatal closure	McAinsh et al. (1990)
Gibberellin	α -Amylase secretion	Bush and Jones (1988)
Salinity/drought	Proline synthesis	Knight et al. (1997)
Hypoosmotic stress	Osmoadaptation	Taylor et al. (1996)
Touch	Growth retardation	Knight et al. (1991)
Fungal elicitors	Phytoalexin synthesis	Knight et al. (1991)
Cold	<i>KIN1</i> gene expression	Knight et al. (1996)
Heat shock	Thermotolerance	Gong et al. (1998)
Oxidative stress	Free radical scavenger induction	Price et al. (1994)
NOD factors	Root hair curling	Ehrhardt et al. (1996)

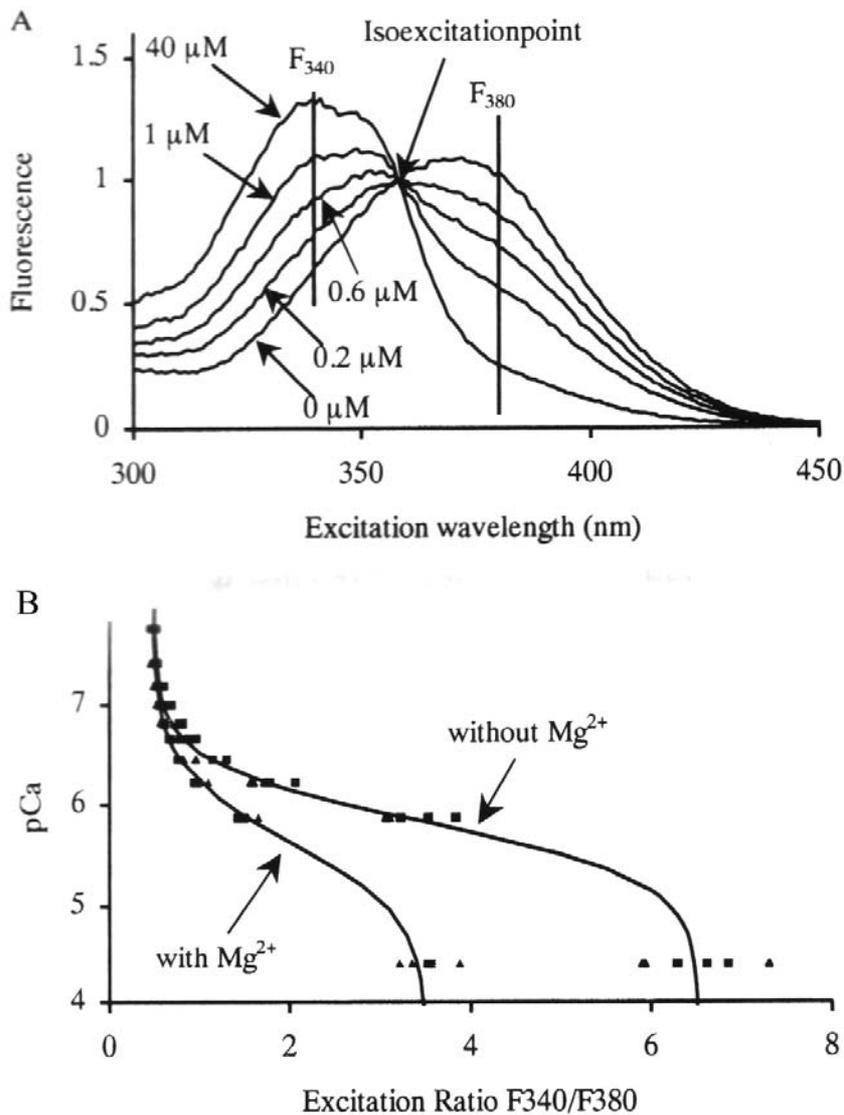


Figure 1. (A) spectres d'excitation des Fura-Dextrans à différentes concentrations de calcium. (B) Calibrage du spectre d'excitation des Fura-Dextrans en présence ou en absence de magnésium 1 mM (d'après Plieth, 2001).

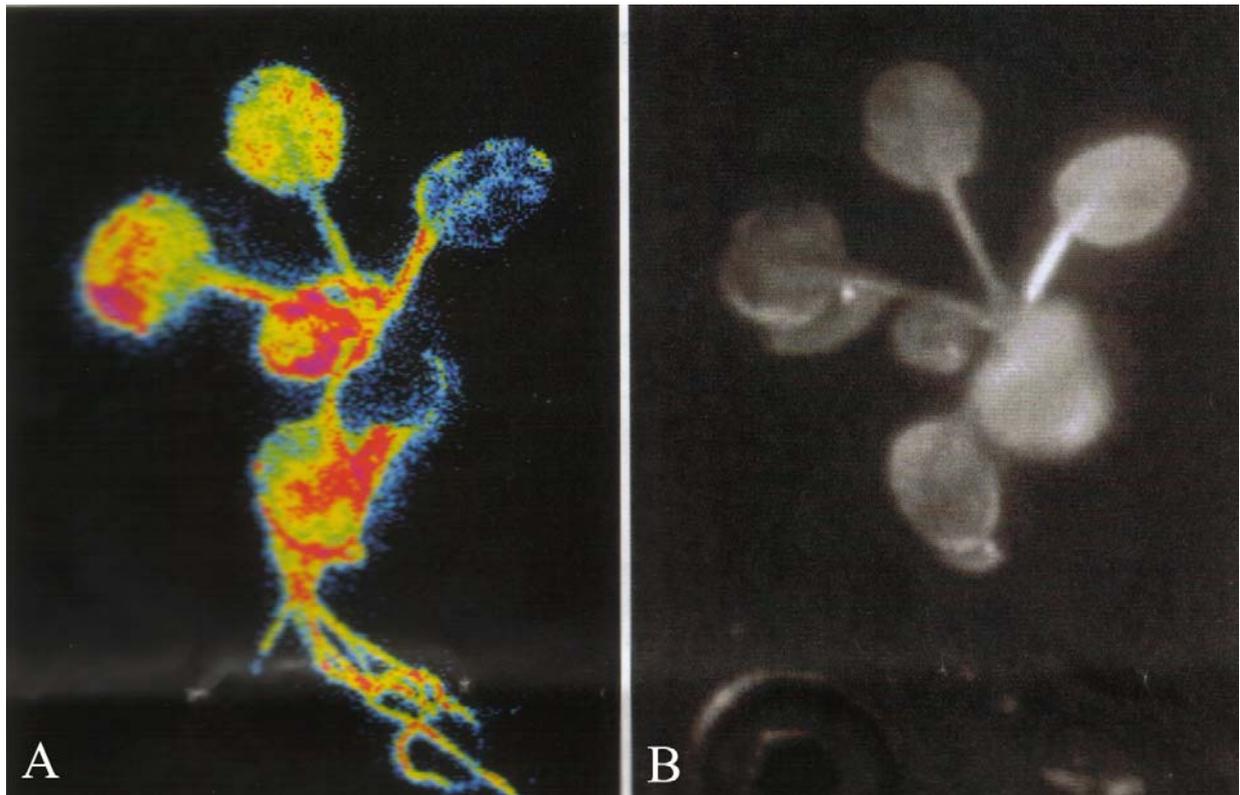


Figure 2.

Exemple de réponse à un choc de froid d'*Arabidopsis* exprimant l'apoæquorine. Les plantules sont âgées de quatre semaines. (A) image en fausses couleurs obtenue après une intégration d'un enregistrement par caméra photonique de 200 secondes. (B) est l'image correspondant à la luminescence « naturelle » due à la présence de l'æquorine (d'après Plieth, 2001).

Tableau 2.

Tableau récapitulatif des adressages réalisés lors de l'utilisation du système *æquorine* dans les différents compartiments et tissus chez les végétaux (d'après Plieth, 2001).

Location	Targeting sequence (strategy)	Reference or source
Chloroplast	organelle-specific leader of small subunit of RuBisCo	Johnson et al. 1995
Endoplasmic reticulum	chitinase + HDEL retention	N. J. Watkins et al., Cardiff, unpubl.
Nucleus	nucleoplasmin	van der Luit et al. 1999
Cytoplasmic face of endoplasmic reticulum	domain-specific cytochrome <i>b₅</i>	A. Haley et al., Edinburgh, unpubl.
Tonoplast	H ⁺ -PPase	H. Knight et al. 1996
Cytosol	compartment-specific CaMV 35S promotor	M. Knight et al. 1991
Apoplast (= cell wall)	chitinase signal sequence	C. Plieth and M. Knight unpubl.
Epidermal cells	tissue-specific cDeT6-19 promotor	N. Wood et al., Edinburgh, unpubl.
Guard cells	KST1 promotor	Wood et al. 2000
Pollen	G10 promotor	A. Haley et al., Edinburgh, unpubl.
Root epidermal cells	enhancer trapped GAL4	Kiegle et al. 2000
Root endodermal cells	enhancer trapped GAL4	Kiegle et al. 2000
Root pericycle cells	enhancer trapped GAL4	Kiegle et al. 2000

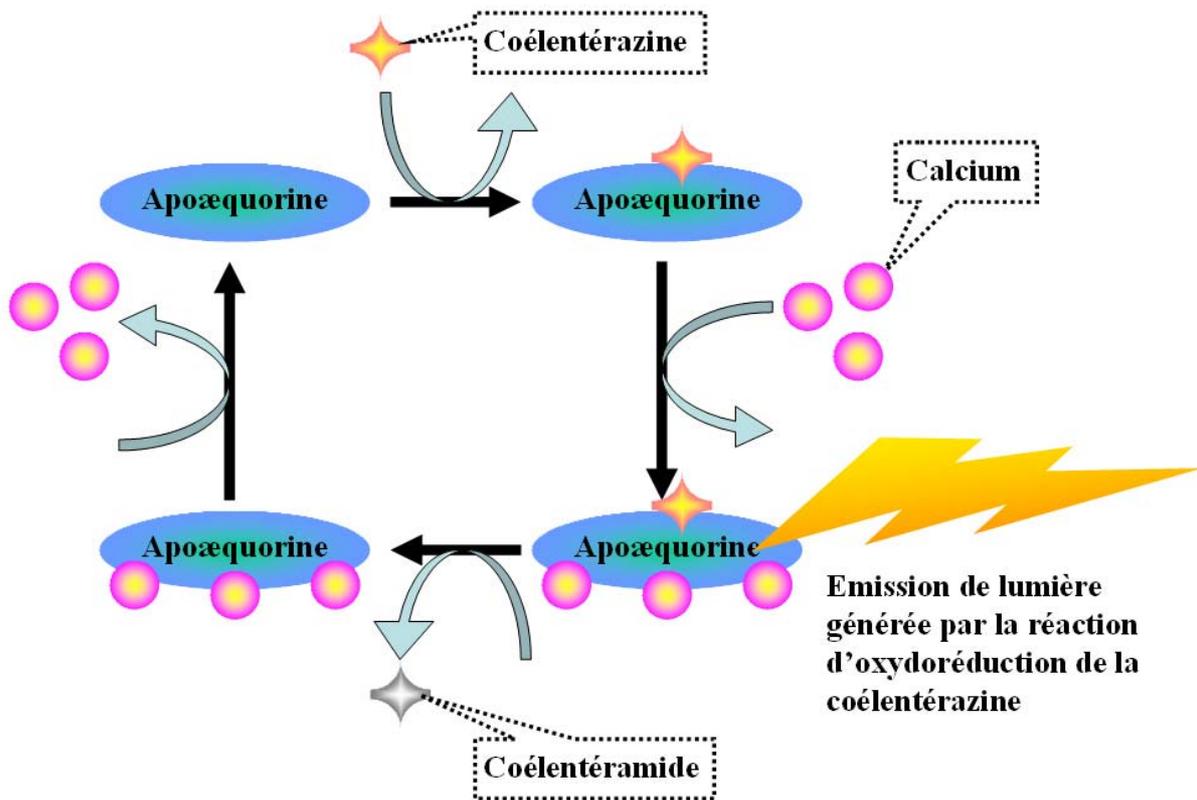


Figure 3.

Principe du cycle de l'æquorine. L'æquorine est reconstituée en présence d'oxygène, de coéentérazine et d'apoæquorine (étape qui dure généralement quelques heures lors de la reconstitution dans les plantes). Après reconstitution de la protéine lumineuse, la fixation avec le calcium entraîne la libération de lumière à 469 nm ainsi que de dioxyde de carbone et de coéentéramide (la coéentérazine oxydée). Il y a ensuite libération du calcium par l'apoæquorine qui peut effectuer un nouveau cycle à condition de renouveler l'étape de reconstitution avec de la coéentérazine (d'après Plieth, 2001).

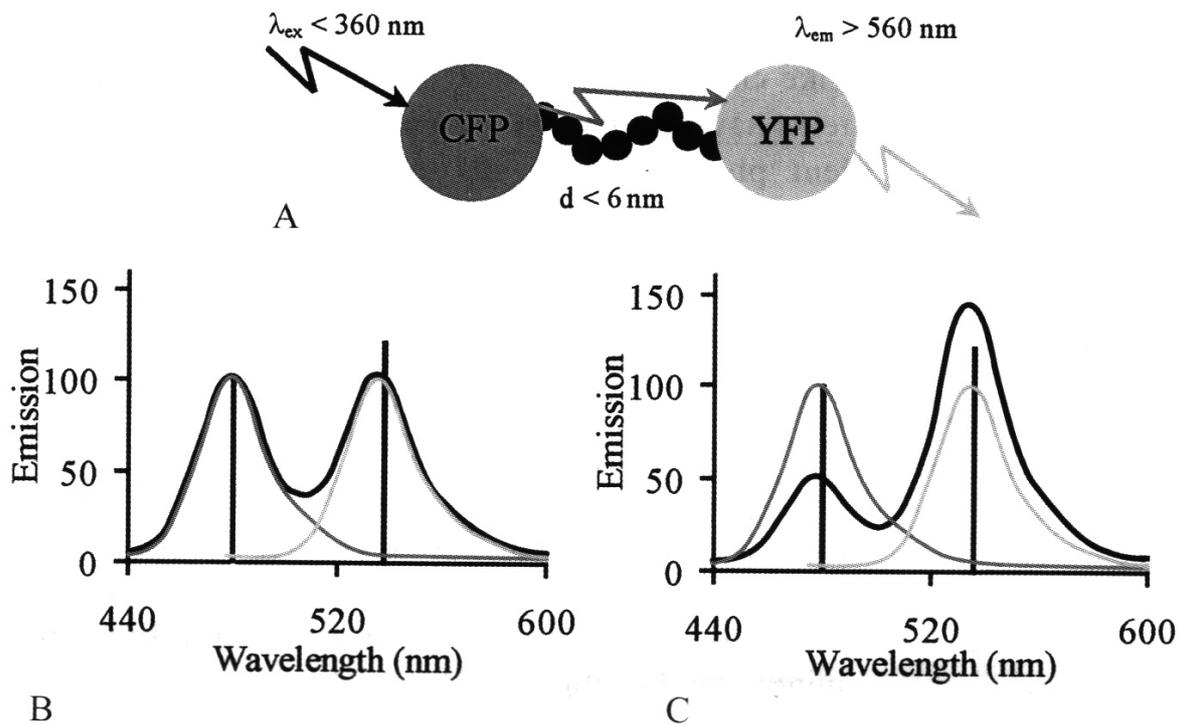


Figure 4.

(A) représentation schématique du principe des caméléons. CFP est l'accepteur (dérivé de la *Green Fluorescent Protein*) et YFP est l'émetteur. Le bras entre les deux parties du caméléon a une longueur qui dépend de la concentration en calcium. (B) et (C) représentent les différents spectres d'émission du groupement émetteur YFP en fonction de la longueur du bras. Si la distance est inférieure à 6 nm le spectre d'émission correspond à la figure (C) et montre une augmentation significative du signal à 530 nm. Le seul défaut de ces molécules permettant d'imager le calcium intracellulaire est la sensibilité aux pH inférieurs à 7 et une spécificité au calcium quelque peu discutable (d'après Plieth, 2001).

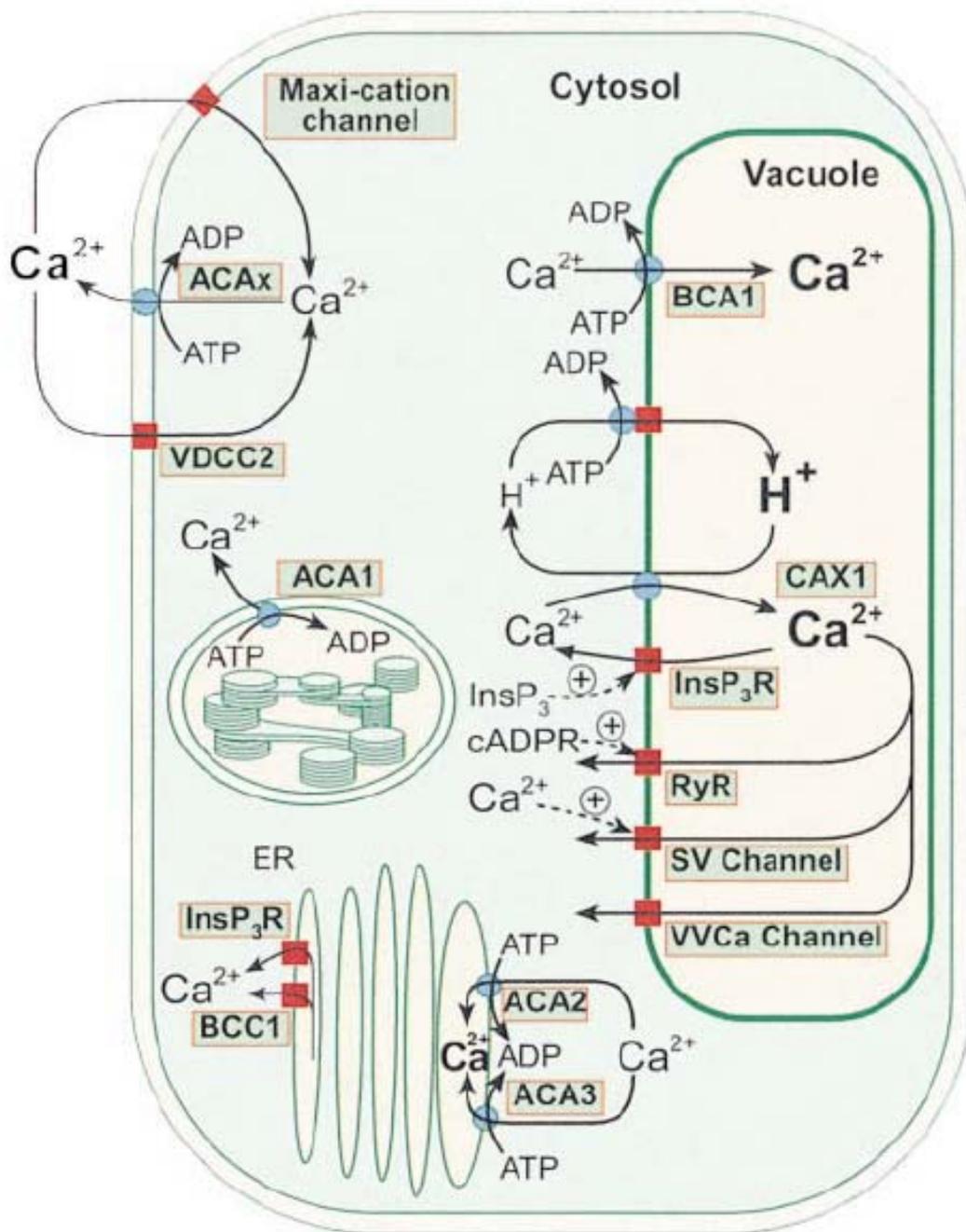


Figure 5.

Représentation schématique de la plupart des systèmes de transport du calcium chez les végétaux. Les carrés rouges représentent des canaux perméables au calcium ou des transporteurs passifs. Les ronds bleus représentent les transporteurs actifs primaires ou secondaires. Les appellations utilisées pour les différentes protéines sont précisées dans le texte ainsi que les références correspondantes (d'après Sanders *et al.*, 1999).

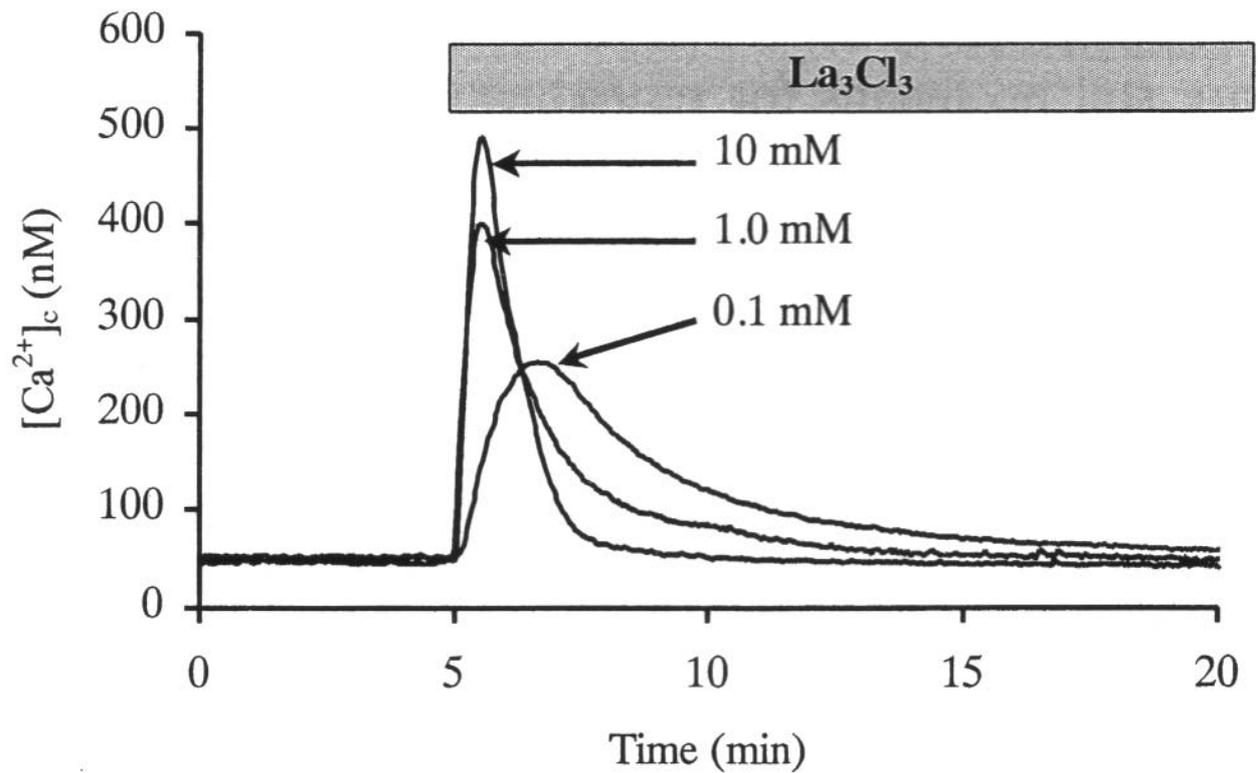


Figure 6. Modifications de la concentration en calcium du cytoplasme de racines d'*Arabidopsis* exprimant l'æquorine à la suite d'un ajout de chlorure de lanthane à différentes concentrations dans le milieu de culture (d'après Plieth, 2001).

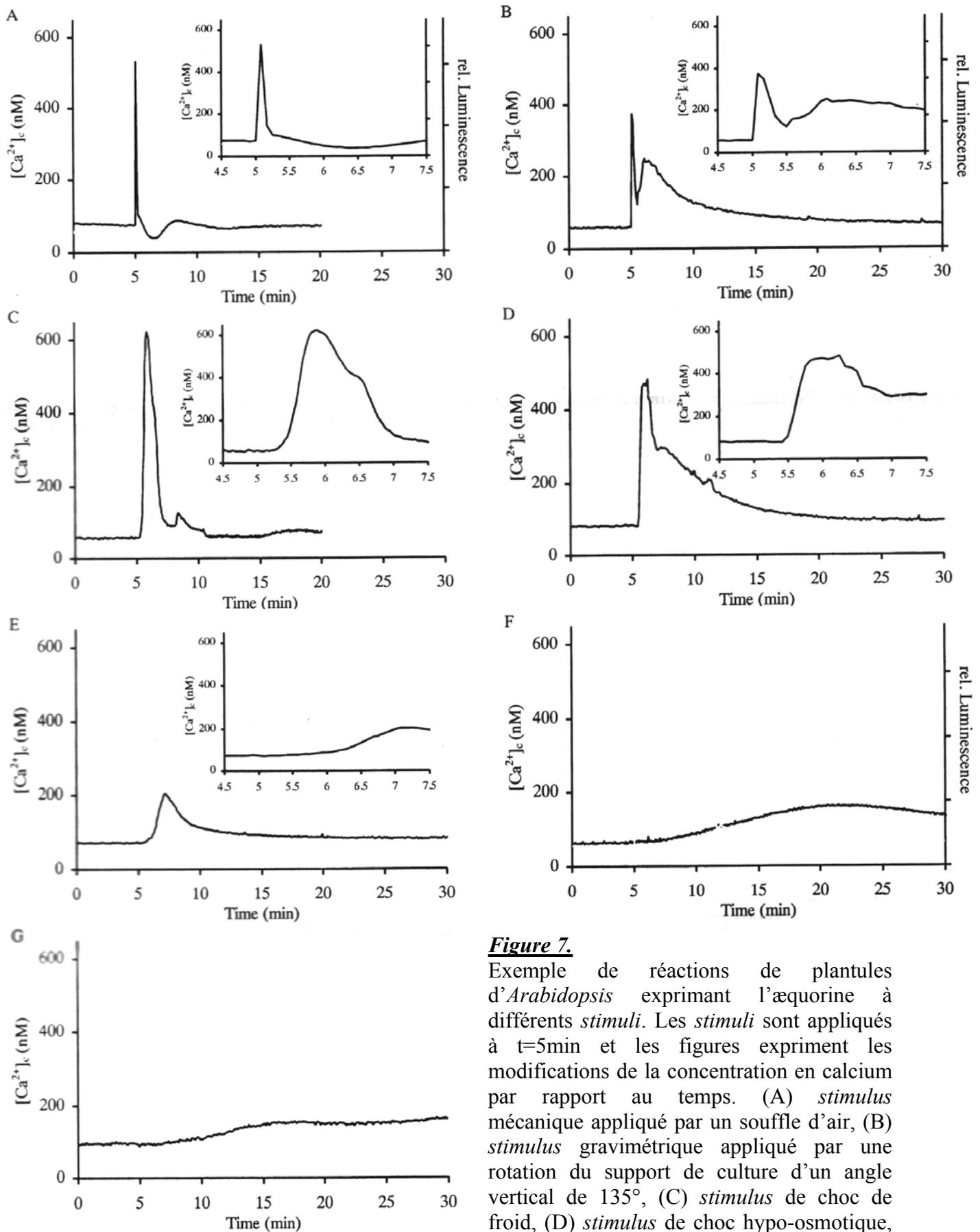


Figure 7.

Exemple de réactions de plantules d'*Arabidopsis* exprimant l'æquorine à différents *stimuli*. Les *stimuli* sont appliqués à $t=5\text{min}$ et les figures expriment les modifications de la concentration en calcium par rapport au temps. (A) *stimulus* mécanique appliqué par un souffle d'air, (B) *stimulus* gravimétrique appliqué par une rotation du support de culture d'un angle vertical de 135° , (C) *stimulus* de choc de froid, (D) *stimulus* de choc hypo-osmotique, (E) *stimulus* de choc hyper-osmotique,

(F) *stimulus* crée par ajout d'auxine dans le milieu de culture, (G) *stimulus* d'anoxie sous atmosphère d'azote. Les cartouches dans les figures A, B, C, D et E représentent des échelles de temps plus fines (d'après Plieth, 2001).

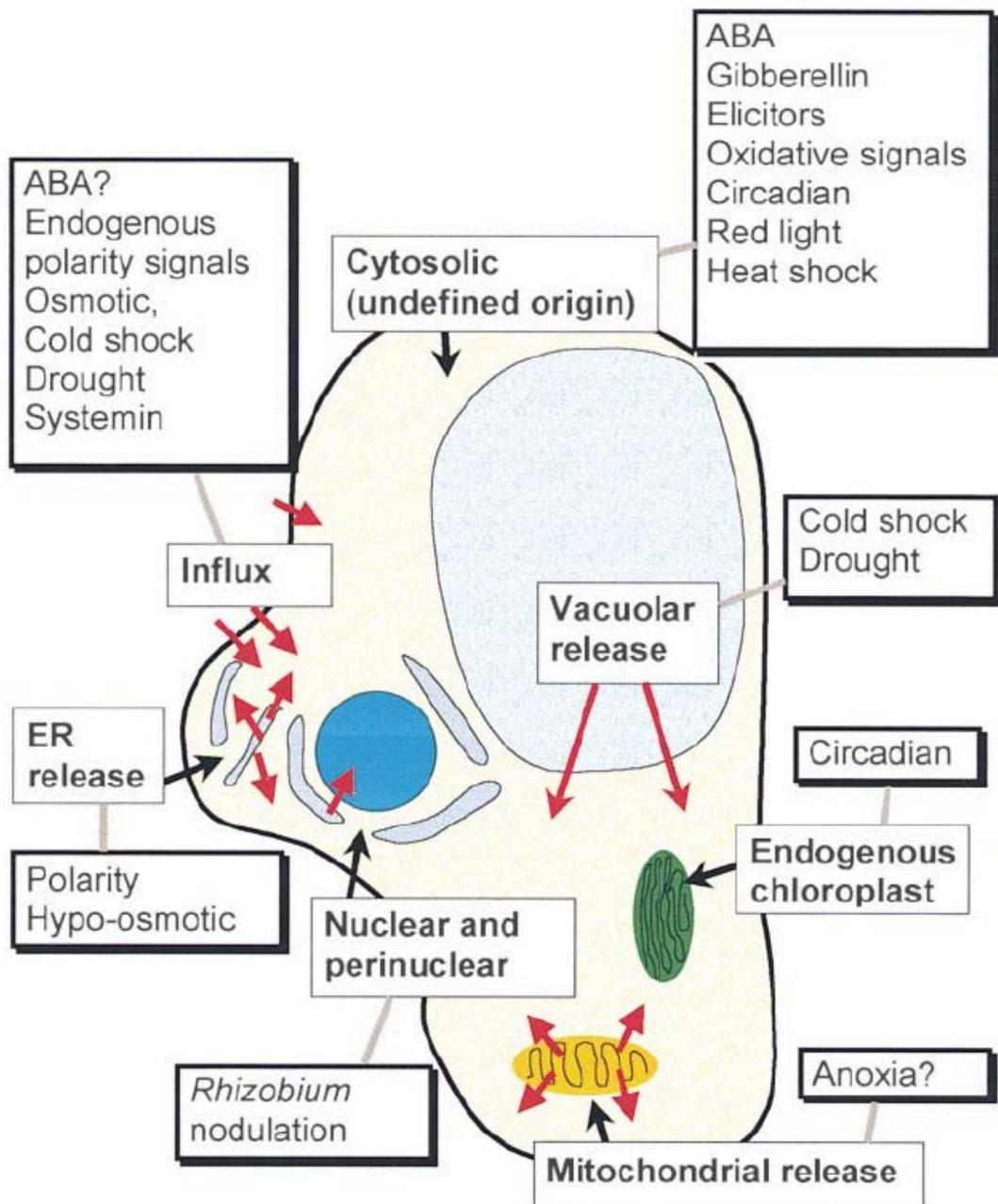


Figure 8.

Représentation schématique des origines et des localisations des influx et efflux de calcium en réponse à certains *stimuli* spécifiques. Les flèches rouges indiquent les principaux flux de calcium en cas de réponses cellulaires à certains stress (d'après Sanders *et al.*, 1999).

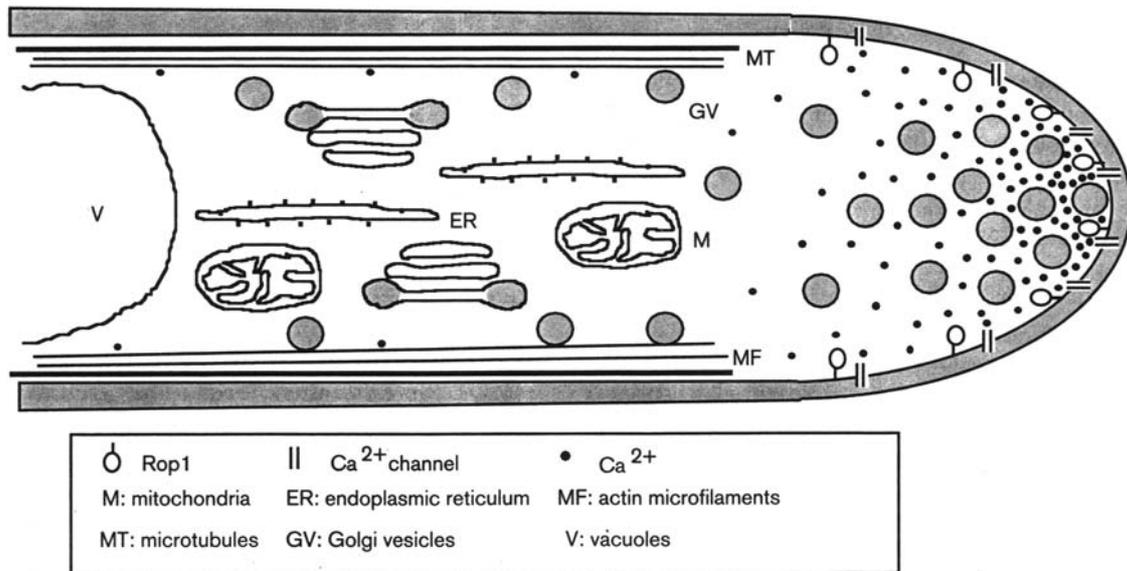


Figure 9.

Schéma d'un tube pollinique dont les structures d'importance majeure dans la croissance sont représentées. Les gradients de calcium et de vésicules golgiennes sont localisés dans le sens de la croissance. La vacuole se trouve à proximité du pôle basal de la cellule ce qui permet la génération d'oscillations de calcium (le cytoplasme ayant vraiment une structure tridimensionnelle) dans toute la structure du tube pollinique. Rop1 est une GTPase intervenant dans la mise en place des faisceaux d'actine (d'après Yang, 1998).

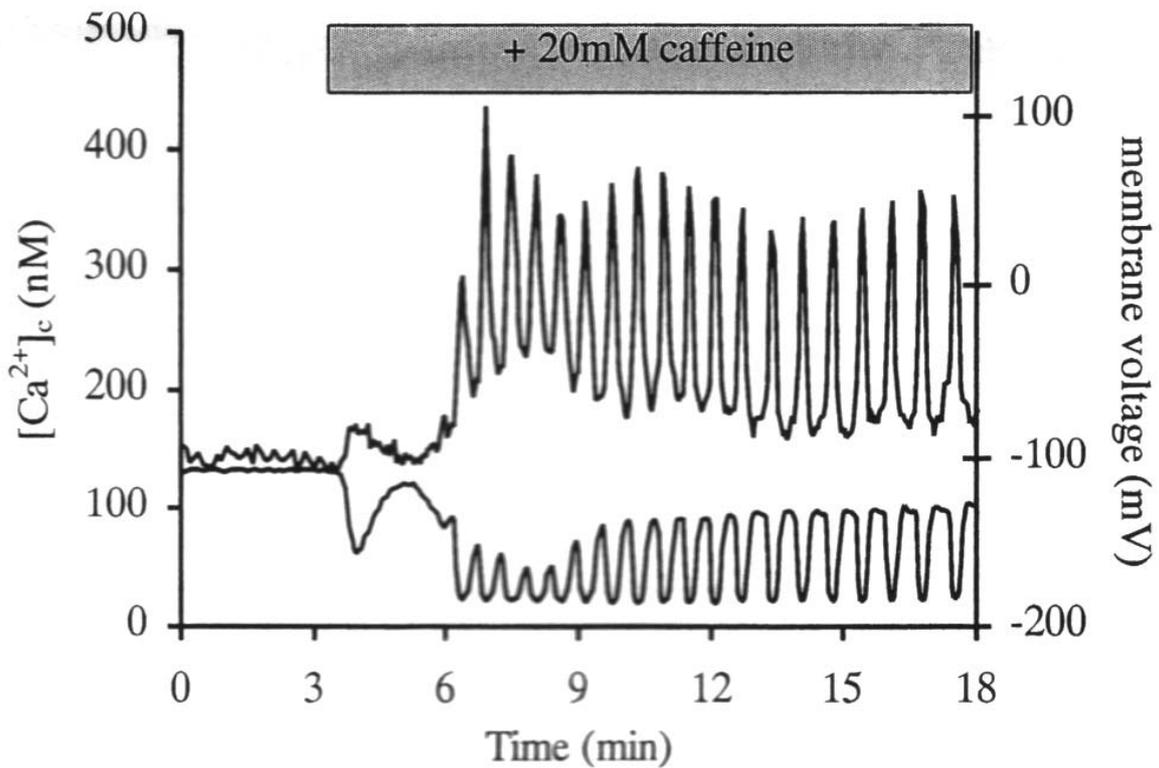


Figure 10.

Oscillations visualisées par Fura-dextrans de la concentration en calcium dans des cellules d'*Eremosphaera viridis* (cellules d'algues). Ces oscillations sont générées avec l'ajout de caféine dans le milieu de culture et n'ont apparemment aucune signification cellulaire. La courbe du haut représente les variations de la concentration en calcium et la courbe du bas les modifications de la différence de potentiel de la membrane (d'après Plieth, 2001).

Tableau 3.

Activation de MAPKs et de protéines apparentées aux MAPKs par les stress environnementaux chez les végétaux (d'après Ichimura *et al.*, 2000).

Activation of MAPK and MAPK-like protein kinase by environmental stresses

Source	Protein kinase	Molecular mass	Signal(s)	References
Tobacco		47 kDa	Elicitor, touch	Suzuki and Shinshi (1995)
Tobacco	PMSAPK	46 kDa	Wounding, elicitor, SA	Usami <i>et al.</i> (1995)
Tobacco	WIPK ^a	46 kDa	Wounding, TMV infection, elicitor	Seo <i>et al.</i> (1995, 1999); Zhang and Klessig (1998b); Romeis <i>et al.</i> (1999)
Tobacco	SIPK ^a	48 kDa	SA, elicitor, wounding, TMV infection	Zhang and Klessig (1997, 1998a, b); Zhang <i>et al.</i> (1998); Romeis <i>et al.</i> (1999)
Tobacco	HAPK	49 kDa	Elicitor	Ádám <i>et al.</i> (1997)
Tobacco		50 kDa, 46 kDa	Elicitor	Lebrun-Garcia <i>et al.</i> (1998)
Alfalfa	MMK4 ^a (SAMK)	44 kDa	Cold, drought, touch, wounding	Bögre <i>et al.</i> (1996, 1997); Jonak <i>et al.</i> (1996)
Parsley	ERMK ^a	45 kDa	Elicitor	Ligterink <i>et al.</i> (1997)
Tomato	MBPK	48 kDa	Systemin, wounding	Stratmann and Ryan (1997)
<i>Arabidopsis</i>	ATMPK4 ^a	43 kDa	Cold, drought, touch, wounding	Ichimura (1999)

^aCorresponding genes have been cloned.

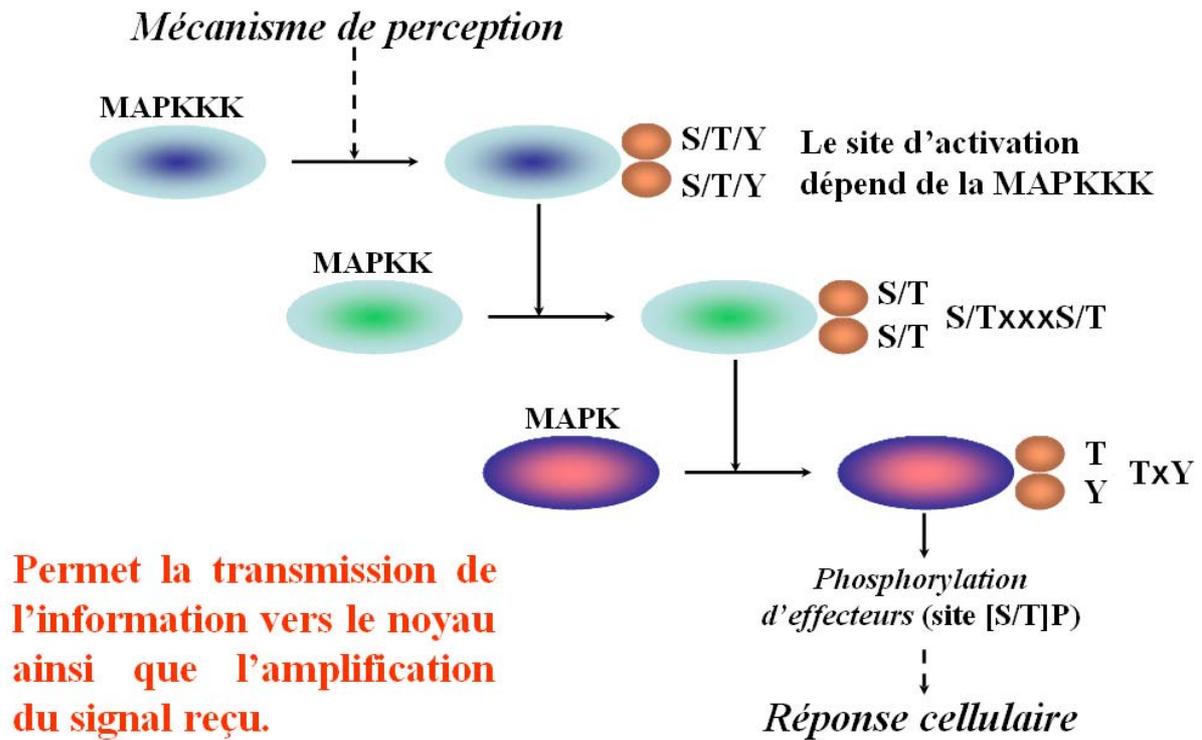


Figure 11.

Illustration schématique du fonctionnement de la voie des MAPKs. Des récepteurs perçoivent des stimuli extracellulaires et activent les MAPKKKs. Cette étape fait généralement intervenir d'autres facteurs comme des protéines G ou des protéines kinases. L'activation des MAPKKKs se produit à la suite d'une phosphorylation et résulte en l'activation des MAPKKs. Les MAPKKKs sont aussi capables d'activer des protéines kinases (PK) d'autres voies de signalisation. Les MAPKKs activent les MAPKs dont les cibles sont différents substrats comme des facteurs de transcription, des protéines du cytosquelette, d'autres kinases ou des phosphatases (d'après Hirt, 2000).

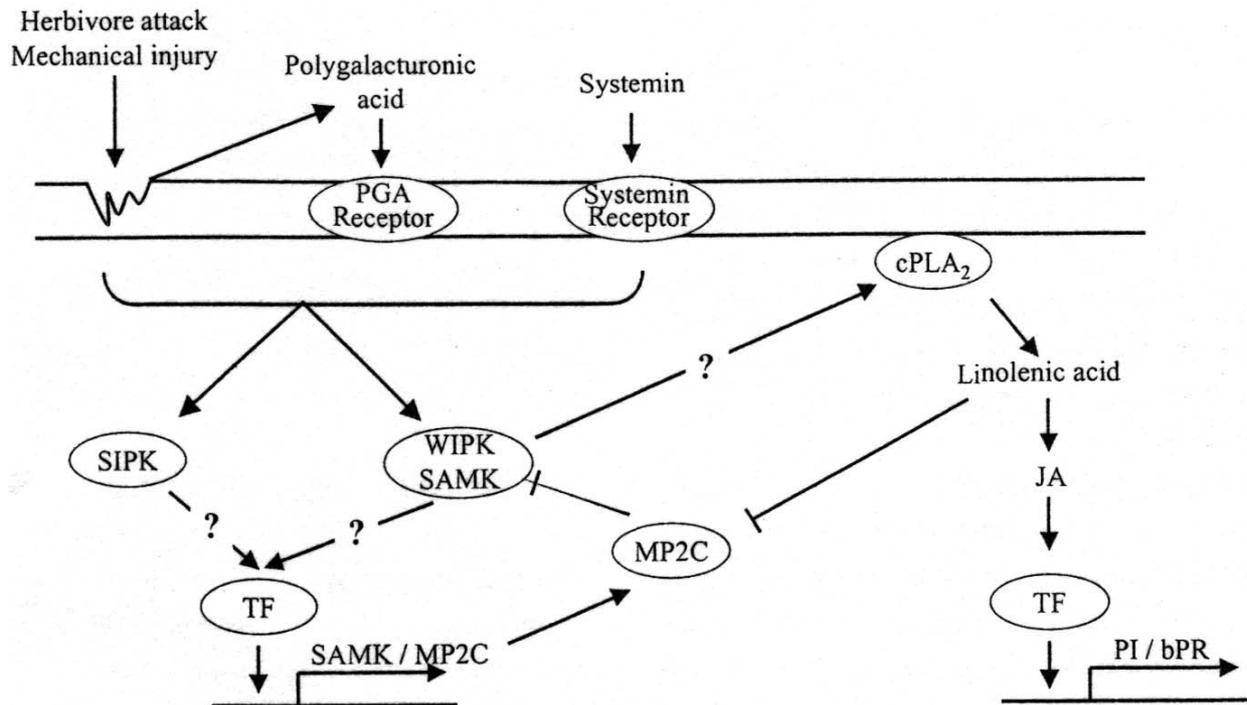


Figure 12.

Réponse cellulaire à un stress de blessure. Une attaque d'herbivore ou un stress mécanique lésant active les protéines SIPK et WIPK/SAMK soit directement soit par la voie des polygalacturonides ou de la systémine. La protéine WIPK/SAMK active cPLA₂ ainsi que la transcription de gènes incluant *SAMK* et *MP2C*, qui inactivent la voie des SAMK. La protéine *MP2C* est aussi inactivée par l'acide linoléique (le premier produit activé par cPLA₂). WIPK/SAMK est responsable de la production de l'acide jasmonique ainsi que de l'expression des gènes inducibles par l'acide jasmonique comme les gènes codant les protéines *PI* ou *bPR*. Les points d'interrogation pointent les voies incertaines ou les composants inconnus. Les flèches indiquent une activation et les barres une inhibition (d'après Meskiene and Hirt, 2000).

Tableau 4.

Exemples de quelques modules His-Asp (systèmes à deux composants) chez les végétaux supérieurs. Les références se retrouvent dans le texte (d'après Sakakibara *et al.*, 2000).

Modules	Species	Genes	Note
Sensor kinase	<i>A. thaliana</i>	<i>ETR1, ETR2, EIN4, ERS, ERS2</i>	Ethylene receptor
	Tomato	<i>LeETR1, LeETR2, LeETR4, LeETR5, LeNr</i>	Ethylene receptor
	<i>A. thaliana</i>	<i>CKII</i>	Cytokinin receptor ?
	<i>A. thaliana</i>	<i>ATHK1</i>	Osmosensing ?
Response regulator	<i>A. thaliana</i>	<i>ARR1</i> to <i>ARR14</i>	Type B: <i>ARR1, ARR2, ARR10–ARR14</i> ; Type A: <i>ARR3</i> to <i>ARR9</i> . Type A are cytokinin-inducible
HPt	Maize	<i>ZmRR1, ZmRR2</i>	Cytokinin-inducible
	<i>A. thaliana</i>	<i>AHP1</i> to <i>AHP3</i>	
	Maize	<i>ZmHP1, ZmHP2</i>	

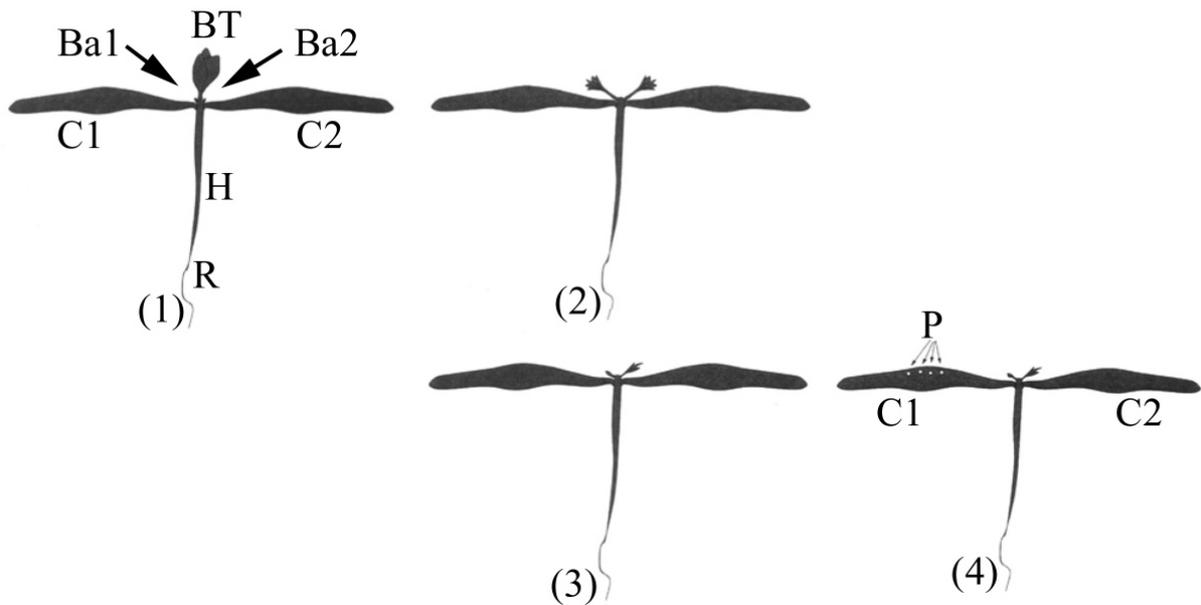


Figure 13.

(1) Représentation schématique d'une plantule de *Bidens pilosa* âgée de trois semaines. BT représente le bourgeon terminal, C1 et C2 les cotylédons, Ba1 et Ba2 les bourgeons axillaires, H l'hypocotyle et R la racine. (2) et (3) représentent des schémas de croissance des bourgeons axillaires après la levée de la dominance apicale. (2) est une croissance symétrique alors que (3) représente le cas d'une rupture de croissance symétrique après l'application d'un stress de blessure sur l'un des cotylédons comme cela est représenté sur la troisième partie (4) de la figure par la lettre P (d'après Thellier *et al.*, 2000).

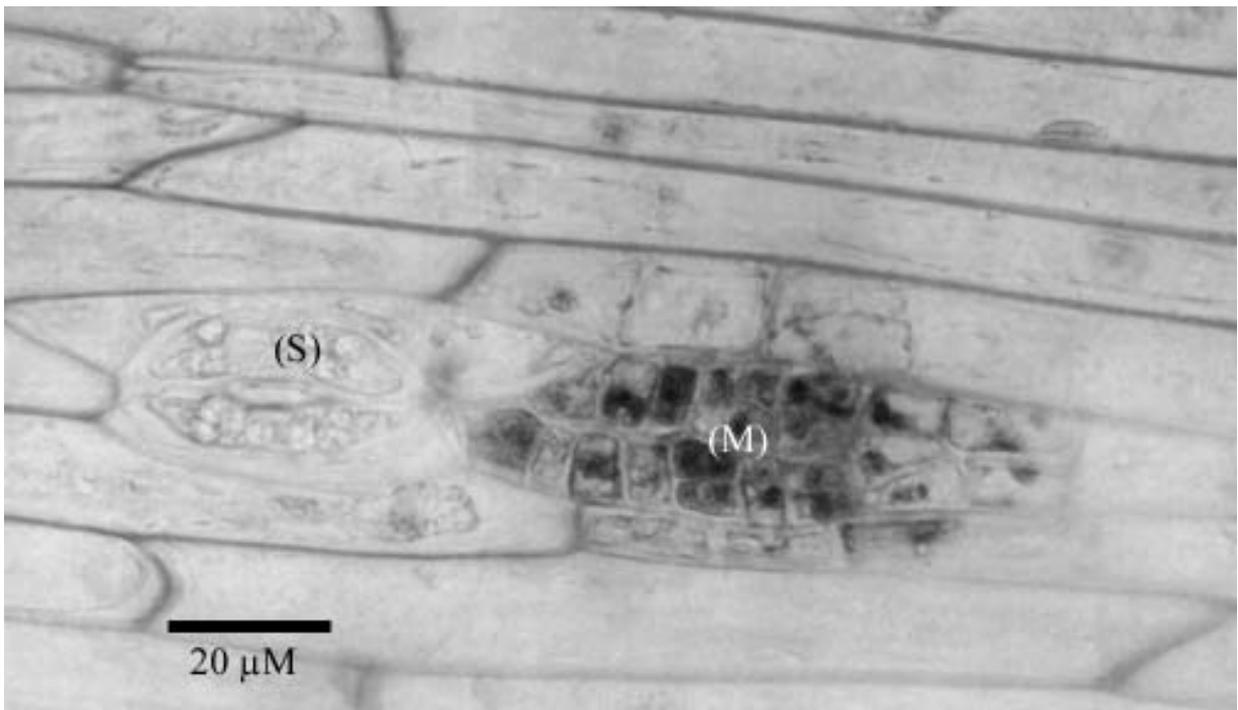


Figure 14.

Photographie par microscopie photonique d'un méristème épidermique d'un hypocotyle de lin âgé de 4 semaines. (S) stomate, (M) méristème (d'après Verdus *et al.*, 1997).

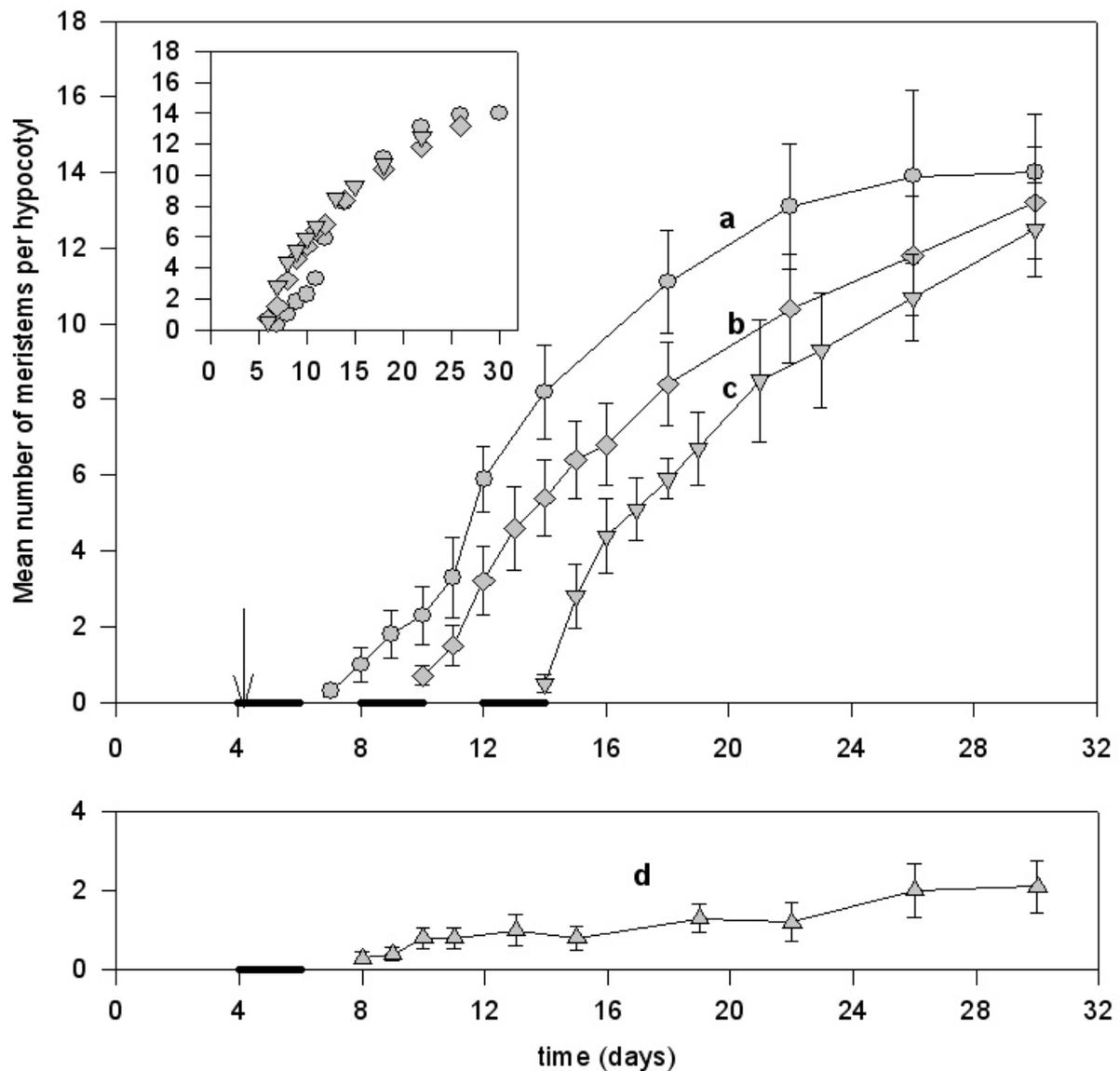


Figure 15.

Induction de méristèmes épidermiques chez le lin.

La courbe (a) montre un exemple de cinétique de production des méristèmes après un stress de repiquage et une déplétion en calcium du milieu de culture pendant 2 jours. Les plantes ont été repiquées sur le milieu sans calcium à l'âge de 4 jours. Les méristèmes commencent à apparaître dès la fin de la déplétion en calcium. La courbe (d) montre que la seule déplétion en calcium est insuffisante pour produire des méristèmes. Les courbes (b) et (c) montrent la capacité des plantules à stocker une information. Elles ont été obtenues dans les mêmes conditions que celles de la courbe (a), mais avec un délai de 4 jours (courbe b) ou de 8 jours (courbe c) entre le stress de repiquage et le début de l'application des deux jours de déplétion en calcium. La cinétique de production des méristèmes est sensiblement la même dans les trois cas ; ceci est particulièrement visible dans le cartouche en haut de la figure où les courbes (b) et (c) ont été décalées vers l'origine des temps de 4 et 8 jours respectivement et qui montre que les trois courbes (a), (b) et (c) se superposent. La flèche correspond à l'application du stress de repiquage. Le trait noir correspond à la déplétion en calcium du milieu de culture.

Tableau 5.

Exemples d'effets des rayonnements électromagnétiques sur les organismes vivants.

Type of effect	Specifics	Reference
EM field effects on biochemical processes	ELF fields affect enzyme reactions	Moses and Martin, 1993; Holian <i>et al.</i> , 1996
Sensitivity to EM fields in animals and plants	Mud snail detects electric fields	Webb <i>et al.</i> , 1961
	Termites detect weak AC magnetic fields	Becker, 1976
	Humans detect magnetic fields	Baker 1984; Bell <i>et al.</i> , 1991
	Magnetotropism in plants	Barnothy, 1964; Audus, 1960
	Mollusk neuron detects GMF	Lohmann <i>et al.</i> , 1991
Effects of applied fields on neurophysiology	ELF AC magnetic fields cause calcium efflux in brain tissue	Blackman, 1984; Blackman <i>et al.</i> 1988
	Weak AC magnetic fields alter analgesia	Kavaliers and Ossenkopp, 1986a, 1986b
	DC magnetic field alters EEG	Kholodov, 1966
EM fields and higher-level neurobiology and behavior	Animals avoid certain fields	Sheppard and Eisenbud, 1977; Rai, 1986; Kermarrec, 1981
	Applied fields alter behavior	Persinger 1974a; Horn, 1981
	Applied fields affect learning rates in mammals	Levine <i>et al.</i> , 1995; Lai <i>et al.</i> , 1998
	Depth of hypnosis correlates with electric measurements on skin	Ravitz, 1959; Friedman <i>et al.</i> , 1962; Ravitz, 1962
Applied fields affect several systems in human body	Reproductive effects	Brewer, 1979; Krueger <i>et al.</i> , 1975
	Skeletal system; applied fields used clinically to improve bone growth	Nagai and Ota, 1994, McCleary <i>et al.</i> , 1991; Bruce <i>et al.</i> , 1987
	Circadian cycle changes	McBride and Comer, 1975; Scaiano, 1995; Brown and Scow, 1978
	Immune effects	Reviewed in Smialowicz 1987
Applied fields can affect gene expression	Transcription and translation rates are all altered by field exposure	Liboff <i>et al.</i> , 1982; Greene <i>et al.</i> 1991; Goodman <i>et al.</i> , 1985; Goodman and Henderson, 1988; Lai and Singh; 1997
Applied fields affect cell behavior and parameters	Cell motility and galvanotaxis	Reviewed in McCaig and Zhao; 1997
	Applied fields can cause differentiation and even dedifferentiation!	Robinson, 1985; Becker and Marino, 1982; Harrington and Becker, 1973; Chiabrera <i>et al.</i> , 1979, 1980; Grattarola, 1985
	Changes in growth rate	Patel <i>et al.</i> , 1985; Ross, 1990
ELF fields and ionizing radiation	Exposure to ELF fields mitigates effects of ionizing radiation	Barnothy, 1963a; Zecca <i>et al.</i> , 1984; Amer and Tobias, 1965

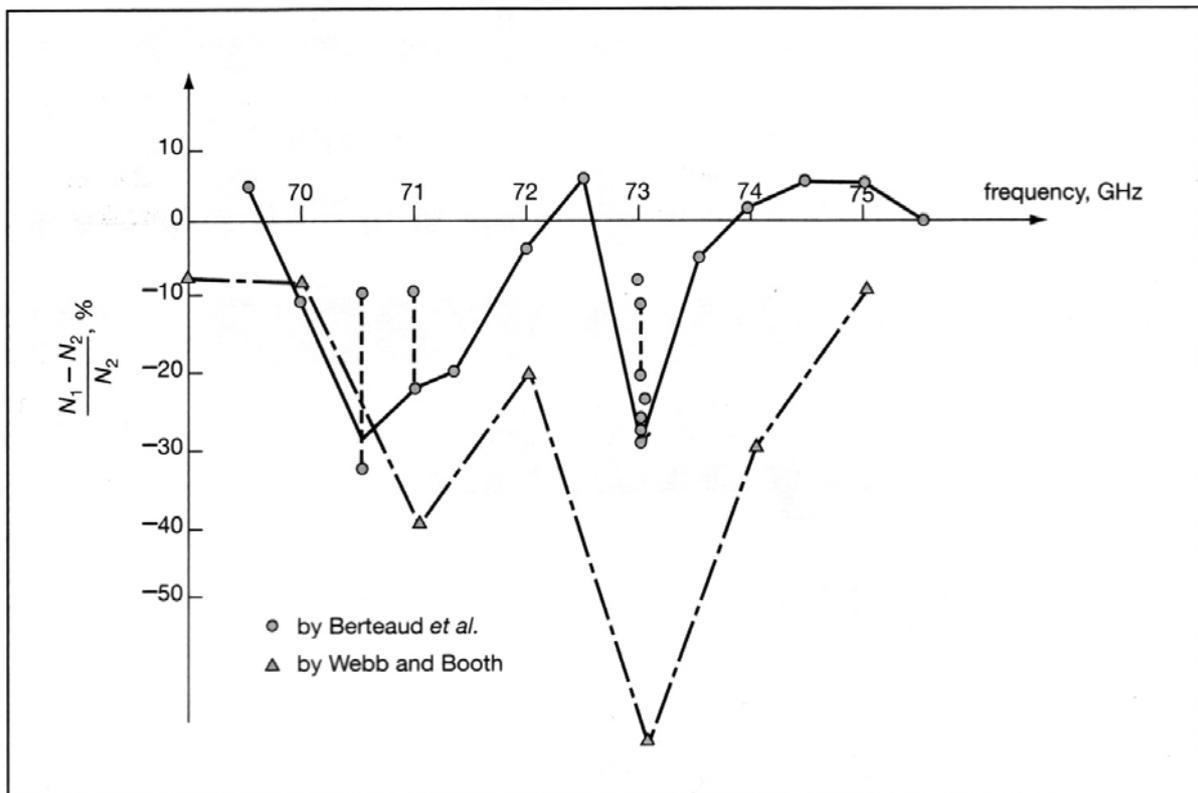


Figure 16.

Croissance normalisée d'*E. coli* en fonction de la fréquence des micro-ondes appliquées. N_1 est le nombre de bactéries soumises aux rayonnements électromagnétiques et N_2 le témoin sans irradiation. D'après Berteaud *et al.*, 1975 et Webb and Booth, 1969.

Tableau 6.

Récapitulatif des conditions expérimentales pour l'analyse des effets des inhibiteurs de canaux calciques et de chélateur de calcium sur l'induction des méristèmes épidermiques par différents *stimuli*.

Expérience	Condition d'application du <i>stimulus</i>							
	Pré-incubation			Type de stimulus appliqué	Laps de temps (min)	Post-incubation		
	Substance	Concentration (µM)	temps d'incubation (min)			Substance	Concentration (µM)	temps d'incubation (min)
T (ss Depl)								
T Rep (ss Depl)								
T								
T Rep								
-PO4						-PO4		1440
Rep -PO4 (ss Depl)				Rep		-PO4		1440
DLT				DLT				
CF				CF				
CF 1h CF				CF	60	CF		
La						La	10	1440
CF La 1 min				CF		La	10	1
CF La 5 min				CF		La	10	5
CF La 10 min				CF		La	10	10
CF La 30 min				CF		La	10	30
La 1 min CF	La	10	1	CF				
La 5 min CF	La	10	5	CF				
La 10 min CF	La	10	10	CF				
La 30 min CF	La	10	30	CF				
CF La 4h				CF		La	10	240
CF 1 min La 4h				CF	1	La	10	240
CF 2 min La 4h				CF	2	La	10	240
CF 5 min La 4h				CF	5	La	10	240
CF EGTA 3h				CF		EGTA	2330	180
EGTA 3h CF	EGTA	2330	180	CF				
CF 1 min EGTA 3h				CF	1	EGTA	2330	180
CF 2 min EGTA 3h				CF	2	EGTA	2330	180
CF 5 min EGTA 3h				CF	5	EGTA	2330	180
RR 50µM DLT	RR	50	120	DLT				
RR 1mM DLT	RR	1000	120	DLT				
RR CF	RR	500	120	CF				
RR CF 1h CF	RR	500	120	CF	60	CF		

T : échantillon témoin

(ss Depl) : sans déplétion calcique de deux jours

Rep : *stimulus* de repiquage

-PO4 : déplétion en Phosphate de sodium

RR : Rouge de ruthénium

La : Lanthane

DLT : descente lente en température de 24h

CF : Choc de froid d'une minute

Tableau 7.

Déroulement standard de la manipulation permettant la production de méristèmes épidermiques.

Imbibition des graines	Germination	Passage à la lumière	Pré-incubation	Application d'un <i>stimulus</i>	Post-incubation	Déplétion calcique	Croissance et prélèvements au hasard de plantules pour l'analyse statistique
pulvérisation d'eau milliQ	Trois jours à l'obscurité	Deux jours de croissance en lumière continue	Utilisation en pré-incubation d'une substance dans le milieu de culture (inhibiteur de canaux calciques ou chélateur de calcium)	Application d'un stimulus (choc de froid, descente en température, repiquage, irradiation)	Utilisation en post-incubation d'une substance dans le milieu de culture (inhibiteur de canaux calciques ou chélateur de calcium)	Déplétion calcique du milieu de culture pendant deux jours	Croissance sur milieu normal pendant trois semaines avec prélèvement de dix plantules tous les deux jours pour le comptage des méristèmes après décoloration à l'alcool 50 %

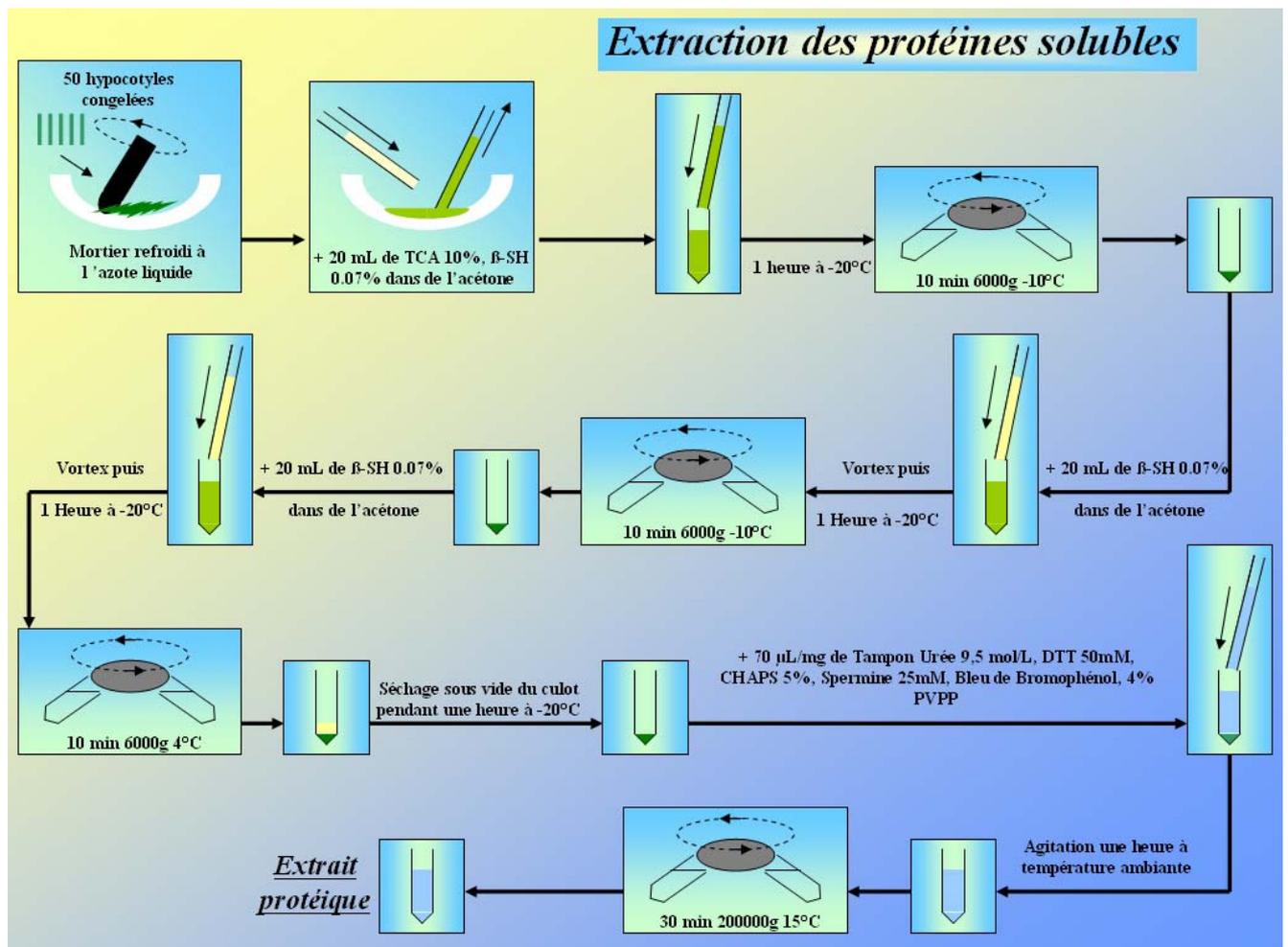


Figure 17.

Protocole d'extraction utilisé pour obtenir les extraits protéiques compatibles avec l'électrophorèse bidimensionnelle. Ce protocole est valable pour les plantules de lin (variétés Ariane et Barbara) ainsi que pour *Arabidopsis*.

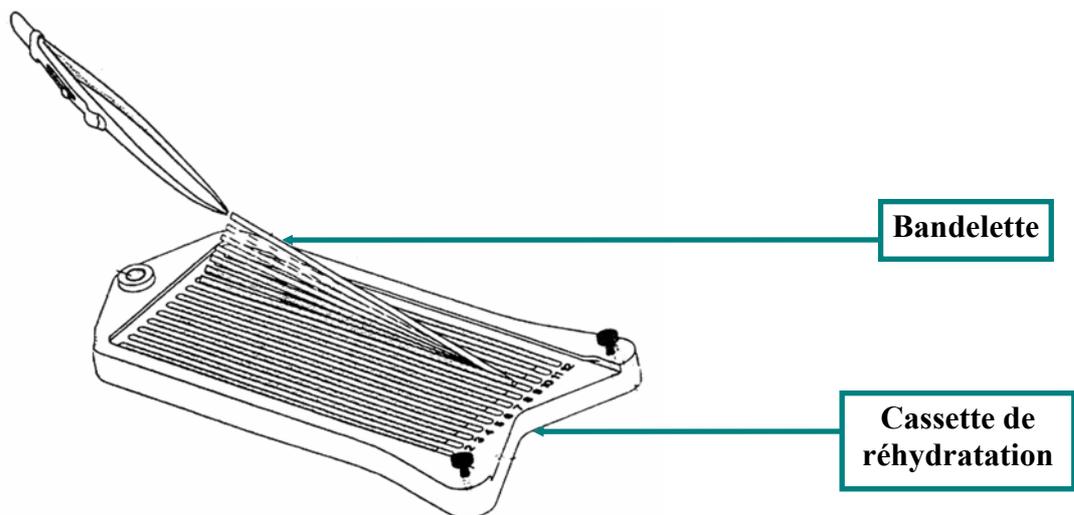


Figure 18.
Réhydratation des DryStrips dans la cassette de réhydratation Pharmacia.

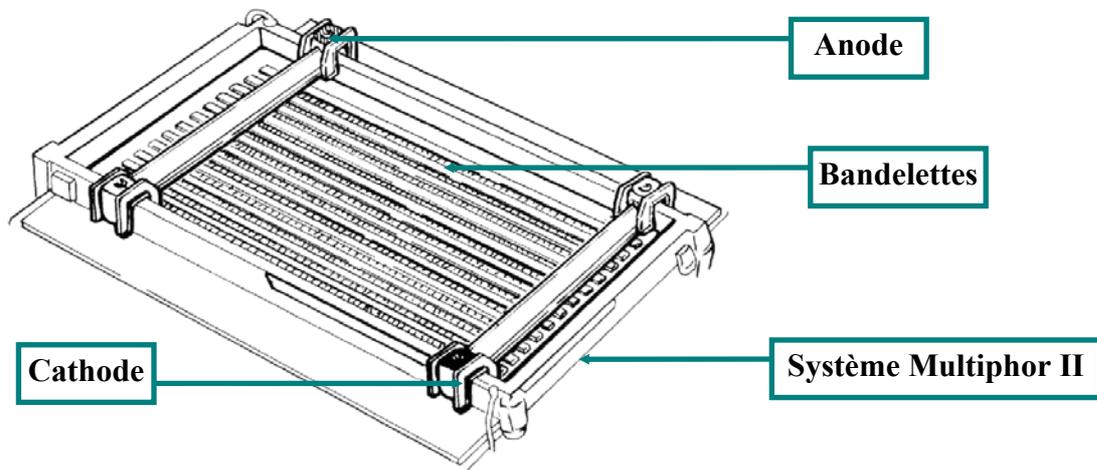


Figure 19.
Focalisation isoélectrique sur un système Multiphor II de Pharmacia.

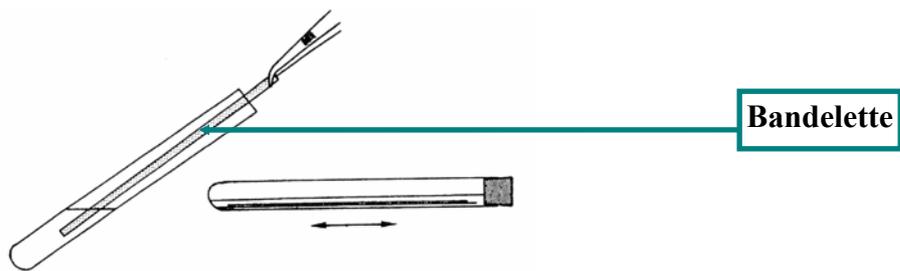


Figure 20.

Rééquilibration des DryStrips après la focalisation isoélectrique pour permettre aux protéines de migrer en conditions SDS-PAGE.

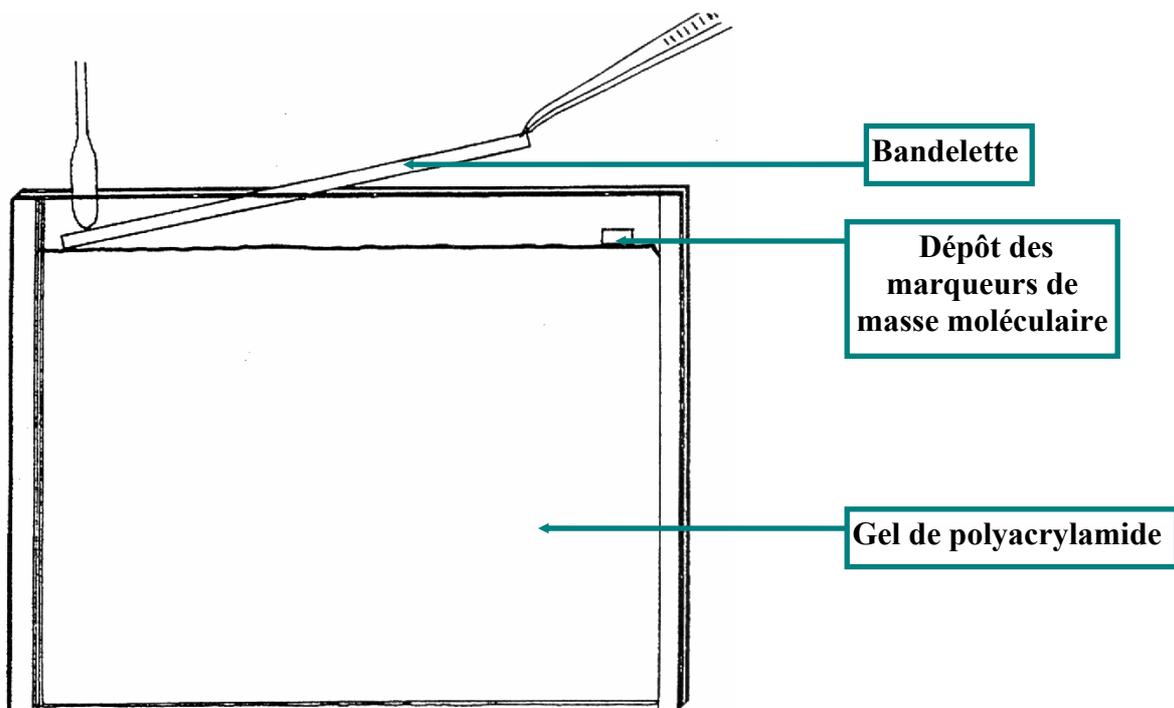


Figure 21.

Séparation des protéines en deuxième dimension (SDS-PAGE).

Principe de la détection d'activité tyrosine kinase

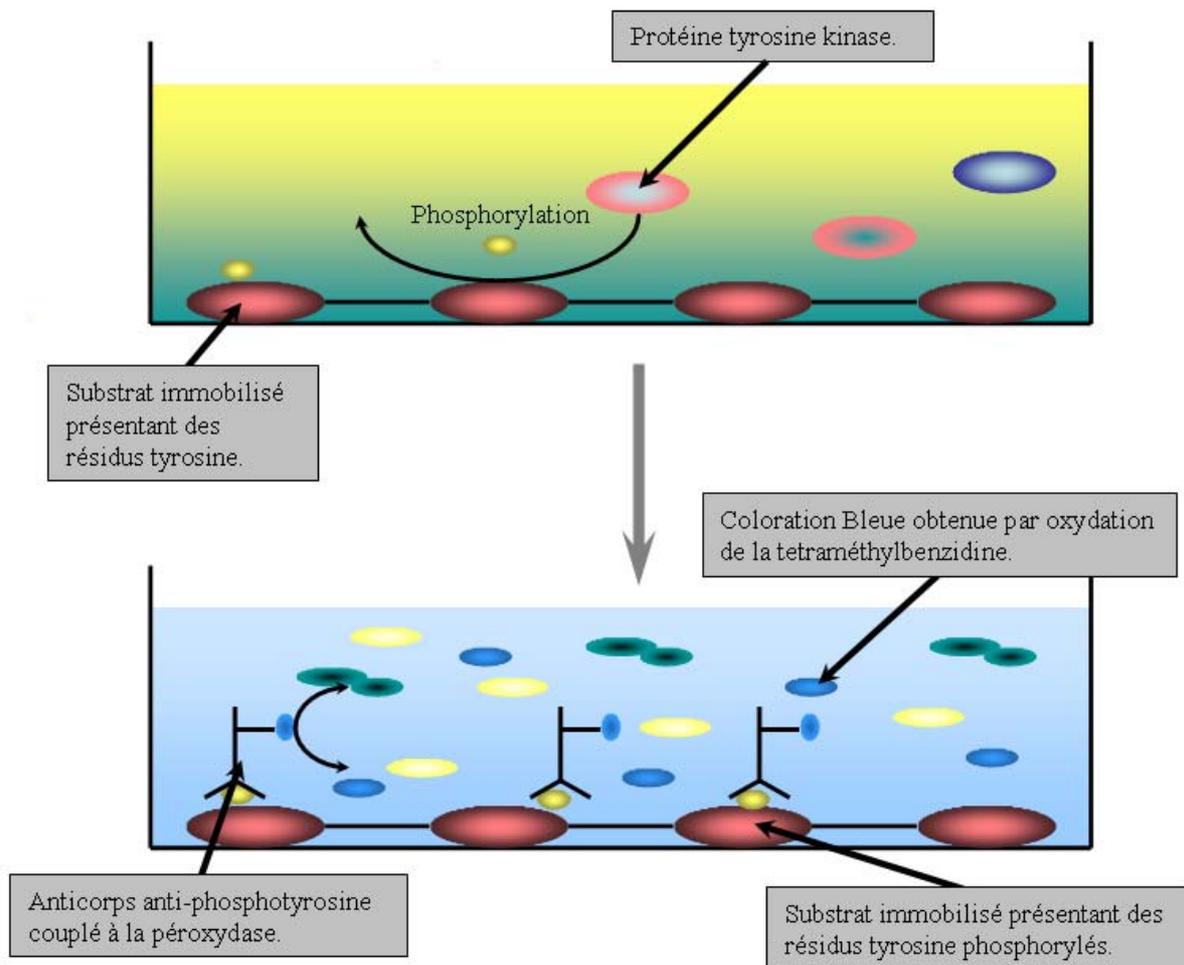
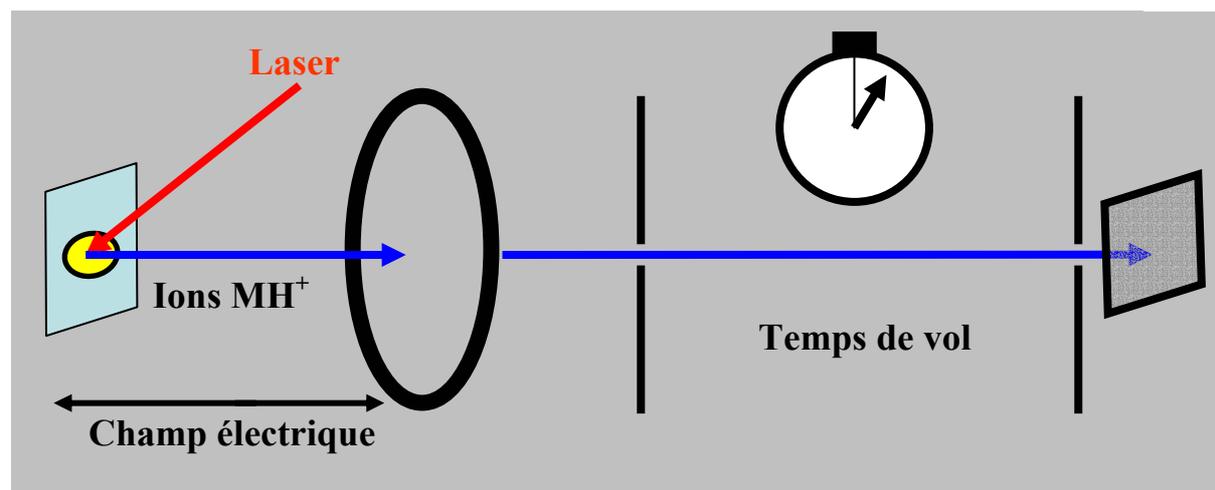
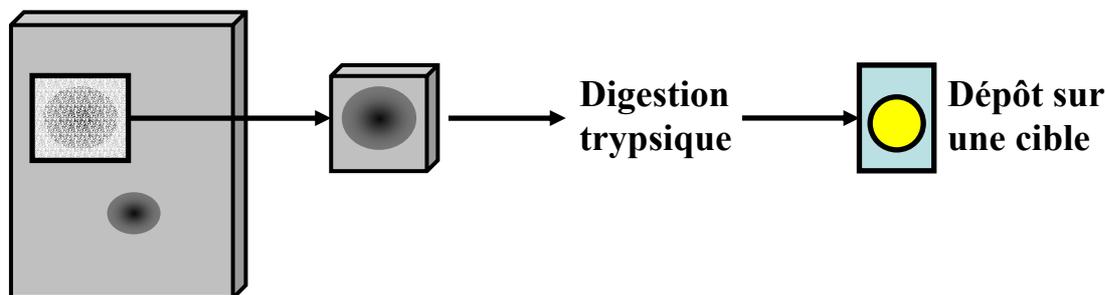


Figure 22.
Principe de la détection de l'activité tyrosine kinase en solution.



A

Trypsin digestion

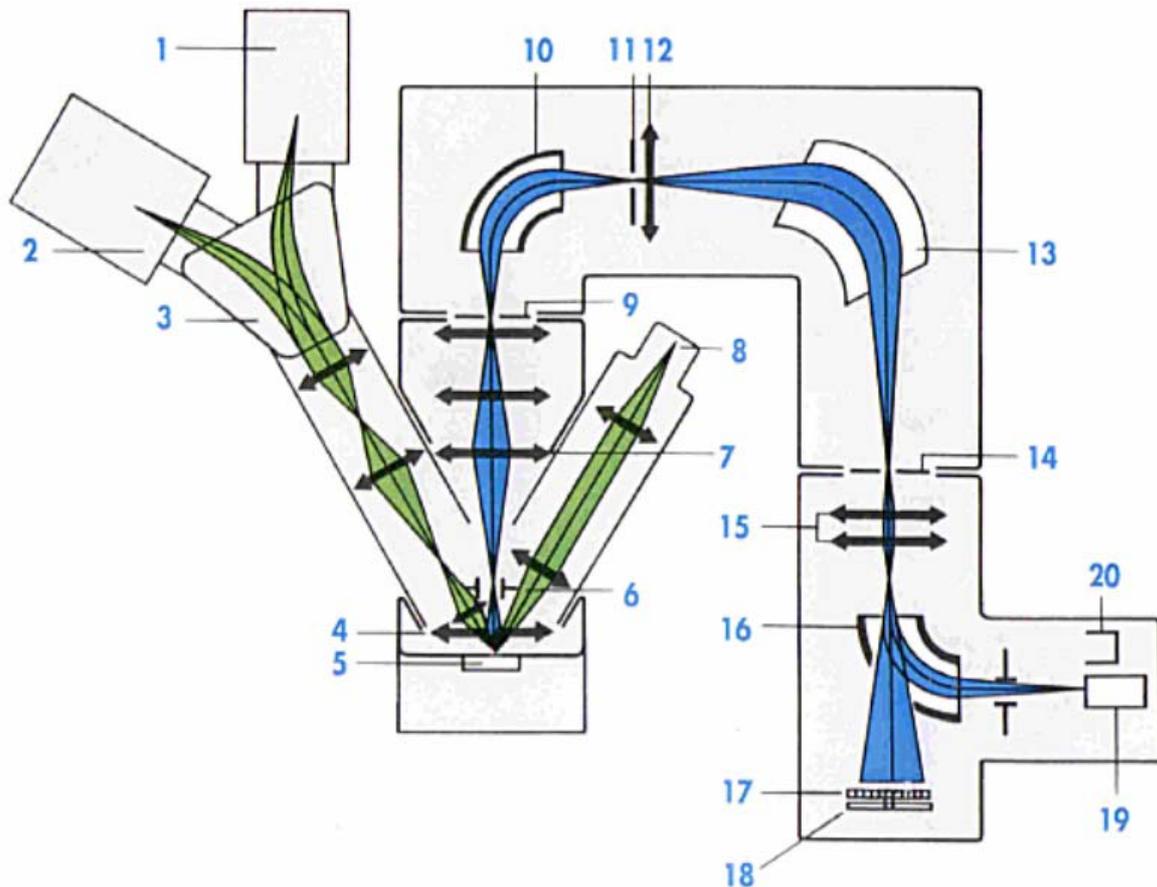
1. After washing the gel 3 × 5 min, excise protein spot/band and dehydrate in CH₃CN for approx. 10 min. Remove CH₃CN and SpeedVac until dry.
2. Reswell gel pieces in small microfuge tubes with 10 mM DTT, 0.2 M Tris-HCl, pH 8.4, 2 mM EDTA. Reduce proteins for 120 min at 40 °C.
3. Alkylate cysteine by adding 2 % 4-vinylpyridine (v/v) to the gel pieces in the reduction buffer. Vortex briefly and incubate for 60 min in the dark at room temperature. Note: the solution will become white after addition of the 4-vinylpyridine.
4. Stop alkylation by adding 2 % β-mercaptoethanol (v/v). Incubate for 60 min.
5. Wash gel pieces with 50–100 μl aliquots of 100 mM NH₄HCO₃ for 10 min. Dehydrate with CH₃CN reswell in 100 mM NH₄HCO₃, and shrink again with CH₃CN.
6. Remove liquid phase and SpeedVac.
7. As from point 2 in short method. Reswell gel pieces in small microfuge tubes for 45 min in buffer containing trypsin and 50 mM NH₄HCO₃, everything at 4 °C. Digest overnight at 37 °C (or at least for 3 h).
8. Centrifuge gel pieces and collect supernatant and further extract peptides by 1 × 20 min wash with 20 mM NH₄ HCO₃ (centrifuge then collect), and three washes with 5 % acetic acid in 50 % CH₃ CN (20 min between changes) at room temperature.
9. SpeedVac pooled supernatants until dry. Store at minus 20 °C; direct use is preferred.

B

Figure 23.

(A) Principe de la spectrométrie de masse MALDI-TOF après digestion trypsique.

(B) Protocole de digestion des polypeptides pour la réalisation d'un spectre en MALDI-TOF (d'après Shevchenko *et al.*, [1996] et de Moritz *et al.*, [1996]).



- | | |
|---|---|
| 1. Source d'ions césium | 12. Lentille du spectromètre de masse |
| 2. Duoplasmatron (ions dioxygènes) | 13. Secteur magnétique |
| 3. Filtre en masse du faisceau primaire | 14. Fente de sortie |
| 4. Lentille à immersion | 15. Lentilles de projection |
| 5. Echantillon | 16. Système de projection et de détection |
| 6. Système de transfert dynamique | 17. Galette de micro-canaux |
| 7. Système de transfert optique | 18. Ecran fluorescent |
| 8. Source d'ions métalliques | 21. Déflecteur |
| 9. Fente d'entrée | 19. Multiplicateur d'électrons |
| 10. Secteur électrostatique | 20. Cage de Faraday |
| 11. Fente en énergie | |

Figure 24.

Les différents composants du microscope ionique (SIMS).

Interaction Ions-Matière

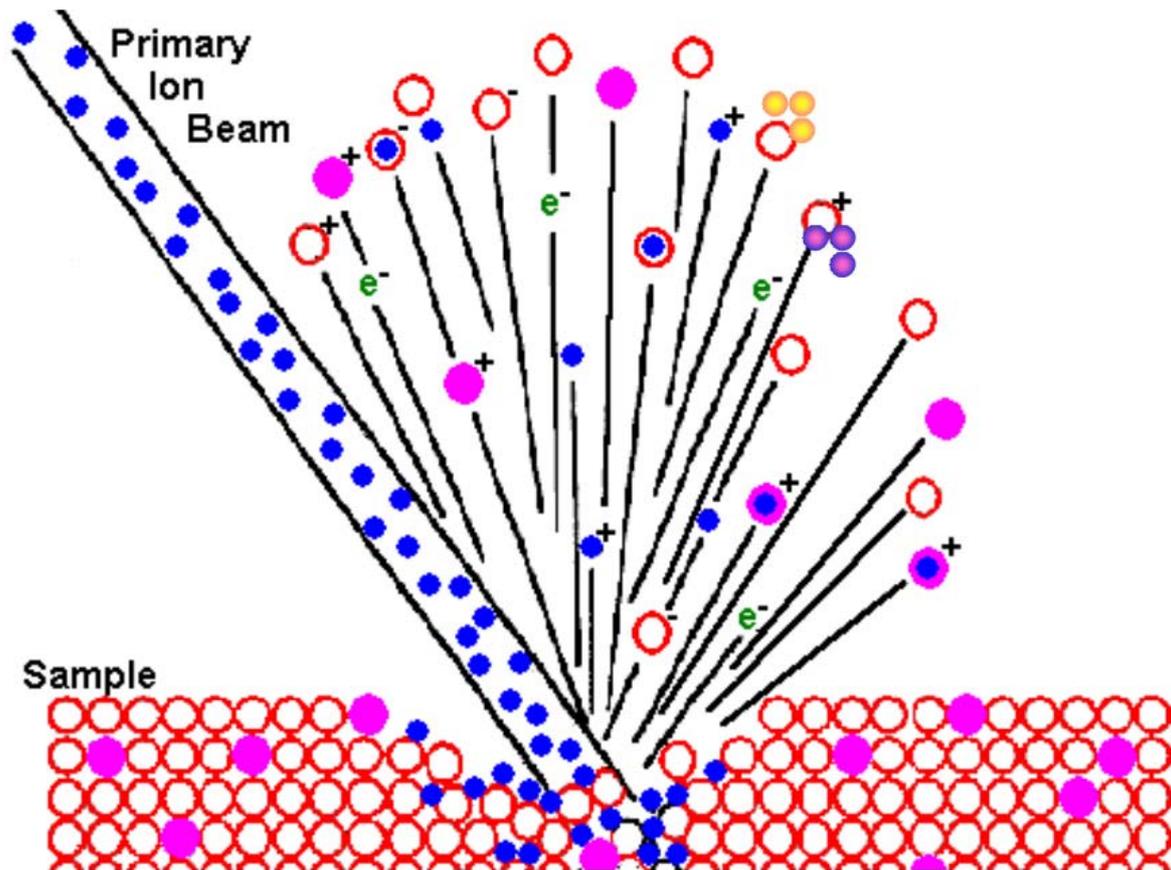


Figure 25.

Pulvérisation des premières couches atomiques d'un échantillon sous l'effet d'un faisceau incident d'ions primaires. Le plasma émis est alors composé de molécules et d'atomes chargés positivement, négativement ou neutres. En fonction du champ électrique qui est appliqué entre l'échantillon et la lentille à immersion qui collecte les ions, une seule espèce (positive ou négative) est sélectionnée. Le spectromètre de masse couplé à la sortie de la lentille à immersion permet de choisir la ou les masses à diriger vers un système de comptage et d'imagerie.

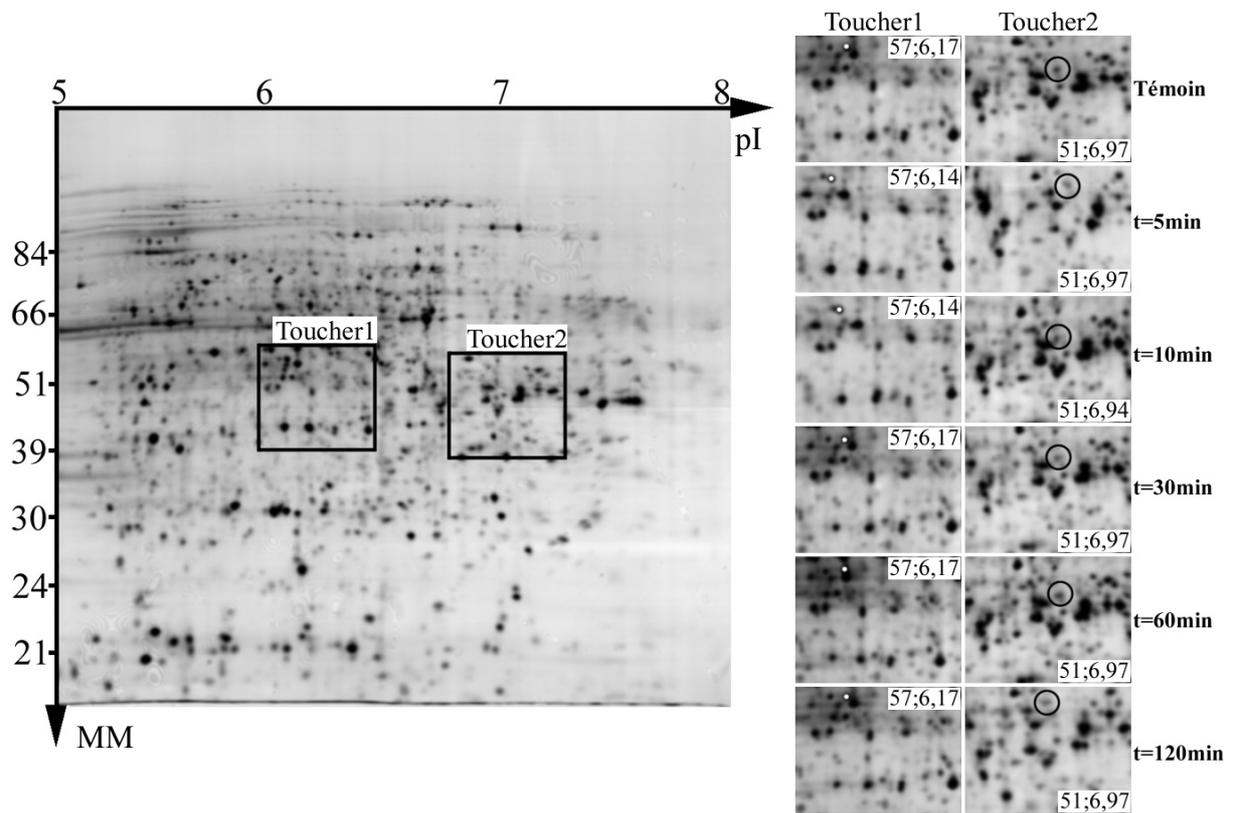


Figure 26.

Modification du protéome de l'hypocotyle de lin à la suite d'un stress de repiquage (stress mécanique non lésant). Les zones de gels agrandies dans la partie droite de la figure représentent l'évolution des protéines modifiées. Les points isoélectriques et les masses moléculaires sont indiqués dans les encarts blancs.

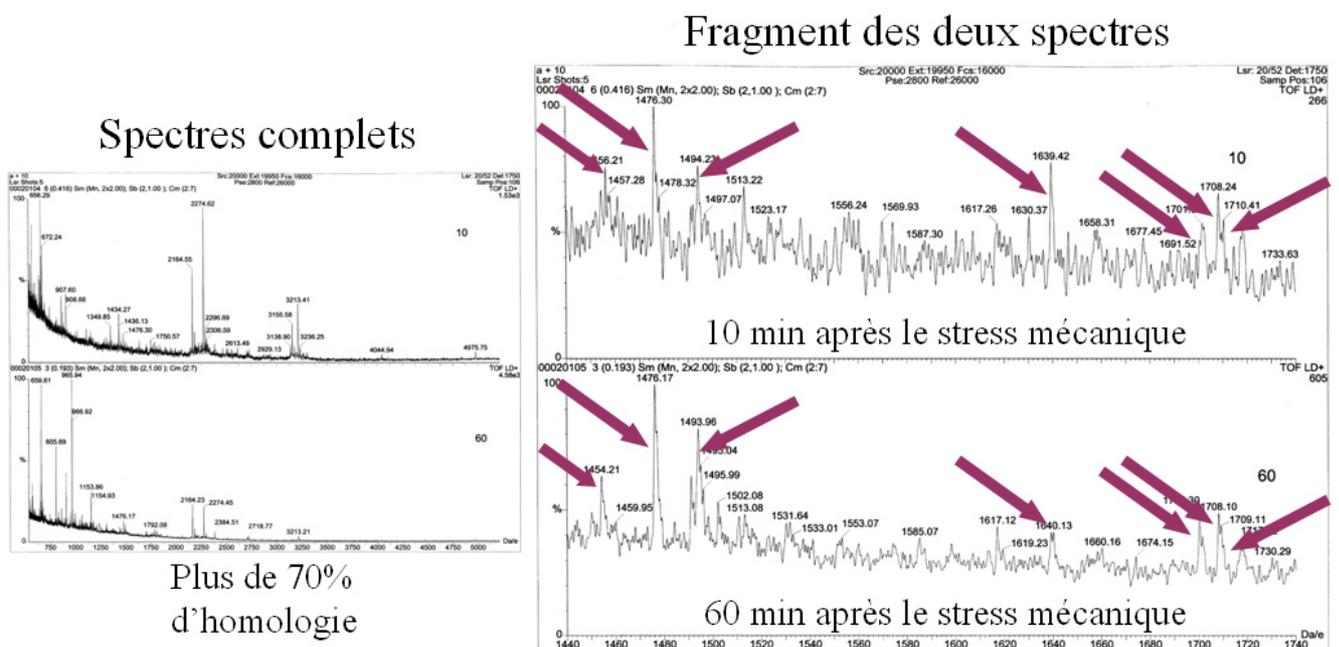


Figure 27.

Comparaison des deux polypeptides correspondant à la protéine Toucher1 par MALDI-TOF après digestion par la trypsine.

Les deux échantillons correspondent à la protéine Toucher1 isolée 10 minutes et 60 minutes après le stress mécanique de repiquage. La comparaison des deux spectres montre une homologie de plus de 70% ce qui signifie que les deux spots localisés à différents points isoélectriques à la suite d'un stimulus mécanique correspondent bien à la même protéine Toucher1.

Détection de l'activité tyrosine kinase

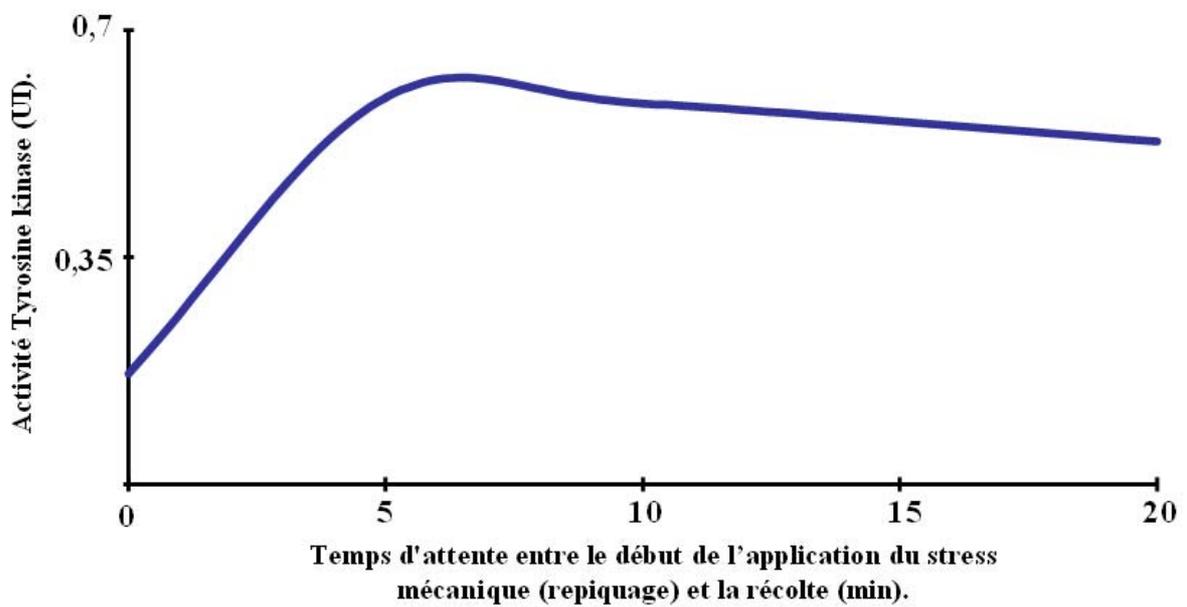


Figure 28.

Evolution de l'activité tyrosine kinase en solution au cours du temps, à la suite d'un stress de repiquage.

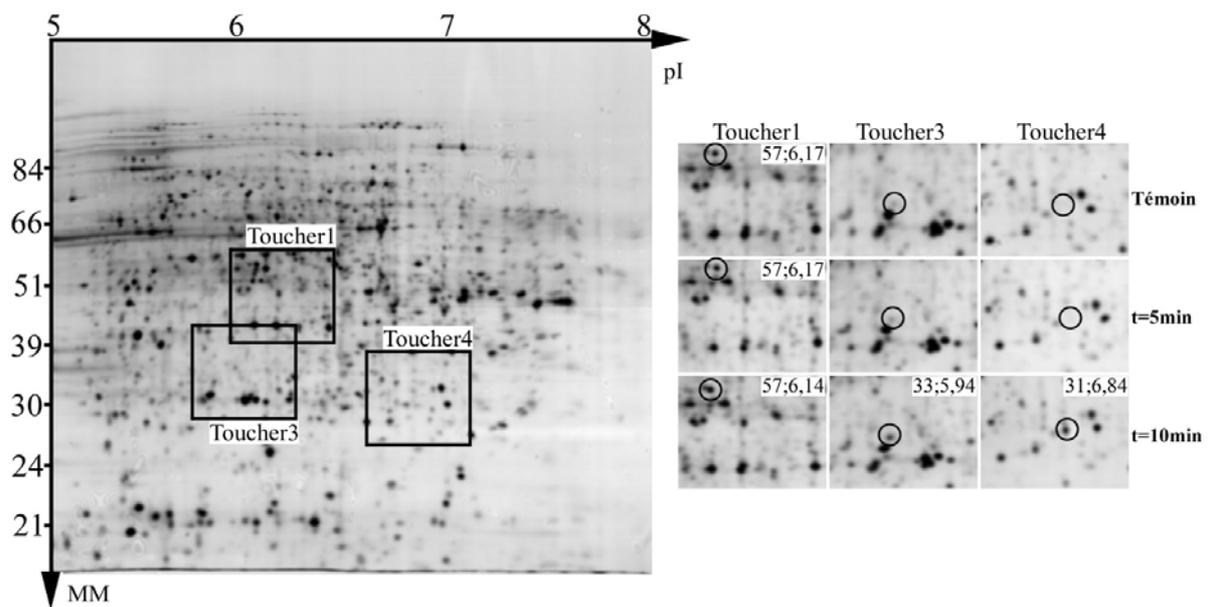


Figure 29.

Modifications du protéome de l'hypocotyle de lin après un stress lésant au niveau de l'hypocotyle. Les morceaux de gels de la partie droite représentent l'évolution des protéines modifiées. Les points isoélectriques et les masses moléculaires sont indiqués dans les encarts blancs.

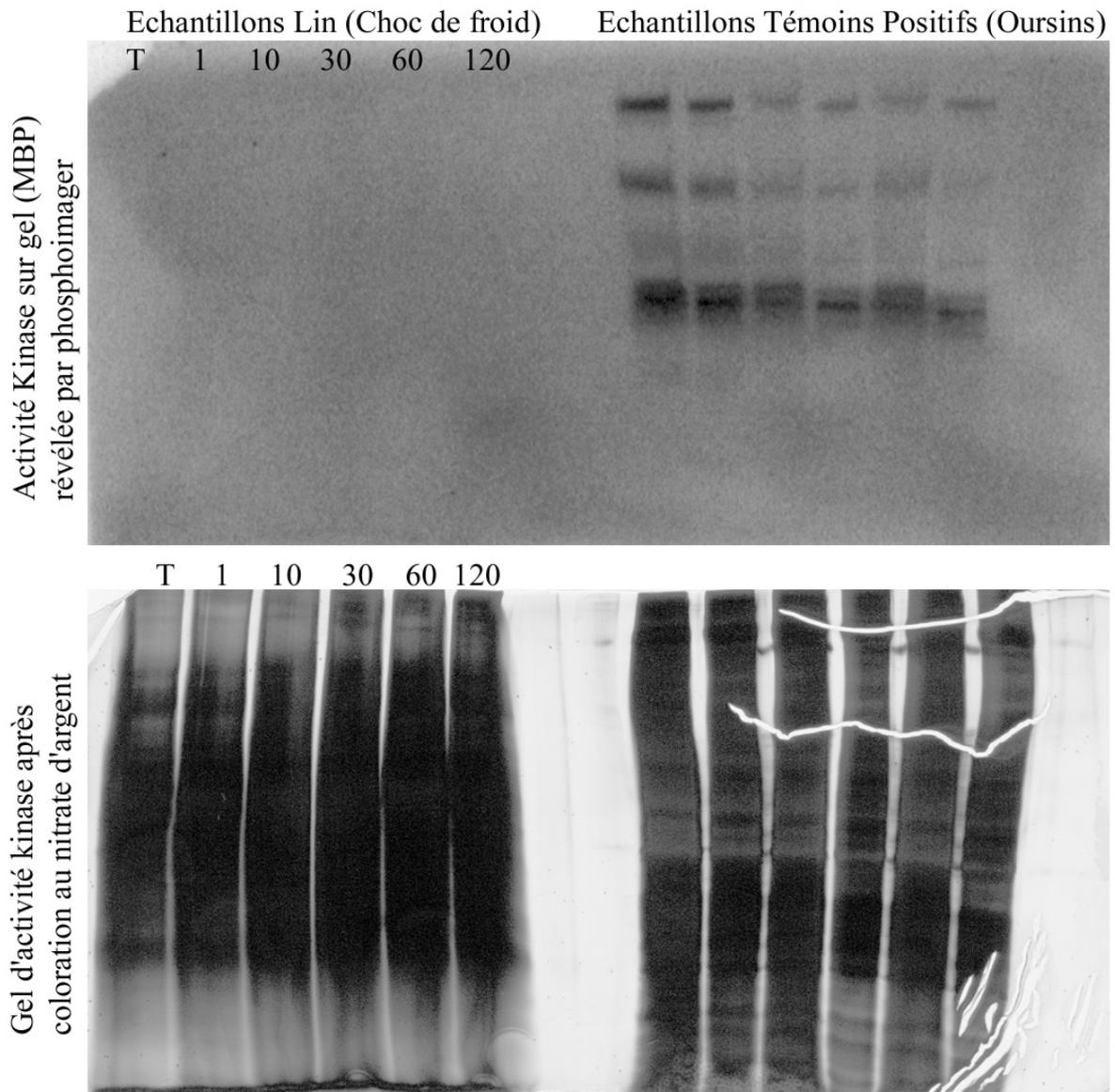


Figure 30.

Détection d'activité kinase sur gel.

La figure montre que les protéines des échantillons témoins se sont bien renaturées dans le gel et qu'une activité kinase phosphorylant la MBP est bien présente. L'image du gel en haut de la figure est obtenue avec un Phosphoimager (Bio-Rad) et en bas après coloration argentique.

Tableau 8.

Pourcentages de production de méristèmes épidermiques par rapport au *stimulus* de repiquage pour les différentes conditions étudiées (voir Tableau 7).

Expérience	Pourcentages de production de méristèmes par rapport au <i>stimulus</i> de repiquage (T Rep)
T (ss Depl)	1%
T Rep (ss Depl)	1%
T	9%
T Rep	100%
-PO4	1%
Rep -PO4 (ss Depl)	6%
DLT	39%
CF	88%
CF 1h CF	114%
La	10%
CF La 1 min	42%
CF La 5 min	21%
CF La 10 min	20%
CF La 30 min	15%
La 1 min CF	43%
La 5 min CF	17%
La 10 min CF	13%
La 30 min CF	13%
CF La 4h	15%
CF 1 min La 4h	48%
CF 2 min La 4h	48%
CF 5 min La 4h	42%
CF EGTA 3h	36%
EGTA 3h CF	42%
CF 1 min EGTA 3h	32%
CF 2 min EGTA 3h	53%
CF 5 min EGTA 3h	62%
RR 50 μ M DLT	4%
RR 1mM DLT	17%
RR CF	13%
RR CF 1h CF	19,1% (par rapport à CF 1h CF)

T : échantillon témoin

(ss Depl) : sans déplétion calcique de deux jours

Rep : *stimulus* de repiquage

-PO4 : déplétion en Phosphate de sodium

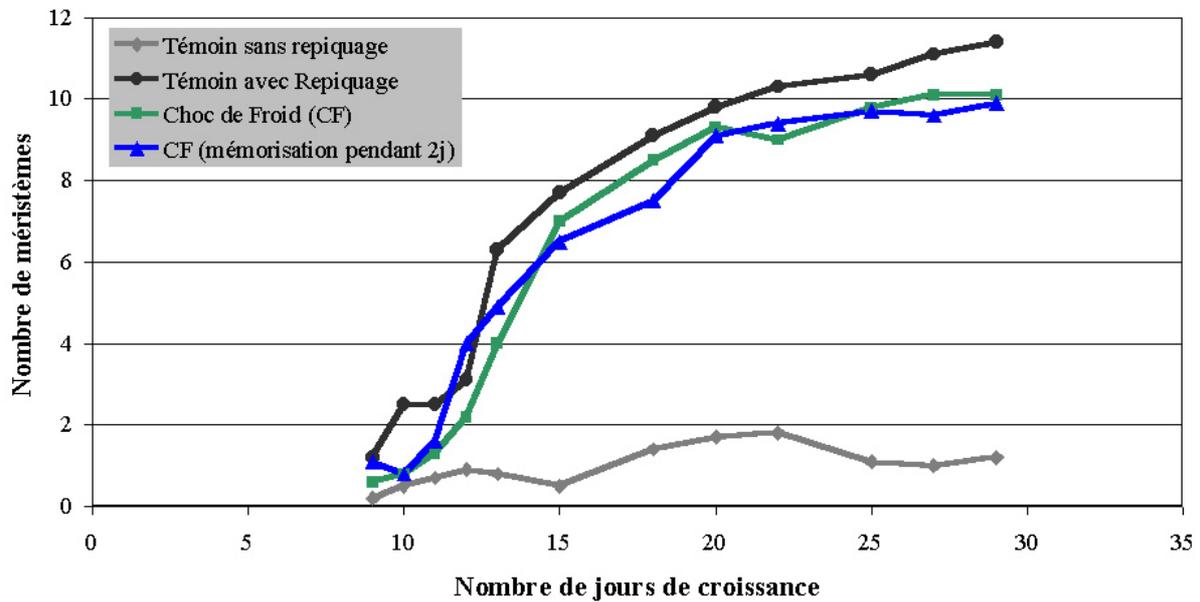
RR : Rouge de ruthénium

La : Lanthane

DLT : descente lente en température de 24h

CF : Choc de froid d'une minute

Comparaison du stress de repiquage et d'un choc de froid (avec ou sans mémorisation du signal).



Effets du rouge de ruthénium 0,5 mM sur la production des méristèmes à la suite d'un choc de froid ou d'un double choc de froid.

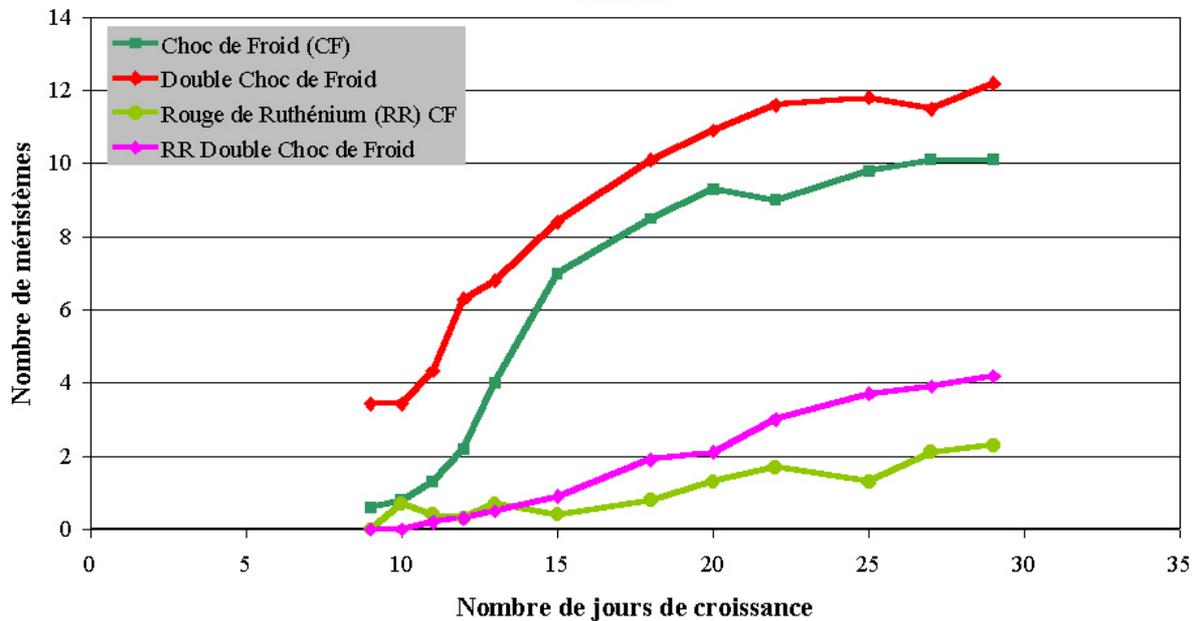
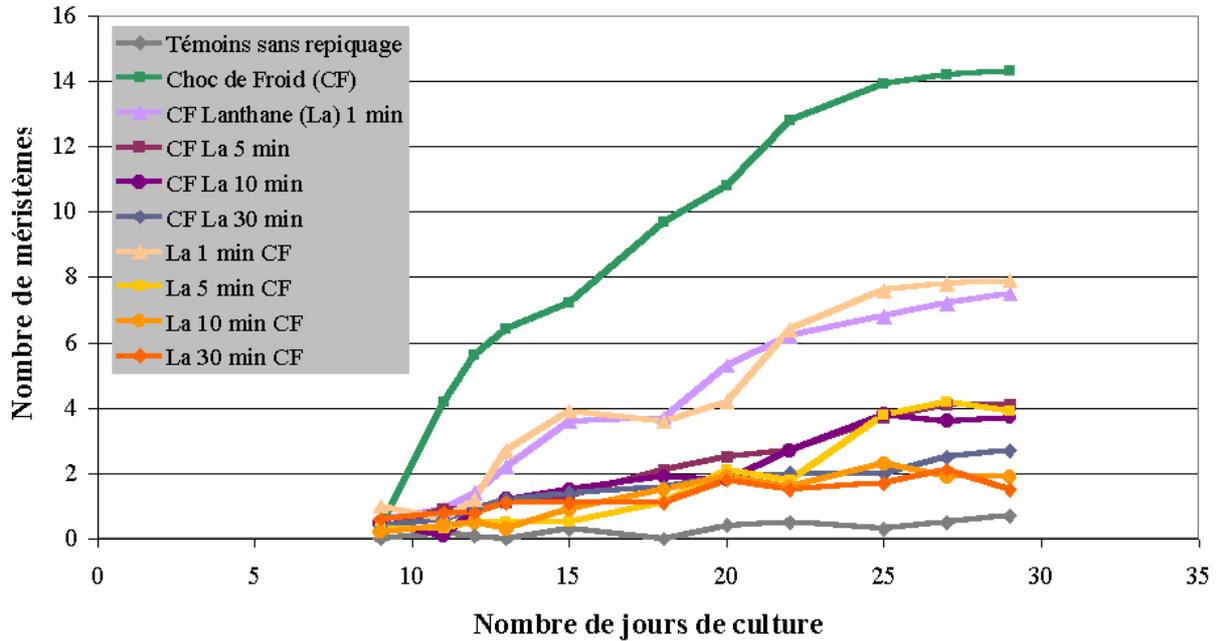


Figure 31.

Comparaison de la production des méristèmes épidermiques à la suite d'un stress de repiquage ou d'un choc de froid (partie supérieure). La déplétion à la suite du choc de froid a été réalisée immédiatement ou deux jours après. La courbe CF(mémorisation) a été décalée vers la gauche d'une distance correspondant à 2 jours pour faciliter la comparaison avec la courbe CF. La deuxième partie de la figure montre l'effet sur la production des méristèmes épidermiques d'un choc de froid, d'un double choc de froid et du Rouge de Ruthénium sur ces deux *stimuli*.

Effets de la durée de l'action du lanthane 10 μ M sur la production des méristèmes épidermiques.



Effets du temps de latence entre l'application du choc de froid et l'ajout de lanthane 10 μ M dans le milieu de culture.

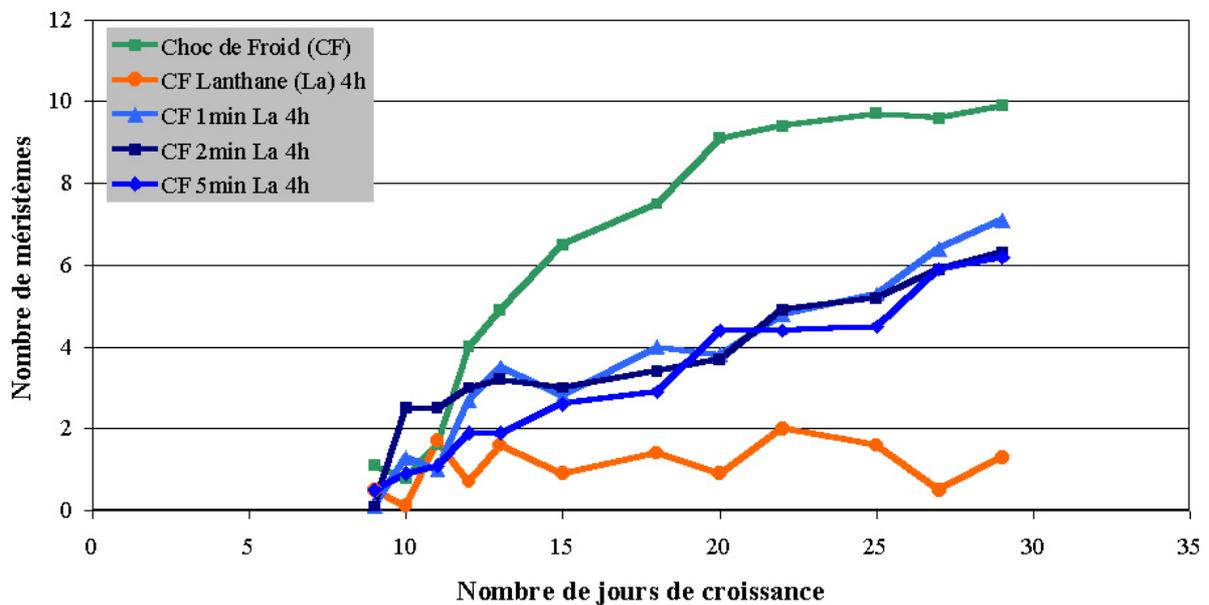


Figure 32.

Effets du lanthane sur la production des méristèmes épidermiques. La partie du haut montre l'effet du lanthane en fonction de son temps d'action sur les plantules et la partie du bas l'action de cet inhibiteur en fonction du laps de temps séparant l'application du stress et l'ajout du lanthane au milieu de culture.

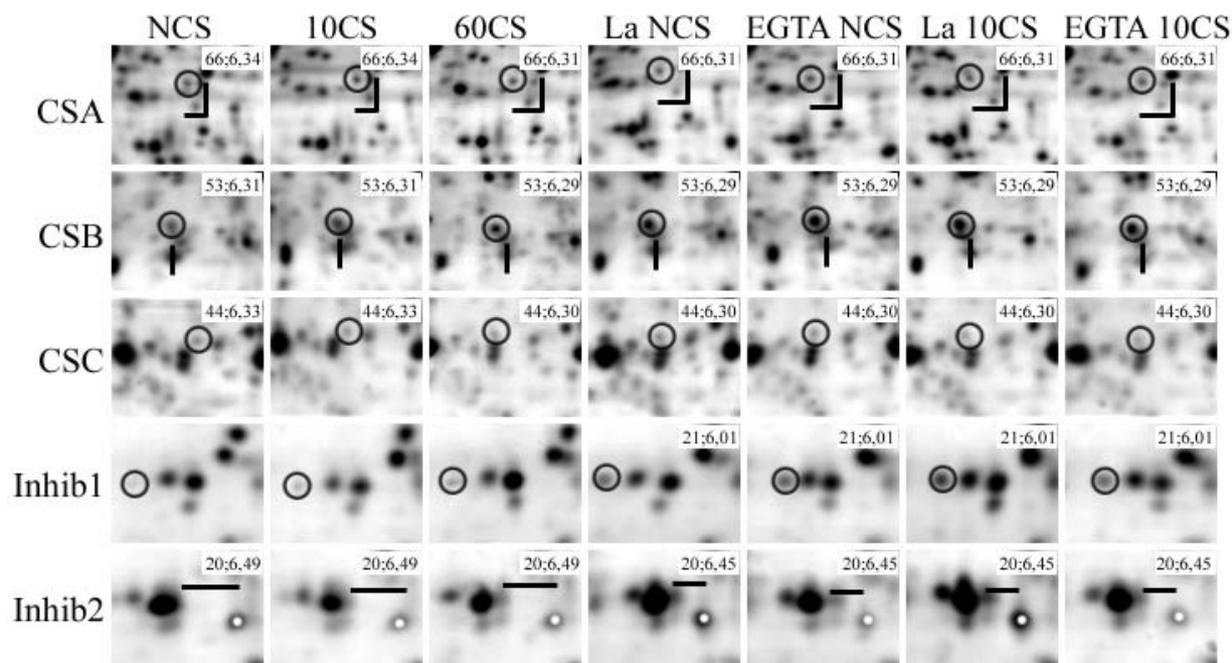


Figure 33.

Zones des gels d'électrophorèse bidimensionnelle montrant l'évolution de cinq protéines (CSA, CSB, CSC, Inhib1 et Inhib2) modifiées par la présence pendant trois heures de lanthane et d'EGTA dans le milieu de culture des plantules de lin. Sept conditions différentes sont représentées : NCS (témoins négatifs), 10 CS (témoins positifs récoltés dix minutes après le début de l'application d'un choc froid), 60 CS (témoins positifs récoltés soixante minutes après le début de l'application d'un choc froid), La NCS (échantillon soumis à une exposition de trois heures à du lanthane 10 μ M puis dix minutes sur un milieu normal), EGTA NCS (échantillon soumis à une exposition de trois heures à de l'EGTA 2,33mM puis dix minutes sur un milieu normal), La 10CS (échantillon soumis à une exposition de trois heures à du lanthane 10 μ M puis à un choc froid de une minute et récolté neuf minutes plus tard) et EGTA 10CS (échantillon soumis à une exposition de trois heures à de l'EGTA 2,33mM puis à un choc froid de une minute et récolté neuf minutes plus tard). Les protéines modifiées sont indiquées par un cercle noir ou bien un point blanc (Inhib2). Les encarts blancs indiquent les valeurs des points isoélectriques et des masses moléculaires des protéines modifiées. Les traits horizontaux et verticaux ne sont présents que pour une meilleure visualisation des modifications.

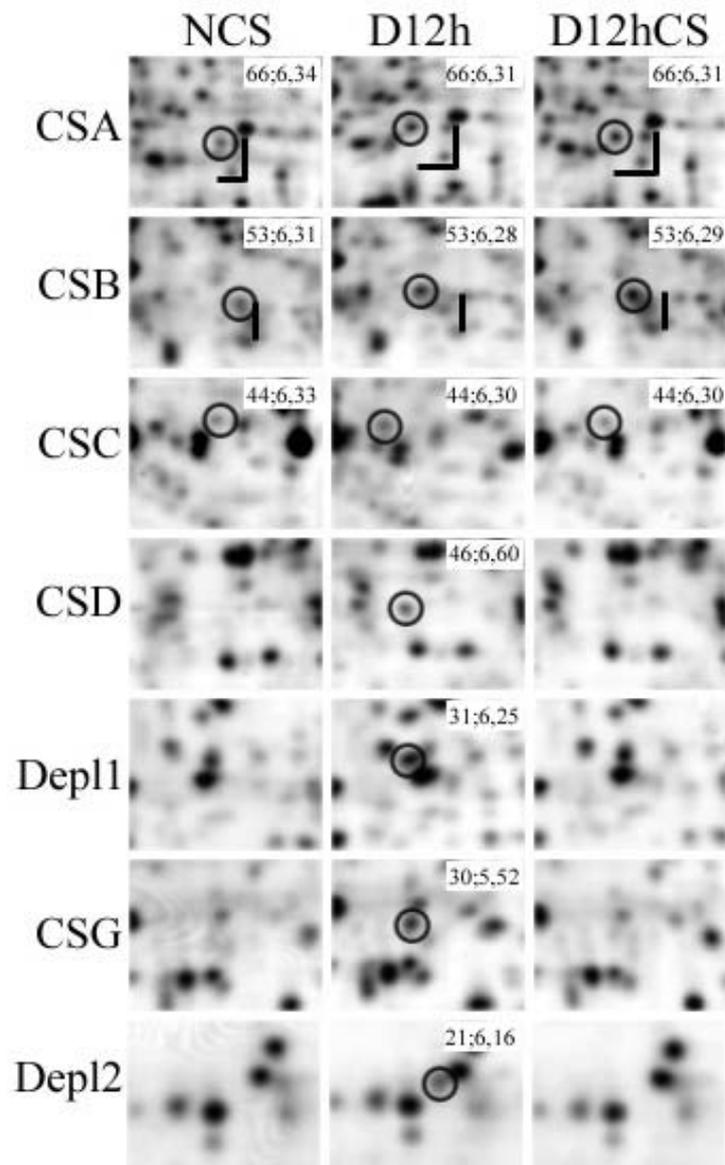


Figure 34.

Zones des gels d'électrophorèse bidimensionnelle représentant l'évolution de sept protéines (CSA, CSB, CSC, CSD, CSG, Depl1 et Depl2) modifiées lors de la culture des plantules sur un milieu sans calcium. Trois conditions différentes sont représentées : NCS (témoins négatifs), D12h (témoins positifs récoltés 12 heures après le début de la déplétion en calcium) et D12hCS (échantillon soumis à un stress froid d'une minute puis à une déplétion de 12 heures). Les protéines modifiées sont indiquées par un cercle noir. Les encarts blancs indiquent les valeurs des points isoélectriques et des masses moléculaires des protéines modifiées. Les traits horizontaux et verticaux ne sont présents que pour une meilleure visualisation des modifications.

Tableau 9.

Tableau récapitulatif des protéines de lin modifiées à la suite de différents *stimuli* abiotiques.

Protéine	Type de stress						
	Repiquage	Compression	Choc de froid	Lanthane	EGTA	Déplétion calcique	Irradiation à 900MHz
Toucher 1							
Toucher 2							
Toucher 3							
Toucher 4							
CSA							
CSB							
CSC							
CSD							
CSE (M34929)							
CSF							
CSG							
Nok(P3)							
Inhib1							
Inhib2							
Depl1							
Depl2							

Diminution de la valeur du point isoélectrique
 Apparition du spot

Tableau 10.

Tableau récapitulatif des protéines d'*Arabidopsis thaliana* et du lin modifiées à la suite d'un choc de froid et d'une irradiation à 900 MHz.

Arabidopsis			Lin		
Protéine	Type de stress		Protéine	Type de stress	
	Choc de froid	Irradiation à 900MHz		Choc de froid	Irradiation à 900MHz
P1			CSA		
P2			CSB		
P3 (P27140)			CSC		
P4 (Q9SX62)			CSD		
P5 (O48661)			CSE (M34929)		
P6			CSF		
			CSG		
			Nok (P3)		

	<i>Diminution de la valeur du point isoélectrique</i>
	<i>Apparition du spot</i>
	<i>Disparition du spot</i>