



HAL
open science

Structure et fonctions de la protéine kinase OST1 dans la cellule de garde d'*Arabidopsis thaliana*

Christophe Belin

► **To cite this version:**

Christophe Belin. Structure et fonctions de la protéine kinase OST1 dans la cellule de garde d'*Arabidopsis thaliana*. Biologie végétale. Université Paris Sud - Paris XI, 2006. Français. NNT : . tel-00167031

HAL Id: tel-00167031

<https://theses.hal.science/tel-00167031>

Submitted on 14 Aug 2007

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.

ORSAY

N° D'ORDRE :

<p>UNIVERSITE DE PARIS-SUD U.F.R. SCIENTIFIQUE D'ORSAY</p>
--

THESE

présentée
pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES
DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY

Spécialité : Biologie et Ecologie Végétale

par

Christophe BELIN

Sujet :

**Structure et fonctions de la protéine kinase OST1
dans la cellule de garde d'*Arabidopsis thaliana***

Thèse dirigée par Sébastien THOMINE

Soutenue le 30 juin 2006 devant la Commission d'examen :

M. Michel DRON	Examineur
M. Thierry GAUDE	Examineur
Mme Claudia JONAK	Rapporteur
Mme Annie MARION-POLL	Examineur
M. Sébastien THOMINE	Directeur de thèse
M. Alain VAVASSEUR	Rapporteur

Un grand MERCI à :

- **Seb**, "mon Chef", évidemment ! Merci pour m'avoir dit "Oui" et permis de poursuivre l'aventure sur OST1 ! C'était un challenge que de prendre en charge ma thèse en parallèle de ta thématique... Et je pense qu'aujourd'hui, on peut dire que tu y es arrivé avec brio ! Merci pour m'avoir fait partager ta vision de la science : moderne, efficace et passionnante ! Merci aussi pour ton bon caractère et ta tolérance qui m'ont permis de prendre des initiatives et d'exprimer mon grain de folie ! Et enfin désolé si, après 4 ans à me supporter et ces dernières semaines particulièrement intenses, tu as encore un peu moins de cheveux !
- **Hélène**, pour m'avoir permis de rejoindre l'équipe ! Merci pour avoir pris le temps de t'occuper de moi et pour m'avoir aidé à trouver ma place à un moment difficile pour nous tous !
- **Jérôme** : je n'oublierai jamais les visites que je te rendais au début de ma thèse ! Ton soutien et l'intérêt que tu continuais à porter à mon travail, à un moment pourtant très difficile pour toi, m'ont fait un bien fou !
- **Helen North, Thierry Gaude et Thierry Meinnel** : un trio de choc pour un comité de thèse ultra-efficace ! Merci pour vos nombreux et précieux conseils et pour nous avoir guidé, Seb et moi, tout au long de ces 4 années... et merci à Thierry (G.) pour ton accueil au RDP et le temps que tu m'as consacré à chaque fois que je suis venu !
- **François et Sylvain** qui, chacun à leur époque, m'ont beaucoup appris et ont toujours été présents lorsque j'avais besoin d'un conseil ou d'un coup de main !
- **tous les anciens du groupe JG** : Sandra, Guigui et Gil, Alex et Delphine, Francesca, Marta, François et bien sûr ma Chrichri ! C'était chaque jour un plaisir d'aller bosser à vos côtés !
- **tous les membres du groupe HBB** : Merci à tous, anciens (Aude, Yoyo, Isa, etc...) et actuels, pour la très bonne ambiance dans laquelle j'ai pu travailler pendant 3 ans... Un merci tout particulier aux patcheurs qui ont dû supporter ma présence au milieu de leurs cages, à ma Nadia, un vrai trait de bonheur en provenance directe des îles, et bien sûr à toute la pièce 127 : je n'aurais pas pu trouver meilleur endroit pour exprimer ce grain de folie en toute liberté tout en pouvant travailler de manière sérieuse et efficace ! Pour tous ces bons moments inoubliables, un grand merci à Ronald et à ma Fanfan (et à son dévouement pour les tâches ingrates)... Et pardon à tous pour vos oreilles !
- **mes stagiaires** et en particulier Anaïs, PO, et Clara avec lesquels ça a été un plaisir immense de travailler et dont l'efficacité a été indispensable à un bon nombre des résultats présentés dans cette thèse ! Merci Cécile pour ton aide !
- **tous les jeun's (et moins jeunes) de l'ISV**. Un grand MERCI aux anciens jeunes, les 4 mousquetaires qui m'ont intégré au sein de l'ISV (Anne, Sandra, Bebert et Manu) et aux p'tits jeunes (notamment ma p'tite Alex et son caractère affirmé, pour tous les excellents moments passés ensemble, mais aussi Elise, Emilie, Rémi) à qui je souhaite bonne chance pour la suite ! Merci aux CR boys (Nico, Nils, Dan... et leurs stagiaires); merci à Lysiane, Nico (euh Roger), Benoît, Gégé, Oliv', Silvina et tous les autres... et merci à tous les membres de l'ISV (et IFR) avec qui j'ai pu interagir pendant ces 4 ans et demi...
- **mes collaborateurs** de Bordeaux et d'Orsay (Jean-Marie Schmitter, Stéphane Chaignepain, Nicolas Leulliot).
- **tous les enseignants** que j'ai côtoyés dans le cadre de mon monitorat : Aline et Mariane aux côtés desquelles j'ai appris énormément pendant trois ans, l'équipe "Methodo", et Yves et Ariane, les jeunes loups de l'IBP !
- **tout le personnel des services communs de l'ISV** sans qui il serait tout simplement impossible de travailler !
- **toute ma famille** pour son soutien et pour tous les WE passés dans ma région (à Bordeaux ou en Charentes) qui m'ont souvent permis de recharger les batteries ! Merci à mes sœurs pour leur relecture attentive !
- **tous mes amis de Paris et d'ailleurs** pour leur présence permanente et leurs conseils avisés ! Mention spéciale à ma garde rapprochée si jalouse (Pauline, Céline, Diane, Chloé, Clara, Claire) !!!
- **tous les membres du jury** qui ont accepté de juger mon travail de thèse : Claudia Jonak, Annie Marion-Poll, Alain Vavasseur, Thierry Gaude et Michel Dron.
- **la meilleure** pour la fin, celle avec qui j'ai tout partagé au labo depuis trois ans (notamment Seb). Merci ma Vivi pour ta présence, ton soutien, tes conseils, ton aide et même pour tes coups de gueule. Merci pour les nombreuses heures de discussion, de détente, de travail, de RER, passées ensemble. Tu as été la partenaire idéale, mon complément parfait pendant toute cette période !

Table des matières

Table des matières	1
Abréviations utilisées	5
INTRODUCTION	6
I. Stress hydrique, stomates et ABA	7
1. Les végétaux face au stress hydrique.....	7
2. Les stomates : des pores dont l'ouverture est régulée	8
1. <i>Structure des stomates</i>	8
2. <i>Facteurs environnementaux régulant l'état d'ouverture stomatique</i>	8
3. L'acide abscissique.....	9
1. <i>Structure et synthèse de l'ABA</i>	9
2. <i>Rôles physiologiques de l'ABA</i>	10
4. Rôle de l'ABA dans la fermeture stomatique en réponse à un stress hydrique	11
II. Bases moléculaires de la réponse des cellules de garde à l'ABA.....	12
1. Mécanismes cellulaires provoquant la fermeture des stomates	12
1. <i>Les flux d'ions et d'osmolytes contrôlent les mouvements stomatiques</i>	12
2. <i>Canaux et pompes : les effecteurs de la signalisation ABA</i>	13
3. <i>D'autres mécanismes cellulaires participent à la fermeture stomatique</i>	14
4. <i>Régulation de l'expression génétique et contrôle de l'ouverture stomatique</i>	15
2. Approches pour l'étude de la perception et de la transduction du signal ABA.....	16
1. <i>Pharmacologie, biochimie et biologie cellulaire</i>	17
2. <i>Approches génétiques</i>	17
3. La perception du signal ABA	18
1. <i>Des sites de perception multiples</i>	18
2. <i>FCA : un premier récepteur identifié</i>	19
4. Les seconds messagers impliqués dans la transduction du signal ABA.....	20
1. <i>L'ABA met en jeu une large panoplie de seconds messagers</i>	20
2. <i>Le calcium cytosolique au carrefour de différentes voies de signalisation</i>	22
3. <i>La réponse calcique intègre l'action de divers messagers secondaires</i>	23
4. <i>Intégration des différentes voies de mobilisation du calcium</i>	25
5. Un rôle crucial de la membrane plasmique dans la réponse à l'ABA	25
6. Protéines kinases et phosphatases contrôlent la transduction du signal ABA.....	26
1. <i>Les PP2C : des régulateurs majeurs de la signalisation ABA</i>	26
2. <i>De nombreuses kinases et phosphatases impliquées</i>	28
3. <i>Le rôle majeur des SnRK2 VfaAPK et AtOST1</i>	29
III. OST1 et SnRK2 dans l'univers des kinases	31
1. Quelques généralités sur les kinases	31
1. <i>Deux mondes parallèles dans l'univers des kinases</i>	31
2. <i>Les kinases chez les végétaux</i>	32

3. Structure du domaine catalytique des ePKs et boucle d'activation.....	33
2. OST1 et les SnRK2.....	34
1. Présentation générale des CDPK et SnRK.....	34
2. La famille SnRK.....	35
Trois sous-familles.....	35
Mécanismes de régulation.....	36
3. Les SnRK2.....	36
4. La protéine OST1.....	38
OBJECTIFS ET PRÉSENTATION GÉNÉRALE.....	39
CHAPITRE I : IDENTIFICATION DE MOTIFS STRUCTURAUX IMPLIQUÉS DANS LA FONCTION DE OST1.....	42
I. Vers une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de la protéine OST1.....	43
II. Dans les coulisses de l'analyse fonctionnelle de OST1.....	66
CHAPITRE II : PRODUCTION, PURIFICATION ET ACTIVITÉ <i>IN VITRO</i> DES PROTÉINES OST1 RECOMBINANTES.....	67
I. Obtention de protéines recombinantes natives et structurées.....	68
1. Un système permettant de produire abondamment OST1 sous forme soluble.....	68
2. Purification des protéines recombinantes.....	69
3. Vérification de la structure des protéines purifiées.....	70
II. Activité kinase <i>in vitro</i> de la protéine OST1 recombinante.....	71
1. Mise au point des tests d'activité.....	71
2. Effets de l'ABA, du pH et du calcium sur l'activité de OST1.....	72
CHAPITRE III : ANALYSE DES DIFFÉRENCES ENTRE LES ALLÈLES DE <i>OST1</i>	74
I. Problèmes de complémentation du mutant <i>ost1-2</i>.....	75
II. Caractérisation des différents allèles mutants de <i>OST1</i>.....	76
III. Stratégie d'étude de la complémentation du mutant <i>ost1</i>.....	77
CHAPITRE IV : EXPLORATION DE QUELQUES MÉCANISMES PUTATIFS DE RÉGULATION DE LA PROTÉINE OST1.....	78
I. La PP2C HAB1 participe-t-elle à la régulation de OST1 ?.....	79
1. Analyse par thermographie infrarouge des lignées <i>hab1-1</i> et <i>PRO_{35S}:HAB1</i>	79
2. Activité de OST1 dans les lignées <i>hab1-1</i> et <i>PRO_{35S}:HAB1</i>	79

II. ABA et régulation de la quantité de protéine OST1	80
CHAPITRE V : OST1 ET LES AUTRES SnRK2	82
I. Analyse de l'expression des dix <i>SnRK2</i> chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	83
1. Données d'expression spatiale et temporelle des <i>SnRK2</i>	83
2. Régulation de l'expression des différents <i>SnRK2</i>	84
II. D'autres SnRK2 peuvent-elles remplacer OST1 ?	85
DISCUSSION GÉNÉRALE	87
I. Les mécanismes de régulation des SnRK	89
1. Boucle d'activation et phosphorylation.....	89
2. Des domaines C-terminaux très divergents entre les SnRK.	90
II. Régulation de OST1 par phosphorylation et déphosphorylation	91
1. Importance des sérines et de leur phosphorylation	91
2. La régulation de l'état de phosphorylation de OST1	92
III. Les fonctions du domaine C-terminal	94
1. Un domaine C-terminal très spécifique	94
2. Domaine C-terminal et quantité de protéine OST1	95
IV. Fonctions de OST1 et redondance avec les SnRK2 dans la plante	96
1. OST1 : la seule SnRK2 dans les cellules de garde ?.....	96
2. Interaction entre OST1 et d'autres SnRK2 dans les autres tissus	97
PERSPECTIVES	99
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	102
ANNEXES	116
Annexe 1 Carte du vecteur pET16b_(GW) utilisé pour l'expression de protéines recombinantes chez <i>E.coli</i>	117
Annexe 2 Carte du vecteur p\$POHA_(GW) utilisé pour la génération des lignées transgéniques (promoteur <i>OST1</i>)	118
Annexe 3 Bilan des lignées indépendantes générées lors de ma thèse	119
Annexe 4 Caractérisation moléculaire des lignées <i>srk2e</i> / <i>PRO_{OST1}:3xHA-X</i>	120

Annexe 5 Amorces utilisées pour les RT-PCR sur l'ensemble des *SnRK2* et les
contrôles *EF1 α* et *KINI*121

Abréviations utilisées

ABA : Acide Abscissique

abi : mutant insensible à l'ABA

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADN-T : ADN de Transfert

ADPRc : Adénosine DiPhosphate Ribose cyclique

AGI : The Arabidopsis Genome Initiative

AMP : Adénosine MonoPhosphate

AP : Acide Phosphatidique

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : ARN messenger

ATP : Adénosine TriPhosphate

CAM : Crassulacean Acid Metabolism

DC : Dichroïsme Circulaire

dNTP : désoxyNucléotide TriPhosphate

EMS : Ethyl Méthyl Sulfonate

GDP : Guanosine DiPhosphate

GMPC : Guanosine MonoPhosphate cyclique

GTP : Guanosine TriPhosphate

GUS : β -Glucuronidase

IR : InfraRouge

ost : *open stomata* (mutants ne fermant plus leurs stomates en réponse à un stress hydrique)

OSKL : OST1 Kinase Like (famille SnRK2 d'*Arabidopsis thaliana*)

PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne

PP1, PP2A, PP2B, PP2C : Protéine Phosphatase de type 1, 2A, 2B, ou 2C

RT : Réaction de transcription inverse

S1P : Sphingosine-1-Phosphate

Snf1 : *Sucrose non fermenting 1* (gène de levure)

SnRK : Snf1 Related Kinase (famille de protéines kinases)

UV : UltraViolet

INTRODUCTION

A**B****C**

Figure 1 : Adaptations des plantes aux climats secs

A. Plantes ayant développé un caudex, organe de stockage de l'eau à la base des tiges, volumineux et protégé par une structure protectrice résistante. **B.** Adaptation des cactacées à un environnement sec. Les cactus sont des plantes succulentes stockant l'eau dans leur tige charnue. Les pertes d'eau sont réduites du fait de la transformation des feuilles en épines (la photosynthèse a lieu dans la tige) et du métabolisme de type CAM qui permet de restreindre l'ouverture des stomates aux périodes nocturnes. Les épines permettent également la condensation de la rosée qui tombe au pied de la plante. **C.** Exemples de "plantes de la résurrection" tolérantes à la dessiccation. Ces plantes adoptent généralement une forme de boule desséchée abaissant à 1% leur teneur en eau (panneaux du bas) et retrouvent une activité métabolique et un développement normal très rapidement après les rares précipitations (panneaux du haut).

I. STRESS HYDRIQUE, STOMATES ET ABA

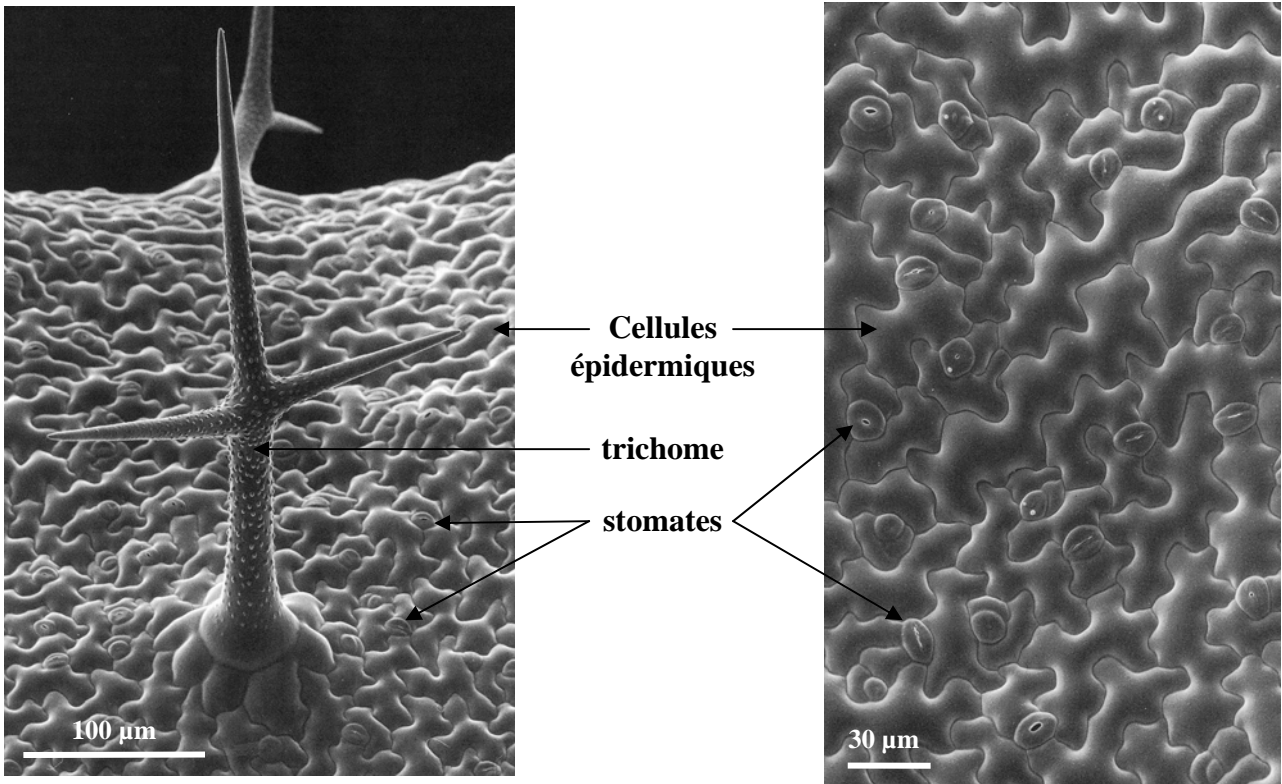
1. Les végétaux face au stress hydrique

La sécheresse est un stress environnemental majeur pour les végétaux de tous les continents qui, en tant qu'organismes fixés, ne peuvent pas fuir. Par conséquent, c'est également un problème majeur pour l'homme puisque la sécheresse affecte grandement les rendements des cultures (Boyer, 1982). L'étude des réponses des végétaux au déficit hydrique est donc à la fois d'une importance capitale dans la compréhension de la physiologie des plantes et de l'évolution des écosystèmes, et d'un intérêt économique crucial.

Il existe des régions où la sécheresse est quasi-permanente (climats désertiques) ou importante et régulière au gré des saisons (climat méditerranéen). Les plantes qui peuplent ces milieux sont adaptées à ces conditions (figure 1). Ainsi, il existe de nombreuses et diverses adaptations métaboliques (métabolismes de types C4 ou CAM), anatomiques (cuticules épaisses, feuilles modifiées, surface réduite, plantes succulentes, présence d'un caudex) et physiologiques (cycles de développement courts) permettant aux plantes de se développer et se reproduire dans les milieux secs. Ces différents types d'adaptation sont souvent combinés afin de lutter plus efficacement contre la dessiccation. L'exemple le plus flagrant est celui des cactus qui sont des plantes succulentes, avec des feuilles modifiées en épines afin de limiter les pertes d'eau, et un métabolisme de type CAM. Par ailleurs, il existe également quelques plantes qui tolèrent la dessiccation, appelées "plantes de la résurrection" parmi lesquelles on peut citer *Selaginella lepidophylla*, une fougère présente au Texas, en Californie et au Mexique, *Anastatica hierochuntica*, également appelée "rose de Jéricho", une brassicacée originaire de Syrie, ou encore *Craterostigma plantagineum*, une scrophulariacée d'origine sud-africaine qui sert de plante modèle pour la tolérance à la sécheresse. Ces plantes adoptent le plus souvent une forme de boule entièrement desséchée et ne se développent que lors des très rares périodes de précipitations qui induisent leur réhydratation (figure 1C).

Dans les autres régions, au contraire, les périodes sèches sont souvent courtes et parfois imprévisibles. Les plantes qui peuplent ces milieux non extrêmes (mésophytes) ont développé des mécanismes permettant de répondre ponctuellement à ces périodes de déficit hydrique afin d'éviter la déshydratation. Les végétaux répondent notamment par la synthèse *de novo* d'osmolytes (sucres, proline, glycine-bétaïne, etc.), qui permettent d'augmenter la pression osmotique et ainsi de retenir l'eau à l'intérieur des cellules, ou de protéines, impliquées dans le

A



B

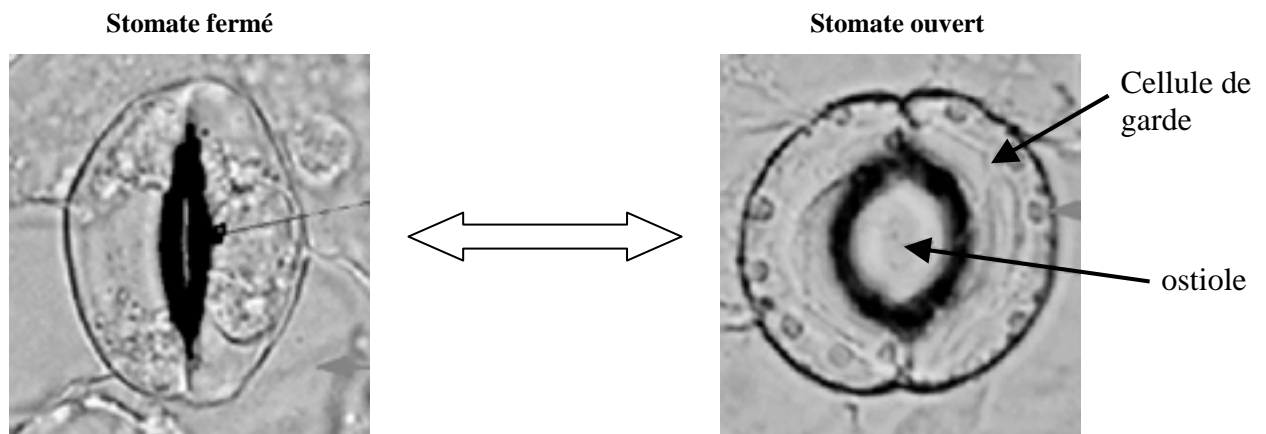


Figure 2 : Les stomates, des structures épidermiques spécialisées

A. Epiderme de feuille d'*Arabidopsis thaliana*. De nombreux stomates sont répartis au sein de cet épiderme pour assurer les échanges gazeux entre la plante et son environnement. Photos tirées de "Arabidopsis: An atlas of Morphology and Development – 1994 – John Bowman – ed Springer-Verlag". **B.** Structure de stomates fermé et ouvert. Le stomate se compose de deux cellules de garde aux parois internes épaissies, et dont la turgescence régule la taille du pore central (ostiole).

maintien des structures membranaires, la protection des macromolécules et dans les mécanismes de détoxification des stress oxydatifs générés. On observe également une modification du métabolisme de la plante et notamment une inhibition de la photosynthèse (Tabaeizadeh, 1998; Reddy et al., 2004). Enfin, les plantes sont capables de moduler leur développement en inhibant la croissance des feuilles afin de réduire les pertes d'eau, en modifiant leur système racinaire afin de prospecter et d'absorber de manière plus efficace l'eau contenue dans le sol, et parfois même en accélérant ou en différant la floraison afin d'assurer la reproduction et d'échapper au stress. Mais la réponse au stress hydrique la plus rapide et directement corrélée à l'économie d'eau par la plante est la fermeture des stomates, principaux responsables de la perte d'eau par évapo-transpiration. C'est à l'étude des mécanismes régulant l'état d'ouverture des stomates que les travaux présentés dans cette thèse sont consacrés.

2. Les stomates : des pores dont l'ouverture est régulée

1. Structure des stomates

Les stomates sont des structures spécialisées formant des pores au sein de l'épiderme des organes aériens de tous les végétaux (figure 2A) où ils assurent les échanges gazeux entre la plante et son environnement (Willmer and Fricker, 1996). Ces pores permettent l'entrée de CO₂ nécessaire à la photosynthèse et l'évaporation de la majeure partie de l'eau absorbée par la plante (~95%), mécanisme indispensable à la montée de la sève xylémique et donc au transport des solutés depuis les racines. Ils sont constitués de deux cellules, les cellules de garde, qui délimitent un pore central, l'ostiole (figure 2B). Les deux cellules de garde sont isolées du réseau symplasmique des cellules de l'épiderme et du mésophylle puisqu'elles ne présentent aucun plasmodesme (Wille and Lucas, 1984). De plus, elles possèdent une paroi interne épaissie et un réseau de microfibrilles de cellulose à orientation radiale. Ces propriétés structurales leur permettent de gonfler et de se déformer en réponse à un changement de turgescence (Franks et al., 1998; Franks et al., 2001). La régulation de l'état de turgescence des cellules de garde permet donc de moduler l'état d'ouverture du pore stomatique.

2. Facteurs environnementaux régulant l'état d'ouverture stomatique

De nombreux facteurs endogènes et environnementaux influencent l'état d'ouverture des stomates. L'auxine, la lumière (Zeiger and Hepler, 1977), une forte hygrométrie ou de faibles taux de CO₂ favorisent l'ouverture des stomates. D'autres facteurs, parmi lesquels de

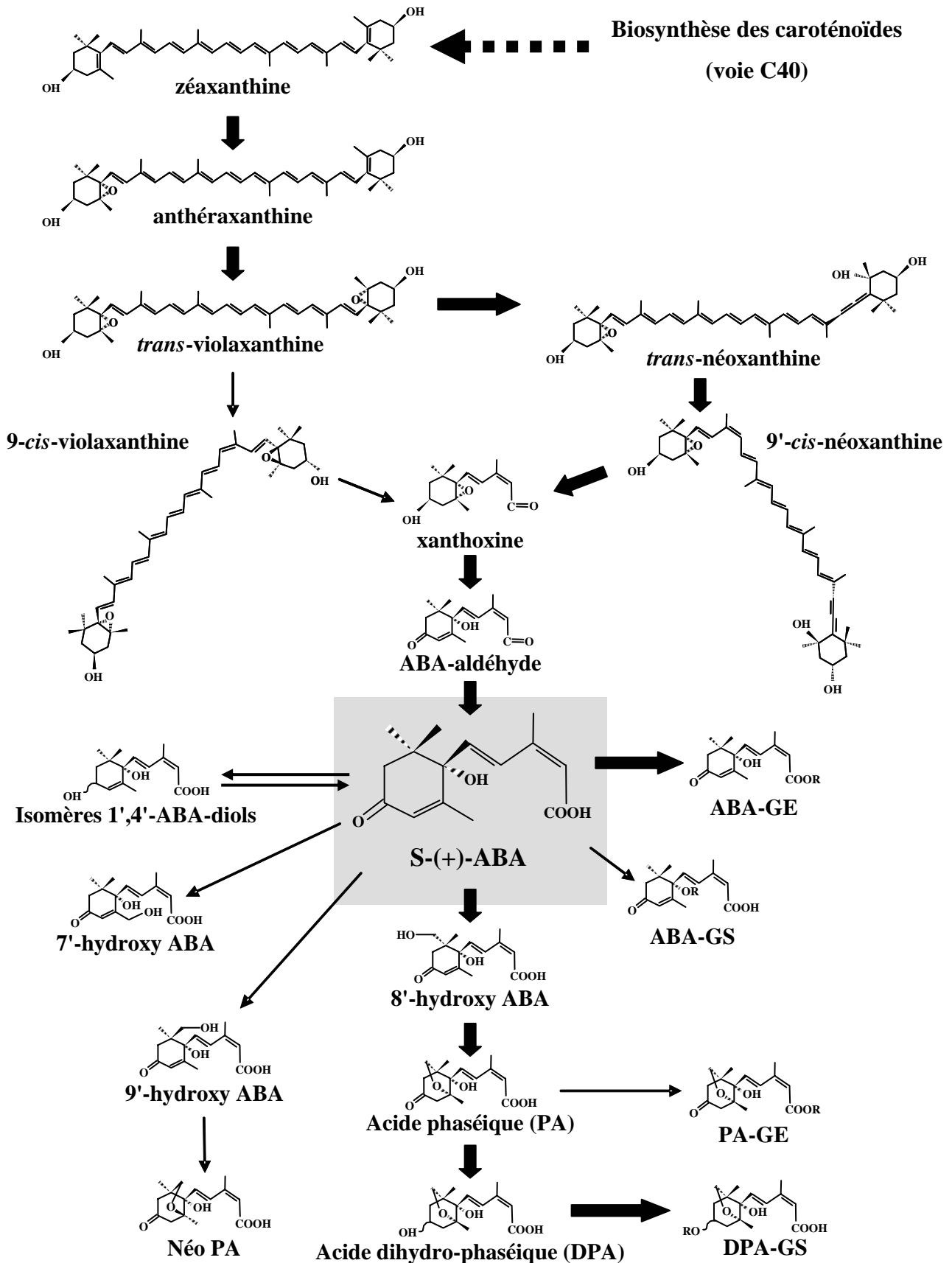


Figure 3 : Métabolisme de l'acide abscissique

Voies de biosynthèse, de dégradation et de conjugaison de la forme acide 2-*cis*, 4-*trans*, S(+) abscissique chez les végétaux supérieurs. Les flèches noires épaisses indiquent la voie principale.

nombreux stress, induisent la fermeture de ces pores. C'est le cas de l'obscurité, de certains pathogènes (Lee et al., 1999), de forts taux de CO₂ ou de polluants atmosphériques (Assmann, 1999; Torsethaugen et al., 1999), des basses températures, et des stress hydriques. L'intégration de ces différents signaux par les cellules de garde permet de réguler le degré d'ouverture stomatique afin d'optimiser l'assimilation de CO₂ en fonction des conditions environnementales et de l'état physiologique de la plante. Dans le cas d'un stress hydrique, par exemple, ce système de régulation permet de limiter la perte d'eau qui pourrait être fatale à la plante en inhibant l'ouverture des stomates par la lumière en début de journée. Ceci diminue l'assimilation du CO₂, et ralentit donc le métabolisme et le développement, mais permet à la plante de survivre. Le stress hydrique influence l'état de turgescence des cellules de garde essentiellement par l'intermédiaire d'une phytohormone : l'acide abscissique.

3. L'acide abscissique

Dans les années 60, certaines substances comme la "dormine", responsable de l'induction de la dormance des bourgeons et des graines, avaient été identifiées, alors que d'autres semblaient provoquer l'abscission de certains fruits et avaient alors été appelées "abscissine". Il s'est avéré par la suite que ces diverses substances correspondaient en fait à une même molécule qui a alors été renommée "Acide Abscissique" (Cornforth et al., 1965; Addicott, 1983). Enfin, au début des années 90, de nombreuses études ont montré son rôle crucial dans la mise en place des réponses aux stress hydriques.

1. Structure et synthèse de l'ABA

L'ABA est une molécule synthétisée par l'ensemble des végétaux ainsi que par quelques champignons (Assante et al., 1977; Kitagawa et al., 1995) et algues (Tietz and Kasprick, 1986). C'est un sesquiterpénoïde à quinze atomes de carbone (C15) contenant un cycle et une chaîne latérale portant deux insaturations. Ces caractéristiques impliquent l'existence de plusieurs énantiomères et isomères mais seule la forme "acide 2-*cis*, 4-*trans*, S(+)" abscissique est produite et active. Des arguments biochimiques (Zeevaart et al., 1989) puis génétiques ont montré que, chez les plantes supérieures, l'ABA est synthétisé principalement par une voie indirecte (voie C40), à partir des caroténoïdes (Cutler and Krochko, 1999). Les phases précoces de cette synthèse ont lieu au niveau des plastes et aboutissent à la libération de xanthoxine (C15) qui est alors convertie en ABA dans le cytosol. Comme le montre la figure 3, l'homéostasie de l'ABA est contrôlée non seulement par la régulation de la

biosynthèse, mais également par inactivation via la conjugaison avec des dérivés du glucose, ou dégradation par oxydation en acide phaséique (Cutler and Krochko, 1999).

2. Rôles physiologiques de l'ABA

Comme les autres phytohormones, l'acide abscissique a de multiples fonctions dans les plantes (Leung and Giraudat, 1998). La détermination de ces fonctions a d'abord été basée sur l'observation des variations de concentration d'ABA endogène et des réponses à l'application d'ABA exogène. La génétique, via l'isolement de nombreux mutants de biosynthèse et de signalisation de l'ABA chez de nombreuses espèces, a permis de confirmer ces rôles biologiques.

L'ABA est d'abord considéré comme un inhibiteur de croissance. En effet, l'application exogène d'ABA sur de nombreux organes en croissance inhibe celle-ci, et son application sur des organes qui ont arrêté toute croissance provoque généralement une diminution des synthèses nucléiques et protéiques, une perturbation des membranes et des niveaux des autres phytohormones, et favorise la sénescence et l'abscission. Cependant, cette fonction d'inhibiteur n'est pas généralisable puisque de fortes concentrations en acide abscissique peuvent être présentes dans les jeunes feuilles ou les bourgeons en croissance.

Un rôle majeur de cette phytohormone se retrouve au niveau du développement et de la germination des graines. Deux pics d'ABA ont été identifiés lors du développement des graines d'*Arabidopsis*. Le premier, d'origine maternel, a lieu pendant la maturation. Il participe à la mise en place des réserves au sein de la graine et à l'initiation du programme de tolérance à la dessiccation. Le second, d'origine embryonnaire, a lieu lors de la dessiccation et permet notamment l'entrée en dormance. Enfin, la synthèse d'ABA au moment de l'imbibition permet le maintien de la dormance et a un effet inhibiteur sur la germination, de manière antagoniste aux gibbérellines. Chez les plantes pérennes, on retrouve un rôle analogue de l'ABA au niveau de l'induction de la dormance des bourgeons.

Enfin l'ABA joue un rôle dans la résistance des plantes à de nombreux stress et est de ce fait surnommée "hormone du stress". C'est notamment le cas lors d'attaques de certains pathogènes, de périodes anormalement chaudes, de stress oxydatifs liés à un manque d'oxygène (inondations par exemple), et enfin d'un stress hydrique lié à un stress osmotique (composante d'un stress salin), une période de gel ou de sécheresse. Elle agit dans la plupart de ces cas en interaction avec d'autres facteurs ou hormones (agonistes et/ou antagonistes) et c'est l'intégration de voies ABA-dépendantes et ABA-indépendantes qui permet la mise en place d'une réponse spécifique adaptée au stress subi. L'ABA gouverne la mise en place de

nombreuses réponses adaptatives qui permettent à la plante de lutter contre ces stress. Lors d'un stress hydrique par exemple, elle induit notamment la synthèse de protéines et d'osmolytes, et influence le métabolisme général et le développement des plantes via la régulation de l'expression de nombreux gènes. Enfin, l'ABA induit la fermeture rapide des stomates et empêche leur réouverture lors d'un stress hydrique. C'est cette dernière fonction qui nous intéresse particulièrement dans le cadre de ce travail.

4. Rôle de l'ABA dans la fermeture stomatique en réponse à un stress hydrique

Nous avons vu dans les paragraphes précédents que la fermeture des stomates était l'une des réponses les plus rapides et les plus critiques lors d'un stress hydrique. Certains arguments suggèrent l'existence de deux voies de signalisation en réponse à un stress hydrique, l'une ABA-dépendante et l'autre ABA-indépendante (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1996). Cependant, de nombreuses expériences utilisant des mutants de biosynthèse chez de nombreuses espèces végétales dont *Arabidopsis thaliana* (Koornneef et al., 1982; Leon-Kloosterziel et al., 1996; Marin et al., 1996) ou des plantes exprimant un anticorps dirigé contre l'ABA (Artsaenko et al., 1995) prouvent que l'ABA endogène est le principal signal induisant la fermeture stomatique en réponse à un tel stress. En effet, toutes ces plantes quasiment dépourvues d'ABA libre présentent un fort flétrissement, caractéristique de l'incapacité des plantes à fermer leurs stomates. De plus, l'application d'ABA exogène sur ces plantes permet la réversion du phénotype, ce qui montre que ce caractère est directement lié à la déficience en ABA.

Tous les tissus de la plante sont capables de synthétiser de l'ABA en réponse à une diminution du potentiel de turgescence. Dans le cas d'un stress hydrique, le déficit en eau du sol provoque une diminution du potentiel hydrique de tous les organes de la plante, en particulier des feuilles, ce qui se traduit, à long terme, par un flétrissement. On peut se demander si la fermeture stomatique est provoquée par l'ABA libéré au niveau des feuilles (synthèse *de novo* ou relargage) ou par de l'ABA qui proviendrait des racines, organes percevant directement le stress initial. Des expériences de "split-root" consistant à mettre une moitié de l'appareil racinaire d'une plante en condition de stress hydrique tout en continuant à arroser normalement l'autre partie, ont montré qu'il existe un signal racinaire induisant la fermeture stomatique, indépendamment de l'état hydrique des parties aériennes (Gowing et al., 1990). De plus, l'étude cinétique des événements se déroulant lors d'un stress hydrique a montré que la conductance stomatique était affectée avant toute modification du potentiel hydrique des feuilles, et était corrélée directement à la concentration en ABA de la sève brute,

elle-même corrélée à l'état hydrique de l'appareil racinaire (Zhang and Davies, 1990). L'ABA synthétisé dans les racines en réponse à un déficit hydrique du sol est donc primordial pour induire la fermeture stomatique avant toute modification de l'état hydrique des parties aériennes, dans le but d'éviter le stress ("drought avoidance"). C'est l'ABA apoplastique qui est perçu par les cellules de garde puisque celles-ci ne disposent pas de plasmodesme. A un stade plus avancé du stress hydrique, la perturbation de l'état hydrique des parties aériennes induirait une augmentation de la synthèse d'ABA dans les feuilles. Cet ABA foliaire permettrait à ce stade la mise en place de mécanismes de tolérance au stress ("drought tolerance"). L'ABA est donc un signal qui permet la réponse des stomates à des modifications de l'état hydrique du sol.

Des études récentes ont montré que la fermeture des stomates en réponse à une diminution de l'hygrométrie de l'air était indépendante des voies de signalisation de l'ABA (Assmann et al., 2000). Cependant, le mutant *hat1* (pour "*harmattan tolerant 1*") résistant aux conditions xéothermiques (forte chaleur et faible hygrométrie) est hypersensible à l'ABA (Yan et al., 2006). Le rôle précis de l'ABA dans la médiation de stress hydriques affectant directement l'appareil végétatif aérien reste donc à déterminer.

II. BASES MOLECULAIRES DE LA REPOSE DES CELLULES DE GARDE A L'ABA

1. Mécanismes cellulaires provoquant la fermeture des stomates

1. Les flux d'ions et d'osmolytes contrôlent les mouvements stomatiques

Nous avons vu précédemment que le contrôle de l'ouverture stomatique était dû à la régulation de l'état de turgescence des cellules de garde, par des mouvements d'ions et d'osmolytes (Roelfsema and Hedrich, 2005). Durant une phase d'ouverture, les cellules de garde accumulent notamment du potassium, des anions (chlorure, malate) et du saccharose (Raschke, 1979; MacRobbie, 1983; Talbott and Zeiger, 1996). L'augmentation du potentiel osmotique entraîne une diminution initiale du potentiel hydrique, compensée très rapidement par une entrée massive d'eau, ce qui entraîne l'ouverture du pore. Les mécanismes de fermeture, au contraire, mettent en jeu un efflux de potassium et d'anions, et la diminution de la concentration en sucres osmotiquement actifs. Ces efflux ont lieu de manière couplée au niveau du tonoplaste et du plasmalemme puisque l'eau et les osmolytes sont principalement stockés dans la vacuole.

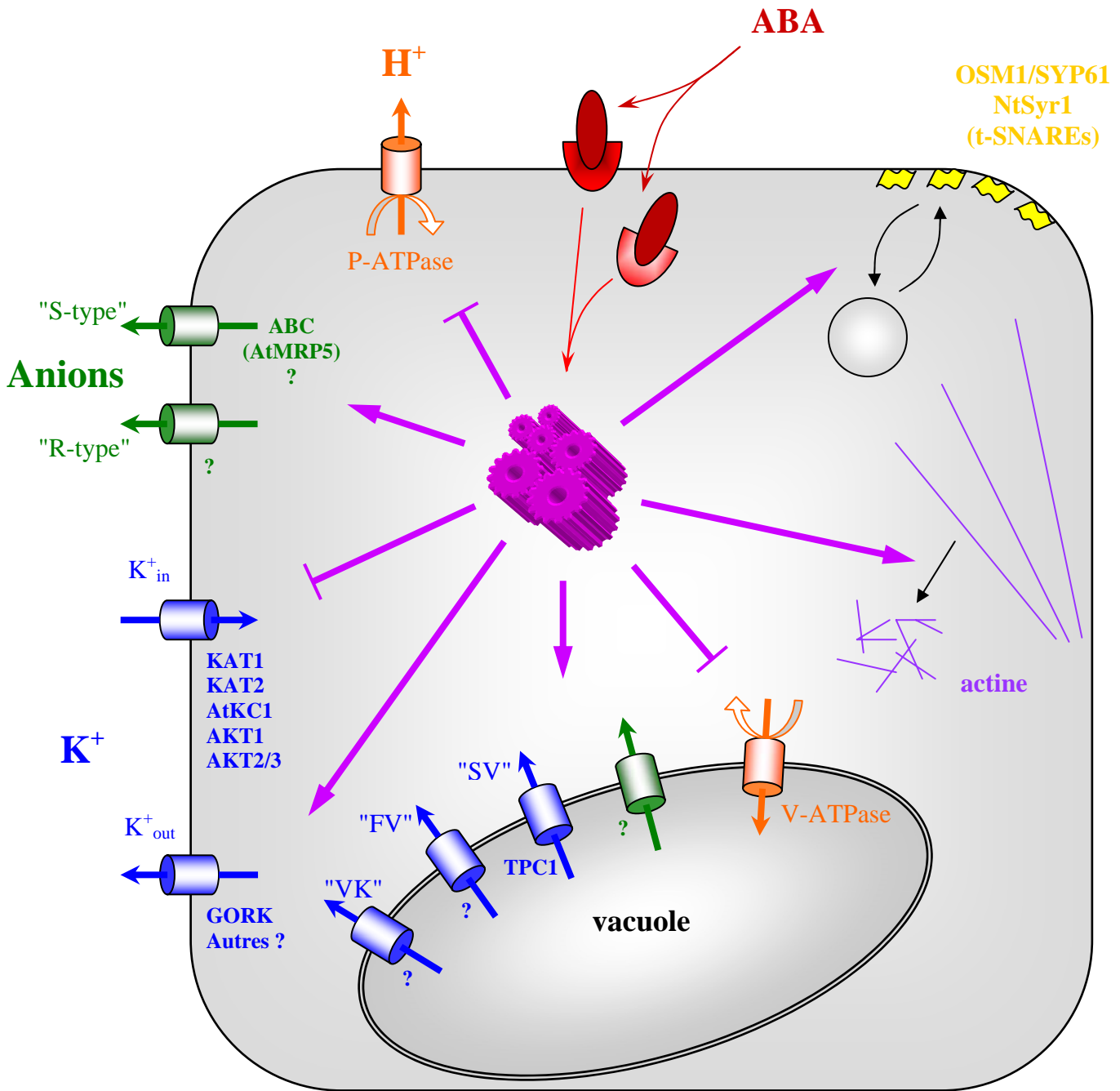


Figure 4 : Les effecteurs de la fermeture stomatique en réponse à l'ABA

En réponse à la perception membranaire ou cytosolique de l'ABA, la mise en place d'une voie de signalisation aboutit à la régulation de différents effecteurs qui régulent l'état de turgescence et la forme des cellules de garde. Les principales composantes de cette réponse sont l'activation des efflux de potassium et d'anions au niveau du plasmalemme et du tonoplaste, l'inhibition de l'influx de potassium et des pompes à protons, l'activation de la dépolymérisation de l'actine, et la réduction de la surface membranaire.

2. Canaux et pompes : les effecteurs de la signalisation ABA

L'isolation des cellules de garde par rapport au réseau symplasmique de la plante en fait un système approprié pour les études électrophysiologiques. De nombreuses études sur diverses plantes modèles, notamment *Arabidopsis thaliana* et *Vicia faba*, ont permis une meilleure compréhension de l'implication des courants ioniques dans les mouvements stomatiques (figure 4). L'ABA induit tout d'abord une activation des canaux anioniques sortants, ce qui provoque un efflux de nombreux anions (chlorure, malate, nitrate, ...). Deux types de canaux anioniques (Schroeder and Keller, 1992), l'un, "R-type", à activation rapide, transitoire et fortement dépendante du voltage (Keller et al., 1989), et l'autre, "S-type", à activation lente, durable et faiblement dépendante du voltage (Schroeder and Hagiwara, 1989), sont responsables de cet efflux et de la dépolarisation du plasmalemme (Raschke et al., 2003; Roelfsema et al., 2004). Cette dépolarisation est également facilitée par l'inhibition des pompes H⁺/ATPases de la membrane plasmique (Goh et al., 1996). Elle active alors les canaux potassiques sortants qui permettent l'efflux de K⁺ (Schroeder et al., 1987). Tous ces courants doivent être couplés à l'efflux d'anions et de potassium de la vacuole mais la génération de ces courants au niveau du tonoplaste est encore mal comprise. Trois types de canaux perméants pour le potassium ont été caractérisés dans la membrane vacuolaire des cellules de garde : "Slow-Vacuolar" (SV), "Fast Vacuolar" (FV) et "Vacuolar K⁺-selective" (VK) (Roelfsema and Hedrich, 2005).

Au niveau moléculaire, aucun canal anionique sortant impliqué dans la fermeture stomatique n'a encore été identifié (Roelfsema and Hedrich, 2005). Des études pharmacologiques (Leonhardt et al., 1999) ont suggéré que les canaux "S-type" pourraient correspondre à des protéines ABC (ATP-Binding Cassette). La disruption du gène *AtMRP5*, codant une protéine de la famille des transporteurs ABC, aboutit à une absence de réponse des cellules de garde à des signaux induisant l'ouverture ou la fermeture des stomates, en particulier l'ABA (Klein et al., 2003).

En ce qui concerne les canaux potassiques, les approches de génétique inverse ont permis d'impliquer plusieurs membres de la famille "Shaker" de canaux entrants (KAT1, KAT2, AKT1, AKT2/3, AtKC1) dans l'influx de potassium mis en jeu lors de l'ouverture des stomates (Anderson et al., 1992; Sentenac et al., 1992; Pilot et al., 2001; Szyroki et al., 2001). Au contraire, il n'existe qu'un gène codant un canal potassique sortant dans la membrane plasmique des cellules de garde : *GORK* (Ache et al., 2000). Cependant, dans le mutant *gork-1*, la fermeture stomatique en réponse à l'ABA n'est pas abolie mais simplement ralentie (Hosy et al., 2003). Cela signifie qu'il existe certainement d'autres mécanismes d'efflux de

potassium. En ce qui concerne le tonoplaste des cellules de garde, une étude récente a montré que le représentant de la famille TPC ("Two Pore Channel") chez *Arabidopsis*, TPC1, correspond au canal "Slow-Vacuolar" (Peiter et al., 2005). Ce canal cationique est peu sélectif pour les ions divalents (Ca^{2+}) par rapport aux ions monovalents (K^+). Cependant, le mutant *tpc1-2*, comme le surexprimeur, sont affectés dans l'inhibition de l'ouverture des stomates en réponse au calcium mais pas en réponse à l'ABA.

Enfin les transports de protons sont réalisés par des P-ATPases au niveau du plasmalemma (Becker et al., 1993) et des V-ATPases au niveau du tonoplaste.

3. D'autres mécanismes cellulaires participent à la fermeture stomatique

Les mécanismes présentés ci-dessus constituent le moteur des mouvements stomatiques. Cependant, ils sont accompagnés de modifications structurales des cellules de garde. En effet, le volume de ces cellules lorsque les stomates sont fermés est jusqu'à 40% inférieur à leur volume lorsqu'elles sont turgescentes (stomates ouverts). Cette diminution du volume cellulaire s'accompagne d'une réduction de la surface membranaire, via l'internalisation vésiculaire (Shope et al., 2003), et d'une fragmentation des vacuoles (Gao et al., 2005). Les modifications de la surface du plasmalemma via la fusion ou l'internalisation de vésicules permettent également un contrôle de la distribution de certains canaux effecteurs présentés précédemment, ce qui a été démontré dans le cas des canaux potassiques et notamment de KAT1 (Homann and Thiel, 2002; Hurst et al., 2004). Enfin, une syntaxine de type t-SNARE (*soluble NSF [N-ethylmaleimide-sensitive factor] adaptor protein receptor*) de la membrane plasmique des cellules de garde, NtSYR1, a été isolée lors d'un crible pour trouver des récepteurs à l'ABA chez le tabac (Leyman et al., 1999). Chez les animaux et les plantes, les syntaxines de type SNARE sont impliquées dans les mécanismes de trafic vésiculaire et de fusions membranaires (Jahn and Sudhof, 1999). La disruption de la fonction de NtSYR1 aboutit à une perturbation de la régulation par l'ABA des courants de potassium et de chlorure dans la cellule de garde. Chez *Arabidopsis*, un mutant d'insertion dans un gène homologue avec les syntaxines de type SNARE (*osm1/syp61*) a été isolé lors d'un crible de réponse aux stress osmotiques (Zhu et al., 2002). Le gène *OSM1/SYP61* est très fortement exprimé dans les cellules de garde, et la fermeture des stomates en réponse à l'ABA est fortement affectée chez le mutant. Ces données soulignent l'importance du trafic membranaire dans la réponse des cellules de garde à l'ABA.

Des études montrent également l'importance du cytosquelette dans les mouvements des stomates. Ainsi l'actine s'organise sous la forme de filaments radiaux dans des cellules de

garde turgescentes de *Commelina communis*. En réponse à l'ABA, ces filaments se déstructurent, se raccourcissent et acquièrent une orientation aléatoire (Eun et al., 2001). Des travaux suggèrent également une désorganisation des microtubules dans les cellules de garde lors des mécanismes d'ouverture et de fermeture des stomates sans que ces modifications n'aient été reliées à la réponse à l'ABA (Yu et al., 2001; Lahav et al., 2004).

4. Régulation de l'expression génétique et contrôle de l'ouverture stomatique

Un des effets majeurs de l'ABA dans la plante est la régulation de l'expression de nombreux gènes dans les différents tissus (Xie et al., 2005). Les gènes ainsi régulés codent notamment des protéines de réserve ou des protéines participant à la protection contre la dessiccation comme les LEA ("late embryogenesis abundant") au niveau des graines. Dans les tissus végétatifs, la modification de l'expression génétique par l'ABA participe au contrôle du développement des plantes et à la mise en place de mécanismes de protection en réponse aux stress subis. Ainsi plusieurs gènes appartenant aux familles *RD* ("*responsive to dehydration*"), *RAB* ("*responsive to abscisic acid*"), *ERD* ("*early response to dehydration*"), *COR* ("*cold regulated*"), *LTI* ("*low temperature induced*") ou *KIN* ("*kikna induoidu*" = "cold induced") sont induits plus ou moins précocement par l'ABA, de même que certains gènes eux-mêmes impliqués dans les voies de transduction du signal ABA.

Des motifs caractéristiques se retrouvent dans les promoteurs de tous ces gènes. Il s'agit des ABRE ("ABA responsive elements"), des CE ("coupling elements") et des motifs RY, qui sont combinés pour former des ABRC ("ABA response promoter complexes"). De nombreux facteurs de transcription ont été impliqués en tant qu'éléments *trans* participant à la régulation de l'expression de ces gènes et à la mise en place de réponses spécifiques à l'ABA. Ainsi, des protéines de type bZIP ("basic leucine-zippers"), induites par différents stress, se lient spécifiquement aux ABRE pour activer la transcription des gènes cibles. Ces facteurs de transcription ont été nommés ABF (ABRE binding factors) ou AREB (ABA responsive elements binding proteins) (Choi et al., 2000). D'autres facteurs de transcription, comme des protéines de type MYC ou MYB qui se lient à des motifs spécifiques, ou des facteurs de transcription à domaine B3 qui se lient aux éléments RY, modulent l'expression de différents gènes en réponse à l'ABA.

Dans la cellule de garde, de nombreux gènes sont également régulés par l'ABA comme le confirme une étude basée sur une approche de transcriptomique (Leonhardt et al., 2004). Parmi ces gènes, certains participent à la mise en place de mécanismes de protection communs à beaucoup d'autres types cellulaires, et d'autres sont plus spécifiques des cellules

Table 1. Facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'ouverture stomatique

Facteur(s) de transcription	Famille	Fonction	Références
ABF3, ABF4	bZIP ^a	<u>Surexpressueur</u> : Hypersensible à l'ABA (notamment fermeture stomatique et résistance à la sécheresse)	Kang et al., 2002
ATHB6	HD-ZIP ^b	Expression induite par l'ABA <u>Surexpressueur</u> : Insensible à l'ABA (notamment perte d'eau)	Himmelbach et al., 2002
AtMYB60	R2R3-MYB	Expression réprimée par l'ABA <u>Mutant</u> : - ouverture des stomates (lumière), réponses normales à l'ABA	Cominelli et al., 2005
AtMYB61	R2R3-MYB	<u>Mutant</u> : stomates + ouverts <u>Surexpressueur</u> : stomates - ouverts Réponses normales à l'ABA	Liang et al., 2005
AtERF7	AP2/EREBP ^c	Répresseur transcriptionnel <u>Surexpressueur</u> : - sensibilité CG* à l'ABA <u>RNAi</u> : + sensibilité CG* à l'ABA	Song et al., 2005

* CG : cellules de garde

^a basic leucine zipper

^b homeodomain leucine zipper

^c APETALA2/Ethylene response element binding protein

de garde, voire directement impliqués dans la transduction du signal ABA induisant la fermeture stomatique. Cette régulation de l'expression génétique par l'ABA peut donc influencer les réponses des stomates aux différents stress. Plusieurs facteurs de transcription de différentes familles ont été impliqués dans la régulation de l'état d'ouverture des stomates (table 1). Cependant, seule l'étude de AtERF7 a permis de démontrer formellement l'implication de cette protéine dans la réponse des stomates à l'ABA (Song et al., 2005).

D'autre part, la régulation de l'expression génétique a également lieu à un niveau post-transcriptionnel via la maturation et le contrôle de la stabilité des ARNm. Des travaux ont montré l'existence de protéines de liaison à l'ARN qui participent à ces mécanismes et sont impliquées dans les réponses à l'ABA, comme SAD1 (Xiong et al., 2001), HYL1 (Lu and Fedoroff, 2000), ABH1 (Hugouvieux et al., 2001), et CBP20 (Papp et al., 2004). Les mutants *abh1* et *sad1* sont hypersensibles à l'ABA au niveau de la fermeture stomatique (Hugouvieux et al., 2002). Le mutant *cbp20* présente des phénotypes similaires à ceux de *abh1*, ce qui était attendu puisque CBP20 et ABH1 sont les deux sous-unités du même complexe de liaison à l'ARN (nCBC pour "nuclear cap binding complex"). CBP20, ABH1 et SAD1 semblent donc être des régulateurs négatifs de la transduction du signal ABA dans les cellules de garde.

Ces travaux montrent l'implication de la régulation de l'expression génétique dans le contrôle de l'état d'ouverture des stomates. Cependant, il est aujourd'hui impossible de déterminer clairement si ce contrôle de l'expression génétique n'est important que pour déterminer la sensibilité des cellules de garde à l'ABA, via la mise en place correcte des composants des voies de signalisation, ou s'il participe activement à la réponse de ces cellules aboutissant à la fermeture stomatique ou à son maintien après la perception du signal ABA.

2. Approches pour l'étude de la perception et de la transduction du signal ABA

Afin de progresser dans la compréhension des voies de signalisation de l'ABA, de nombreuses approches ont été menées en parallèle en utilisant différents systèmes (suspensions cellulaires, cellules de garde, protoplastes dérivés de divers types cellulaires, plantes entières) provenant de plusieurs espèces telles que *Arabidopsis thaliana*, *Vicia faba*, *Commelina communis*, *Nicotiana tabacum*, *Oryza sativa*, ou *Zea mays* (Rock, 2000). Avant de présenter l'état actuel des connaissances sur la transduction du signal ABA aboutissant à la régulation de l'ouverture stomatique, il est donc utile de résumer les différentes approches qui ont permis une telle progression. Ces approches sont de deux types.

1. Pharmacologie, biochimie et biologie cellulaire

L'utilisation d'inhibiteurs est une approche efficace pour l'analyse des voies de transduction des signaux. Dans le cas de la transduction du signal ABA, de nombreuses études sont basées sur l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de certains canaux ioniques comme le lanthane (La^{3+} - canaux calciques) ou l'acide anthracène-9-carboxylique (A9C - canaux anioniques), ou sur l'utilisation d'inhibiteurs de protéines kinases ou phosphatases comme le K252a, la staurosporine (kinases), la cyclosporine A ou l'acide okadaïque (phosphatases). De la même manière, l'utilisation de chélateurs et d'analogues inactifs ou non hydrolysables de certaines molécules permet de mettre en évidence leur rôle dans la transduction du signal. Ces dernières stratégies sont souvent complétées par l'application ou l'injection de molécules actives ou d'ions.

Plusieurs composantes de la réponse des cellules de garde peuvent être étudiées au niveau cellulaire. C'est notamment le cas des différents courants ioniques qui ont été caractérisés par des approches électrophysiologiques. L'utilisation de sondes fluorescentes et de techniques d'imagerie a également permis de suivre les concentrations de différents ions ou molécules en réponse à l'ABA. C'est notamment le cas du calcium dont plusieurs techniques d'imagerie permettent de suivre la concentration (Rudd and Franklin-Tong, 2001). L'imagerie cellulaire est également utilisée pour localiser les protéines impliquées dans la transduction du signal ABA et leur éventuelle relocalisation en réponse à l'ABA.

Enfin, les méthodes de biochimie ont permis de caractériser ou d'identifier de nombreux éléments de la signalisation ABA. Plusieurs kinases activées par l'ABA ont par exemple été purifiées à partir d'extraits cellulaires avant d'être identifiées au niveau moléculaire. De même, d'autres protéines de la voie de signalisation ont été isolées par interaction (double-hybride, co-immunoprécipitation) avec des éléments déjà caractérisés de la transduction du signal ABA.

2. Approches génétiques

La génétique classique a permis d'isoler de nombreux mutants affectés dans la voie de signalisation de l'ABA dans la cellule de garde. Cependant, pendant longtemps la recherche de tels mutants a été réalisée à l'aide de cribles basés sur d'autres réponses à l'ABA. En effet, il était difficile de concevoir une méthode assez simple, rapide et fiable pour réaliser un crible où le phénotype observé est la réponse des stomates à l'ABA. Ainsi de nombreux cribles ont permis l'identification de mutants de réponse à l'ABA à partir des phénotypes de graines non dormantes, de perte ou de gain de sensibilité à l'ABA au moment de la germination (parmi

A

- ✓ La transformation de l'eau liquide en vapeur consomme de l'énergie
⇒ La transpiration abaisse la température foliaire

- ✓ L'émission maximale d'un corps noir est fonction de la température :

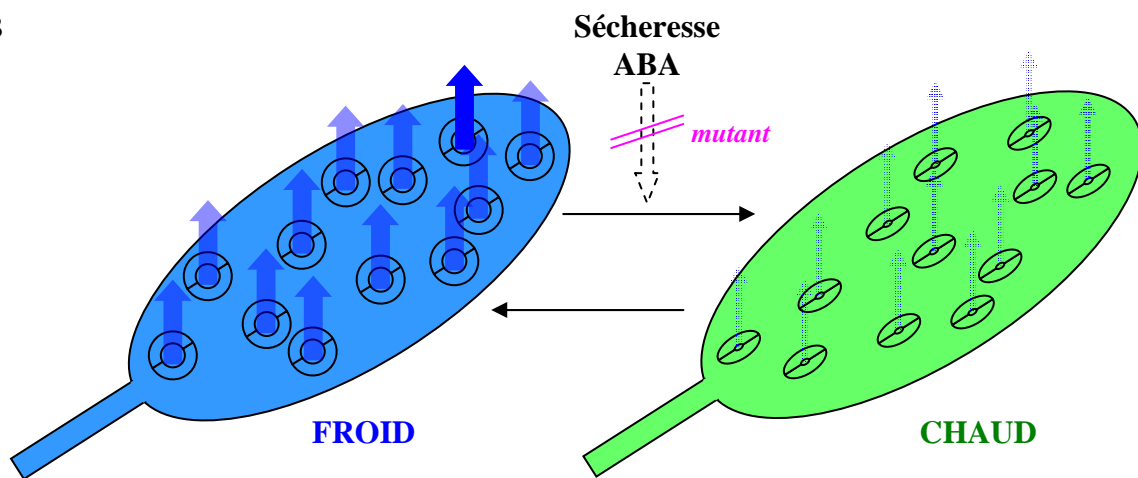
$$\lambda_{\max(\text{nm})} = 3,6 \cdot 10^6 / (T(^{\circ}\text{C}) + 273)$$

$$\Rightarrow \text{à } 25^{\circ}\text{C} : \lambda_{\max} = 12 \mu\text{m} \quad (\text{rayonnement IR})$$

- ✓ L'intensité du rayonnement IR est fonction de la température (E) :

$$E = 2\varepsilon\sigma (T(^{\circ}\text{C}) + 273)^4$$

B



C

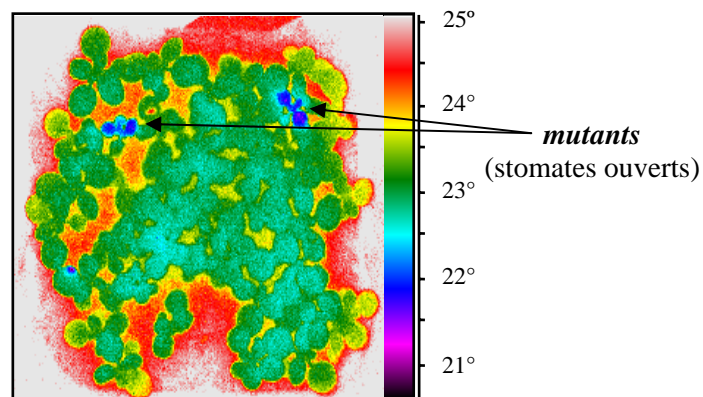


Figure 5 : Principe de la thermographie infrarouge

A. Les 3 principes qui régissent la thermographie infrarouge (IR). $T(^{\circ}\text{C})$: température en $^{\circ}\text{C}$; λ_{\max} : longueur d'onde d'émission maximale; ε : émissivité; σ : constante de Stephan-Boltzmann. **B.** Principe du crible de mutants affectés dans la fermeture stomatique utilisant la thermographie infrarouge. **C.** Exemple de photo IR de plantules d'*Arabidopsis* ayant subi 4 jours de sécheresse (fausses couleurs avec échelle en $^{\circ}\text{C}$).

lesquels les mutants "*abi*" pour "*ABA insensitive*" et "*era*" pour "*enhanced response to ABA*"), de croissance des plantules ou des racines, ou encore à partir de l'expression de gènes rapporteurs contrôlés par l'ABA (Koornneef et al., 1984; Cutler et al., 1996; Ishitani et al., 1997; Himmelbach et al., 1998; Foster and Chua, 1999; Lopez-Molina and Chua, 2000). Des recherches de mutants suppresseurs d'insensibilité à l'ABA ou aux gibbérellines (antagonistes lors de la germination) ont également été effectuées (Steber et al., 1998; Beaudoin et al., 2000; Ghassemian et al., 2000). Enfin, plusieurs mutants affectés dans la transduction du signal ABA ont également été isolés à partir de cribles de sensibilité à d'autres phytohormones (auxines, éthylène, brassinostéroïdes) ou facteurs environnementaux (salinité, sucres), du fait des nombreuses interactions entre les différentes voies de signalisation.

Tous les mutants isolés à partir de ces cribles sont affectés dans diverses réponses à l'ABA. C'est pourquoi le groupe de Jérôme Giraudat, au sein duquel j'ai débuté ma thèse, a mis au point un nouveau type de crible basé sur le phénotype d'ouverture stomatique afin d'isoler des mutants spécifiques de la transduction du signal ABA dans la cellule de garde, et donc non décelables par les cribles précédents (Merlot et al., 2002). Il est basé sur le principe de thermographie infrarouge, expliqué figure 5, qui permet d'observer la température foliaire (corrélée à l'état d'ouverture des stomates) en réponse à un stress hydrique. Plusieurs mutants ne fermant plus leurs stomates en réponse à ce stress, appelés "*ost*" pour "*open stomata*", ont pu ainsi être isolés. Parmi ceux-ci, certains sont affectés dans la voie de biosynthèse de l'ABA et d'autres dans la transduction du signal ABA dans la cellule de garde.

Enfin, le séquençage des génomes d'*Arabidopsis* et du riz (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) et les collections de mutants d'insertion ont permis le développement des approches de génétique inverse. De nombreux travaux récents s'appuient sur ces stratégies et permettent de caractériser de nouvelles protéines impliquées dans la signalisation ABA.

Les approches génétiques sont complémentaires des approches décrites dans le paragraphe précédent et la plupart des travaux actuels sont basés sur des combinaisons de ces différentes stratégies.

3. La perception du signal ABA

1. Des sites de perception multiples

De nombreux travaux ont visé à identifier les récepteurs de l'ABA. Nous avons vu, dans le premier chapitre, que seule la voie apoplastique permettait à l'ABA d'arriver jusqu'aux cellules de garde. L'hypothèse de sites de perception extracellulaires a été vérifiée par

plusieurs études. Dans les années 80 tout d'abord, des expériences de radiomarquage ont mis en évidence plusieurs sites de fixation de haute affinité sur la membrane plasmique de cellules de garde de *Vicia faba* (Hornberg and Weiler, 1984). Cependant aucune des protéines impliquées n'a été identifiée depuis ces travaux. Plus récemment, des expériences utilisant une forme imperméante de l'ABA (couplée avec de la BSA) sur des cellules de riz ou d'*Arabidopsis* ont montré que cette forme était capable d'induire l'expression de certains gènes de réponse à l'ABA et l'activation des canaux potassiques sortants (Schultz and Quatrano, 1997; Jeannette et al., 1999). Enfin, le même type d'approche a permis de montrer que la membrane plasmique contient des sites de fixation de l'ABA de nature protéique (Pedron et al., 1998).

D'autre part, l'ABA est un acide faible possédant un pKa de 4,8 du fait du groupement carboxyle. Dans un milieu de pH neutre, l'ABA est majoritairement sous forme anionique et non diffusible. En revanche, en milieu acide, l'ABA est protoné et peut diffuser à travers les membranes. Des sites intracellulaires de perception de l'ABA sont donc également envisagés. Là encore, des travaux ont permis de valider cette hypothèse. En effet, la libération d'ABA par photolyse de 2-NPE-ABA à l'intérieur de cellules de garde de *Commelina communis* est capable d'induire la fermeture stomatique (Allan et al., 1994). Toutes ces études indiquent la coexistence de sites de perception intra- et extracellulaires de l'ABA.

Cependant, malgré la mise en évidence de sites de fixation de haute affinité pour l'ABA, ces travaux n'ont pas encore abouti à l'identification moléculaire d'un récepteur dans les cellules de garde. Une approche biochimique de chromatographie d'affinité sur des extraits d'épidermes de feuilles de *Vicia faba* a permis la purification d'une protéine de 42kDa capable de lier spécifiquement l'ABA (Zhang et al., 2002). Malheureusement, le gène codant cette protéine n'a pas été identifié et l'implication de ce récepteur putatif dans les différentes voies de signalisation de l'ABA n'a pas été démontrée. Par ailleurs, l'expression d'un gène codant un récepteur kinase à domaine LRR ("Leucine Rich Repeat") est rapidement induite en réponse à l'ABA (Hong et al., 1997). Ce récepteur (RPK1) a été identifié comme un régulateur positif des différentes voies de signalisation ABA (germination, fermeture stomatique, expression de gènes, etc. - Osakabe et al., 2005). Cependant, rien n'indique pour l'instant qu'il soit capable de lier l'ABA.

2. FCA : un premier récepteur identifié

Plus récemment, une approche utilisant un anticorps anti-idiotypique pour cribler une banque d'ADNc de couches à aleurone d'orge a permis la purification et la caractérisation

Table 2. *Les seconds messagers impliqués dans la réponse des stomates à l'ABA*

Second(s) messenger(s)	Systèmes producteurs	Références
pH cytosolique		Irving et al., 1992
Ca ²⁺	Canaux calciques (plasmalemme et tonoplaste)	DeSilva et al., 1985 Schwartz, 1985 Schroeder and Hagiwara, 1989
H ₂ O ₂	NADPH oxydases (AtrbohD, AtrbohF)	Pei et al., 2000 Kwak et al., 2003
NO	Nitrate réductases NO synthase	Mata and Lamattina, 2001 Desikan et al., 2002 Neill et al., 2002 Guo et al., 2003
GMPc	guanylate cyclase	Garcia-Mata et al., 2003
ADPRc	ADPR cyclase	Leckie et al., 1998 Sanchez et al., 2004
Phosphatidyl-inositol phosphate (PI3P, PI4P)	PI3 et PI4 kinases (PI3K, PI4K)	Jung et al., 2002
Inositol-phosphates (IP ₃ , IP ₆)	Phospholipase C (PLC)	Gilroy et al., 1990 Lee et al., 1996 Staxen et al., 1999 Lemtiri-Chlieh et al., 2000 Burnette et al., 2003 Hunt et al., 2003
Sphingoïde-phosphates (S1P, PhytoS1P)	Sphingosine kinase (SphK)	Ng et al., 2001 Coursol et al., 2003 Coursol et al., 2005
Acide phosphatidique (AP)	Phospholipase D alpha (PLD α)	Jacob et al., 1999

d'une protéine capable de lier l'ABA, ABAP1 (Razem et al., 2004). Sa séquence est homologue à celle de la protéine FCA d'*Arabidopsis*, une protéine nucléaire de liaison à l'ARN impliquée dans la transition florale (Macknight et al., 1997). De plus, une étude récente a montré que FCA est bien capable de lier l'ABA avec une haute affinité, ce qui inhibe l'interaction entre FCA et son partenaire FY. Ces travaux ont donc permis, pour la première fois, d'identifier un gène codant un récepteur de l'ABA (Razem et al., 2006). Cette découverte confirme qu'il existe des sites de perception intracellulaires de l'ABA. Cependant, le gène *FCA* a une fonction spécifique dans le contrôle de la transition florale. A ce jour, les mécanismes de perception de l'ABA au niveau des cellules de garde demeurent inconnus.

4. Les seconds messagers impliqués dans la transduction du signal ABA

1. L'ABA met en jeu une large panoplie de seconds messagers

Les seconds messagers sont des molécules dont la production est augmentée en réponse au signal et dont l'application permet de mimer tout ou partie des réponses au stimulus. Au contraire, le blocage de la production d'un second messenger entraîne l'inhibition des réponses au stimulus. De nombreux travaux ont impliqué divers seconds messagers dans la transduction du signal ABA dans la cellule de garde, résumés dans la table 2.

L'une des modifications très précoces en réponse à la perception d'ABA est l'augmentation du pH cytoplasmique (Irving et al., 1992). Une telle augmentation de 0,2 à 0,4 unité est nécessaire et suffisante pour l'activation des courants sortants de potassium en réponse à l'ABA (Blatt, 1992; Blatt and Armstrong, 1993). Le pH contrôle également l'activité des canaux potassiques entrants (Grabov and Blatt, 1997).

Des travaux ont aussi montré que les formes activées d'oxygène, et notamment le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), sont produites rapidement en réponse au signal ABA, principalement par l'activité NADPH oxydase de AtrbohD et AtrbohF (Pei et al., 2000; Kwak et al., 2003). Ces molécules jouent un rôle important dans la transduction du signal dans les cellules de garde.

L'oxyde nitrique (NO) intervient dans de très nombreuses voies de signalisation impliquées dans le développement et les réponses aux stress biotiques et abiotiques, sans jamais en être un élément central (Shapiro and Gerald, 2005). Des travaux ont montré que son application provoque la fermeture des stomates (Mata and Lamattina, 2001) et que l'ABA induit une augmentation du niveau d'oxyde nitrique endogène (Neill et al., 2002), via deux systèmes producteurs chez *Arabidopsis thaliana* : la nitrate réductase et une NO synthase. En

effet, l'abolition de l'activité nitrate réductase chez le double mutant *nia1nia2* affecte fortement la fermeture stomatique (Desikan et al., 2002), et la diminution de la quantité d'oxyde nitrique dans le mutant *nos1*, affecté dans une activité NO synthase, engendre également un défaut de réponse des cellules de garde à l'ABA (Guo et al., 2003).

L'adénosine 5'-diphosphoribose cyclique (ADPRc) est un produit du métabolisme du NAD^+ . Des travaux ont clairement démontré son implication dans la transduction du signal ABA dans les cellules de garde (Leckie et al., 1998). De plus, une étude récente a montré l'activation d'une ADPR cyclase en réponse à l'ABA (Sanchez et al., 2004). L'augmentation de la concentration en ADPRc a d'autre part été corrélée avec la concentration en GMPc (Garcia-Mata et al., 2003).

Des travaux sur des épidermes de feuilles de *Commelina communis* ont mis en évidence le rôle important de la sphingosine-1-phosphate (S1P) et surtout de la phytosphingosine-1-phosphate (phytoS1P) formée à partir de la phytosphingosine, sphingoïde très abondant dans les cellules végétales, dans la fermeture des stomates en réponse à l'ABA (Ng et al., 2001; Coursol et al., 2005). Il a été montré que l'enzyme responsable de la production de S1P et de PhytoS1P chez *Arabidopsis thaliana*, la sphingosine kinase (SphK), est activée en réponse à l'ABA dans les cellules de garde (Coursol et al., 2003).

L'activité phospholipase D (PLD) a été impliquée dans de nombreuses voies de signalisation chez les plantes (Munnik, 2001) et notamment celle de l'ABA dans les cellules de garde (Jacob et al., 1999). Cette famille de phospholipases produit de l'acide phosphatidique (AP) directement à partir de phospholipides membranaires comme la phosphatidylcholine ou la phosphatidyléthanolamine. Des études ont montré que l'isoforme $\text{PLD}\alpha$ est particulièrement impliquée dans la fermeture des stomates en réponse à l'ABA (Sang et al., 2001).

Les phosphoinositides participent aussi à la voie de signalisation de l'ABA dans les cellules de garde. D'une part, des études ont montré l'importance des phosphatidyl inositol phosphates (PIP : PI3P et PI4P) et des kinases responsables de leur production (PI3K et PI4K) dans la fermeture des stomates en réponse à l'ABA (Jung et al., 2002; Park et al., 2003). D'autre part, de nombreux travaux concernant l'inositol 1,4,5 triphosphate (IP_3) et le myo-inositol hexakisphosphate (IP_6) ont montré l'implication des inositol phosphates dans la réponse des cellules de garde à l'ABA (Gilroy et al., 1990; Lee et al., 1996; Lemtiri-Chlieh et al., 2000; Burnette et al., 2003). De plus, l'activité phospholipase C (PLC) est nécessaire à la production de ces inositol phosphates en réponse à l'ABA (Staxen et al., 1999; Hunt et al., 2003).

Enfin, il est aujourd'hui clairement établi que le calcium est un second messager important dans les voies de transduction de nombreux signaux, aussi bien chez les animaux que chez les végétaux (Berridge et al., 2000; Sanders et al., 2002). De nombreuses études ont montré que le calcium cytosolique est impliqué à la fois dans l'inhibition de l'ouverture et dans l'induction de la fermeture des stomates par l'ABA chez diverses espèces (DeSilva et al., 1985; Schwartz, 1985; Schroeder and Hagiwara, 1989).

La grande diversité des messagers secondaires mobilisés en réponse à l'ABA dans les cellules de garde pose la question de leur place respective dans le mécanisme de signalisation. Dans les sections suivantes, nous allons voir comment, en partant de la signalisation calcique, il a été possible d'organiser certains de ces messagers en modules de transduction du signal ABA.

2. Le calcium cytosolique au carrefour de différentes voies de signalisation

L'acide abscissique induit une augmentation de la concentration en calcium cytosolique dans les cellules de garde (McAinsh et al., 1990; Gilroy et al., 1991; McAinsh et al., 1992), soumise à des oscillations d'une périodicité d'environ 10 minutes (Allen et al., 1999; Staxen et al., 1999; Allen et al., 2001). Cette augmentation est contrôlée par l'association de plusieurs mécanismes d'influx de calcium extracellulaire et de relargage de calcium compartimenté (Ng et al., 2001).

Au niveau de la cellule de garde, le calcium est un second messager partagé par de nombreux signaux dont certains sont antagonistes tels l'ABA et l'auxine qui induisent tous les deux une augmentation de la concentration en calcium cytosolique. Les caractéristiques des oscillations engendrées (fréquence, amplitude, durée) pourraient être spécifiques du type de signal relayé et contenir une information menant à une réponse appropriée (McAinsh and Hetherington, 1998). Le calcium est en ce sens un bon candidat comme intégrateur des différents signaux contrôlant un même paramètre, l'état d'ouverture des stomates.

La cinétique lente des oscillations dans le cas de l'ABA n'est pas compatible avec la fermeture initiale (ou fermeture réactive), très rapide (5 à 10 minutes) en réponse à ce signal (Roelfsema et al., 2004). Cependant, ces oscillations pourraient être impliquées dans une seconde phase de maintien des stomates fermés et d'inhibition de leur ouverture (ou fermeture programmée).

Le calcium permet à la fois d'inhiber les systèmes responsables de l'ouverture et d'activer des systèmes contribuant à la fermeture stomatique, principalement via la régulation de l'activité des canaux et pompes présentés auparavant. D'une part, il induit l'inhibition des

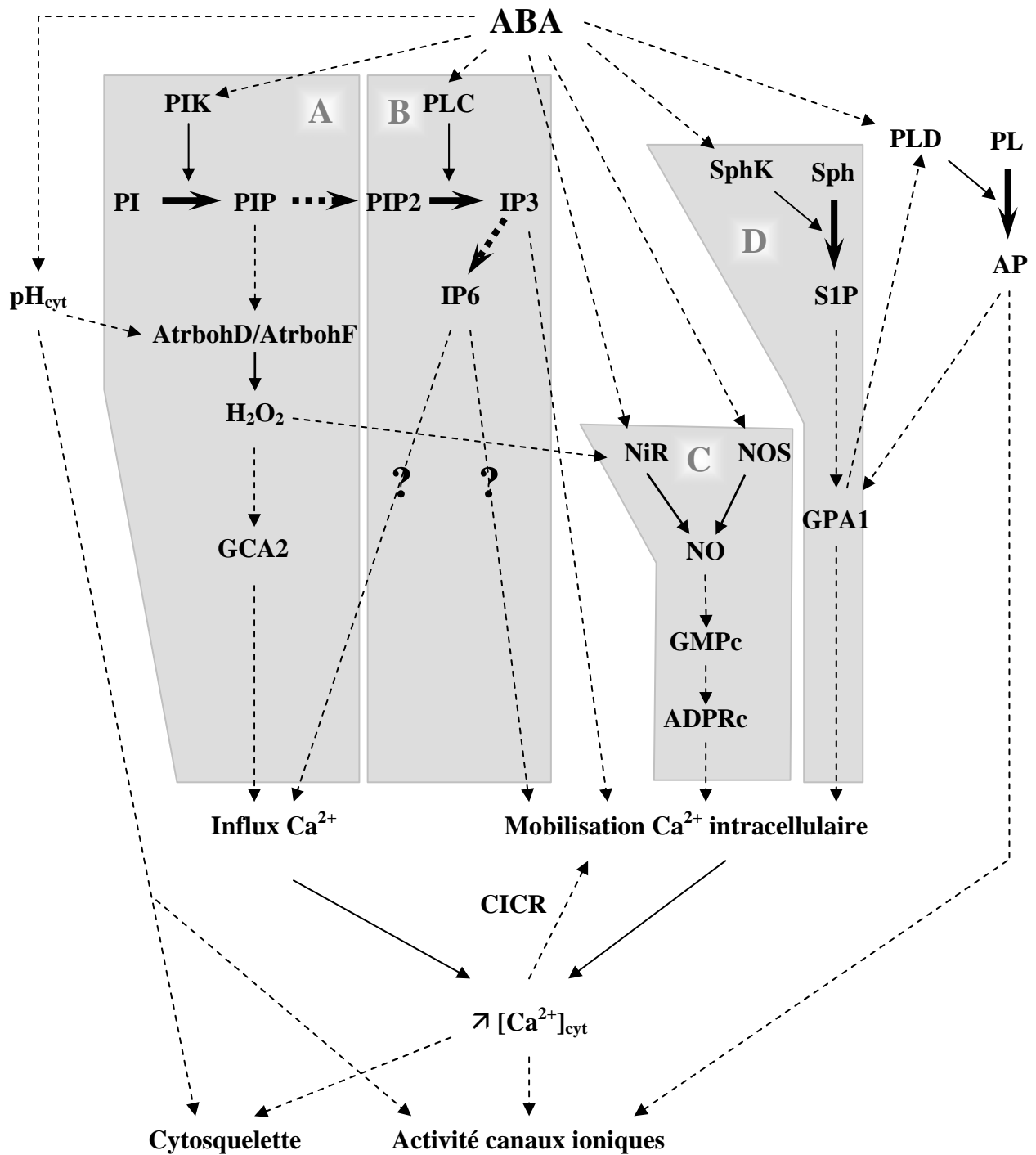


Figure 6 : Reconstitution de "modules de transduction" du signal ABA

Ce schéma montre les différentes branches de la voie de signalisation ABA ayant été caractérisées (boîtes grises). Cependant, tous ces "modules" (A, B, C et D) n'agissent pas forcément en parallèle et de nombreuses interactions sont déjà démontrées.

courants entrants de potassium au niveau de la membrane plasmique (Schroeder and Hagiwara, 1989) et bloque l'hyperpolarisation membranaire via l'inhibition de l'activité de la P-ATPase (Kinoshita et al., 1995). D'autre part, il active l'efflux d'anions au niveau du plasmalemma (Schroeder and Hagiwara, 1989) et les canaux potassiques vacuolaires de type "VK", mais aussi, à plus forte concentration, le canal "SV" perméant au calcium et au potassium (Ward and Schroeder, 1994; Allen and Sanders, 1996). Enfin, le calcium est impliqué dans la réorganisation des filaments d'actine en réponse à l'ABA (Hwang and Lee, 2001).

Il semble aujourd'hui indéniable que le calcium est un élément important de la transduction du signal ABA dans la cellule de garde. Cependant, il existe clairement des voies indépendantes du calcium puisque de nombreux effecteurs de ce signal peuvent aussi être activés en absence de toute augmentation de la concentration en calcium cytosolique (Allan et al., 1994; Grabov and Blatt, 1997; Jacob et al., 1999; Levchenko et al., 2005). L'implication exacte du calcium par rapport aux voies indépendantes du calcium et leurs interactions restent à préciser en fonction des différentes réponses de la cellule de garde à l'ABA (fermeture réactive, fermeture programmée).

3. La réponse calcique intègre l'action de divers messagers secondaires

Les travaux sur l'implication du calcium dans la transduction du signal ont néanmoins permis de définir un certain nombre de branches au sein des événements de signalisation mis en jeu en réponse à l'ABA. Ces modules, illustrés figure 6, sont composés de plusieurs seconds messagers présentés précédemment et de diverses protéines, et activent soit l'influx de calcium extracellulaire, soit la libération de calcium compartimenté, notamment dans la vacuole.

Tout d'abord, la production de H_2O_2 en réponse à l'ABA induit l'augmentation de calcium cytosolique via l'activation de canaux non sélectifs perméables au calcium par hyperpolarisation de la membrane plasmique (Pei et al., 2000). Cette activation des canaux d'influx calcique par H_2O_2 est affectée dans le mutant d'*Arabidopsis gca2*, insensible à l'ABA. Cependant, le gène *GCA2* (pour "growth control exerted by ABA 2") n'a pour l'instant pas été identifié. Chez les animaux, le complexe RBO (respiratory burst oxydase) producteur de H_2O_2 est activé par liaison du PI3P à l'une des protéines du complexe (Ellson et al., 2001). Des travaux ont montré que le PI3P produit par l'activité PI3K dans les cellules de garde est nécessaire à la production de H_2O_2 en réponse à l'ABA (Park et al., 2003). De plus, des études récentes ont montré que l'alcalinisation rapide du cytoplasme participe à l'induction de la

production de H₂O₂ par les NADPH oxydases en réponse à l'ABA (Suhita et al., 2004). L'ensemble de ces données permet de définir un premier module de signalisation aboutissant à l'influx calcique (module A figure 6).

Le rôle de l'ADPRc dans la mobilisation du calcium intracellulaire est connu depuis longtemps chez les animaux (Clapper et al., 1987; Lee et al., 1989). Des travaux ont clairement démontré son implication dans la libération de calcium vacuolaire dans les cellules de garde de *Commelina communis* (Leckie et al., 1998). Par ailleurs, la production de NO en réponse à l'ABA participe au relargage de calcium vacuolaire, sans en être totalement responsable, via la voie de signalisation faisant intervenir le GMPc et l'ADPRc (Garcia-Mata et al., 2003). Enfin, une étude récente montre que cette synthèse de NO, principalement via l'activité nitrate réductase, est dépendante de la production de H₂O₂ (Bright et al., 2006). Il apparaît donc une voie linéaire aboutissant au relargage du calcium intracellulaire compartimenté en réponse à l'ABA faisant intervenir successivement H₂O₂, l'oxyde nitrique, le GMPc et l'ADPRc (module C figure 6).

L'augmentation du calcium cytosolique et la réponse des stomates aux S1P et PhytoS1P sont altérées dans le mutant *gpa1* (Coursol et al., 2003; Coursol et al., 2005). GPA1 est la seule sous-unité G α formant les complexes protéines G hétérotrimériques codée dans le génome d'*Arabidopsis* (Jones and Assmann, 2004). Une première étude de ce mutant avait montré qu'il présente un défaut d'inhibition de l'ouverture stomatique par l'ABA (Wang et al., 2001). Ces travaux montrent l'implication des protéines G dans la mobilisation de calcium en réponse à l'activation de la SphK par l'ABA (module D figure 6). Chez les animaux, les complexes hétérotrimériques de protéines G sont bien souvent activés par l'interaction avec un récepteur de type GPCR (G protein coupled receptor). Chez *Arabidopsis thaliana*, GPA1 interagit avec GCR1, un homologue des GPCR animaux, au niveau de la membrane plasmique (Pandey and Assmann, 2004). Le mutant *gcr1* est hypersensible à l'ABA et au S1P dans les cellules de garde, ce qui indique que GCR1 n'est pas le récepteur de la S1P mais qu'il agit plutôt comme inhibiteur de GPA1. Enfin, une étude récente établit une connection entre la signalisation par la PLD et GPA1, comme indiqué sur la figure 6 : l'acide phosphatidique participe à l'activation de GPA1, ce qui, en retour, lèverait l'inhibition de la PLD α par GPA1_{GDP} et permettrait l'inhibition de l'ouverture stomatique par l'ABA (Mishra et al., 2006).

Enfin, les inositol-phosphates produits par la PLC (Module B, figure 6) contribuent également à l'augmentation de la concentration en calcium cytosolique dans les cellules de garde en réponse à l'ABA (Gilroy et al., 1990; Lemtiri-Chlieh et al., 2000).

4. Intégration des différentes voies de mobilisation du calcium

Comme nous venons de le voir, la signature calcique en réponse à l'ABA met en jeu un ensemble de modules de transduction du signal qui agissent au sein d'un réseau à plusieurs branches parallèles. En effet, dans certains cas, la perturbation de l'un de ces systèmes n'affecte que partiellement les réponses étudiées. De plus, certaines voies semblent contrôler uniquement un sous-ensemble de réponses : l'activité nitrate réductase, par exemple, ne paraît pas impliquée dans l'inhibition de l'ouverture stomatique. Cependant, ces voies ne sont pas totalement indépendantes les unes des autres. En effet, H₂O₂ peut réguler les systèmes d'influx calcique mais aussi de remobilisation de calcium compartimenté via la production de NO par l'activité nitrate réductase. De même, le pH participe à l'activation des NADPH oxydases et GPA1 interagit avec la voie PLD/AP, ce qui crée des connections entre des voies dites calcium-indépendantes et des voies participant à la régulation du calcium cytosolique (figure 6). De plus, aucun argument ne nous permet de déterminer avec certitude si les voies PLC/IP3 et S1P/protéines G agissent en parallèle ou non.

Enfin certaines études suggèrent qu'il existerait un phénomène de mobilisation du calcium elle-même induite par l'augmentation du calcium intracellulaire (CICR : calcium-induced calcium release) qui permettrait une amplification du signal calcique (Gilroy et al., 1990). Le canal "SV" tonoplastique est un bon candidat pour être un des effecteurs de ce mécanisme puisqu'il est régulé par le calcium cytosolique et permet la libération de calcium vacuolaire (Ward and Schroeder, 1994). Cependant, il est probable que d'autres canaux situés sur des endomembranes différentes participent également à ce phénomène (Ng et al., 2001).

5. Un rôle crucial de la membrane plasmique dans la réponse à l'ABA

Nous avons vu précédemment que des sites de perception de l'ABA existent au niveau de la membrane plasmique des cellules de garde. De plus, de nombreux effecteurs de la réponse des cellules de garde sont également localisés au niveau de cette membrane. C'est le cas des canaux anioniques et potassiques, mais également des syntaxines associées au trafic membranaire. Entre la perception du signal et les réponses rapides générées par ces effecteurs, de nombreux éléments de la voie de signalisation de l'ABA dans la cellule de garde sont également associés à la membrane plasmique, comme les canaux calciques, les phospholipases (PLC et PLD α), l'acide phosphatidique, de nombreux lipides membranaires, la PI3K, les NADPH oxydases et les protéines G.

Des récepteurs qui régulent positivement (comme RPK1, présenté § II.3.1) ou négativement (comme GCR1, présenté § II.4.3) la transduction du signal ABA dans les cellules de garde sont également associés à la membrane plasmique. Des Rho-GTPases de la sous-famille ROP ont aussi été identifiées comme régulateurs négatifs de la signalisation ABA dans la cellule de garde d'*Arabidopsis thaliana*. Ces protéines sont actives et associées à la membrane lorsqu'elles sont liées au GTP puis l'association avec des facteurs d'échange GTP/GDP conduit à une protéine inactive et cytoplasmique liée au GDP. Une première étude a montré que la protéine ROP6/RAC1/ARAC3 est un régulateur négatif contrôlant les modifications du cytosquelette d'actine induites par l'ABA (Lemichez et al., 2001). Plus récemment, des études ont montré qu'un mutant d'un autre membre de la famille ROP (*rop10*) est hypersensible à l'ABA au niveau de nombreuses réponses et notamment de la fermeture stomatique. La fonction de ROP10 nécessite sa localisation à la membrane plasmique (Zheng et al., 2002). Ces travaux confirment l'implication des Rho GTPases membranaires comme régulateurs négatifs de la transduction du signal ABA dans les cellules de garde.

L'association de ces protéines actives à la membrane plasmique est consolidée par prénylation et les prédictions montrent que ROP10 contient un motif de farnésylation alors que ROP6 contient un motif de géranylgeranylation. Le premier mutant hypersensible à l'ABA au niveau de la germination isolé (*eral* pour "enhanced response to abscisic acid 1") est affecté dans la sous-unité β d'une farnésyl-transférase (Cutler et al., 1996). Ce mutant est également hypersensible à l'ABA au niveau de la fermeture stomatique (Pei et al., 1998; Allen et al., 2002). De plus, un mutant affecté dans un gène codant la sous-unité β d'une géranylgeranyl-transférase (*ggb*) présente les mêmes phénotypes d'hypersensibilité à l'ABA que le mutant *eral* (Johnson et al., 2005). L'ensemble de ces travaux souligne l'importance des modifications post-traductionnelles qui permettent l'ancrage des protéines à la membrane plasmique, telles que la farnésylation ou la géranylgeranylation, dans la régulation de la transduction du signal ABA. Cependant, bien que ROP6 et ROP10 soient de bons candidats, les cibles prénylées par ces enzymes restent à déterminer.

6. Protéines kinases et phosphatases contrôlent la transduction du signal ABA

1. Les PP2C : des régulateurs majeurs de la signalisation ABA

Les gènes *AB11* et *AB12* (pour "ABA-insensitive") ont été identifiés grâce à un crible de mutants EMS insensibles à l'ABA lors de la germination. Ces gènes codent des protéines sérine-thréonine phosphatases de type 2C (PP2C). Les mutants dominants *abi1-1* et *abi2-1*

sont fortement affectés dans la fermeture stomatique en réponse à l'ABA (Leung et al., 1994; Meyer et al., 1994; Leung et al., 1997). Ces travaux montrent également que les deux gènes portent la même mutation ponctuelle dans les allèles *abi1-1* et *abi2-1* (G180D et G168D, respectivement). Les protéines codées par ces allèles ont une activité phosphatase fortement réduite *in vitro*. L'isolement de révertants intragéniques hypersensibles à l'ABA indique que ABI1 et ABI2 sont des régulateurs négatifs de la transduction du signal ABA et participent à un rétrocontrôle de ce signal (Gosti et al., 1999; Merlot et al., 2001).

ABI1 et ABI2 appartiennent à une sous-famille des PP2C d'Arabidopsis qui comprend plusieurs autres membres. Parmi eux, HAB1/AtPP2C-HA et AtPP2CA seraient également des régulateurs négatifs majeurs de la transduction du signal ABA, notamment au niveau de la fermeture stomatique (Leonhardt et al., 2004; Saez et al., 2004; Kuhn et al., 2006). En effet, les mutants d'insertion ADN-T dans les deux gènes correspondants montrent un fort phénotype hypersensible alors que les surexprimeurs révèlent une insensibilité à l'ABA. Enfin, l'expression des gènes *ABI1*, *ABI2*, *HAB1* et *AtPP2CA* est fortement induite en réponse à l'ABA. L'ensemble de ces résultats sur ABI1, ABI2, HAB1 et AtPP2CA montre que ces PP2C jouent un rôle régulateur négatif de la transduction du signal ABA, notamment dans les cellules de garde, et montrent l'importance des événements de phosphorylation et déphosphorylation dans la transduction du signal ABA.

Cependant, l'existence d'au moins quatre PP2C qui régulent toutes négativement la transduction du signal ABA dans la cellule de garde pose la question de la spécificité de chacune d'entre elles et de leurs redondances possibles. Des études suggèrent que les mutants *abi1* et *abi2* sont affectés à des niveaux différents de la transduction du signal ABA (Pei et al., 1997). Le mutant *abi1-1* semble affecté en amont de la production de H₂O₂ dans la voie de mobilisation du calcium alors que le mutant *abi2-1* semble affecté entre la production de H₂O₂ et l'influx calcique puisque l'ajout de H₂O₂ dans ce dernier n'induit pas d'influx calcique ni la fermeture des stomates qui en découle (Murata et al., 2001). Au contraire, d'autres travaux suggèrent que *abi1-1* et *abi2-1* sont tous les deux affectés en aval de l'activité nitrate réductase, ou même en aval de l'ADPRc pour *abi1-1*, dans la voie de signalisation ABA (Desikan et al., 2002; Wu et al., 2003). D'autre part, une étude récente montre qu'un mutant "knock-out" *abi1* n'est pas affecté dans les réponses des stomates à l'ABA (Mishra et al., 2006).

Des travaux ont montré que H₂O₂ est capable d'inactiver les deux protéines ABI1 et ABI2 *in vitro* (Meinhard and Grill, 2001; Meinhard et al., 2002). En ce qui concerne la protéine ABI1, il a été montré que l'activité de cette phosphatase est sensible au pH *in vitro*

Table 3. *Protéines kinases et phosphatases potentiellement impliquées dans la transduction du signal ABA dans la cellule de garde*

Type de protéine	Approches	Références
PP2C (ABI1, ABI2, HAB1, AtPP2CA)	Génétique	Leung et al., 1994 Meyer et al., 1994 Leung et al., 1997 Leonhardt et al., 2004 Saez et al., 2004 Kuhn et al., 2006
PP1, PP2A, PP2B^a	Pharmacologie électrophysiologie	Luan et al., 1993 Li et al., 1994 Thiel and Blatt, 1994 Kohler and Blatt, 2002
PP2B^a (calcineurine)	Electrophysiologie	Allen and Sanders, 1995
PP1, PP2A	Pharmacologie	Schmidt et al., 1995 Pei et al., 1997
PP2A (RCN1)	Génétique	Kwak et al., 2002
S/T kinases	Pharmacologie	Schmidt et al., 1995 Kohler and Blatt, 2002 Sokolovski et al., 2005
MAPK^a	Biochimie	Burnett et al., 2000 Lu et al., 2002 Gomi et al., 2005 Zhang et al., 2006
CDPK^a	Biochimie électrophysiologie	Li et al., 1998 Berkowitz et al., 2000 Komatsu et al., 2001
SnRK3 (PKS3)	Génétique Biochimie	Guo et al., 2002 Kim et al., 2003
SnRK2 (AAPK, OST1)	Génétique Biochimie	Li and Assmann, 1996 Li et al., 2000 Mustilli et al., 2002 Yoshida et al., 2002

^a Ces travaux n'ont pas démontré formellement l'implication dans la transduction du signal ABA dans la cellule de garde mais donnent des arguments en faveur d'une fonction potentielle

(Leube et al., 1998). De plus la mutation *abi1-1* affecte la régulation des courants potassiques par le pH intracellulaire mais pas l'augmentation de ce pH en réponse à l'ABA (Armstrong et al., 1995). Ces données suggèrent qu'ABI1 pourrait être inactivée par l'augmentation du pH cytosolique en réponse à l'ABA. Enfin, l'acide phosphatidique produit via l'activation de la PLD α en réponse à l'ABA peut interagir directement avec ABI1 *in planta*, ce qui conduirait à l'inactivation de cette protéine et l'activation de la fermeture stomatique (Zhang et al., 2004; Mishra et al., 2006). H₂O₂, pH et acide phosphatidique sont donc potentiellement impliqués dans la régulation de l'activité de ABI1 et des PP2C en réponse à l'ABA.

L'implication exacte des différentes PP2C, ainsi que leur régulation et leurs interactions dans la voie de transduction du signal ABA restent mal comprises à ce jour du fait du nombre de PP2C impliquées et des mutations dominantes *abi1-1* et *abi1-2* qui étaient les seules disponibles pendant longtemps. L'arrivée de mutants "knock-out" des gènes de la famille PP2C est une avancée majeure qui va probablement permettre de clarifier les connaissances actuelles.

2. De nombreuses kinases et phosphatases impliquées

Les résultats des approches génétiques ont mis l'accent sur l'importance des PP2C dans la transduction du signal ABA. Cependant, une combinaison d'approches pharmacologiques, électrophysiologiques, biochimiques et génétiques suggère également l'implication de protéines phosphatases de type PP1, PP2A et PP2B dans la voie de signalisation de l'ABA dans les cellules de garde (table 3). L'application d'acide okadaïque (inhibiteur des PP1 et PP2A) sur des cellules de garde augmente la fermeture des stomates induite par l'ABA chez *Vicia faba* (Schmidt et al., 1995) alors qu'elle l'inhibe chez *Arabidopsis thaliana* (Pei et al., 1997). Ces effets opposés chez *Arabidopsis* et la fève ne permettent pas de définir clairement si ces phosphatases sont des régulateurs positifs ou négatifs de la transduction du signal ABA. Cela pourrait s'expliquer par l'implication de plusieurs de ces phosphatases ayant des effets opposés dans cette voie de signalisation. En effet, des travaux sur la fève ont montré que l'activation des canaux calciques de la membrane plasmique en réponse à l'ABA est inhibée par l'action d'une protéine phosphatase de type 1 ou 2A (Kohler and Blatt, 2002). Au contraire, le mutant perte de fonction *rcn1*, affecté dans un gène codant une sous-unité régulatrice d'une PP2A chez *Arabidopsis thaliana*, présente des phénotypes pléiotropes dont une légère altération de la fermeture stomatique en réponse à l'ABA (Kwak et al., 2002). Ces travaux suggèrent que RCN1 serait un régulateur positif de la voie de signalisation ABA, notamment dans les cellules de garde. Enfin, une étude récente a montré que la P-ATPase,

activée par phosphorylation en réponse à la lumière bleue, est déphosphorylée en réponse à l'ABA dans les cellules de garde et que cette déphosphorylation est au moins en partie induite par la voie H₂O₂ (Zhang et al., 2004). Ces travaux présentent donc pour la première fois l'identification d'une cible d'une phosphatase régulant positivement la transduction du signal ABA dans la cellule de garde. Néanmoins, d'une manière générale, l'identification moléculaire des phosphatases impliquées et de leurs cibles reste à déterminer.

Des études pharmacologiques ont également clairement démontré l'implication de protéines kinases dans la transduction du signal ABA (table 3). Des approches biochimiques suggèrent que des protéines de type MAPK ("Mitogen-activated protein kinase") et CDPK ("Calcium-dependent protein kinase") pourraient participer à cette voie de signalisation mais aucun argument n'a pour l'instant permis de le démontrer formellement. En revanche, des études génétiques ont permis de mettre en évidence l'implication d'une SnRK3 ("Snf1-related kinase 3") dans la régulation de la transduction du signal ABA dans la cellule de garde chez *Arabidopsis thaliana* (Guo et al., 2002; Kim et al., 2003). Cette kinase, PKS3/CIPK3, se lie à une protéine de liaison du calcium de type calcineurine B (ScaBP5/CBL). Les mutants *pk3* et *scabp5* révèlent une hypersensibilité de la fermeture stomatique à l'ABA (Guo et al., 2002). Cette observation suggère un rôle de régulateur négatif du couple PKS3/ScaBP5 dans la transduction du signal ABA dans les cellules de garde. Enfin, les protéines de la famille SnRK2, qui sont l'objet de cette thèse, jouent un rôle essentiel dans la transduction du signal ABA dans les cellules de garde. Leur implication sera détaillée dans le paragraphe suivant.

L'ensemble de ces études souligne l'importance des événements de phosphorylation et déphosphorylation dans la voie de signalisation de l'ABA dans les cellules de garde et suggère l'implication de plusieurs protéines kinases et phosphatases de diverses familles en tant que régulateurs positifs ou négatifs de cette voie de signalisation. D'autre part, il révèle que de nombreux effecteurs de la voie de signalisation sont régulés directement ou indirectement par phosphorylation et déphosphorylation. C'est notamment le cas des canaux calciques, potassiques entrants et anioniques lents ou encore de la P-ATPase (Armstrong et al., 1995; Schmidt et al., 1995; Pei et al., 1997; Kohler and Blatt, 2002).

3. Le rôle majeur des SnRK2 VfAAPK et AtOST1

Une sérine/thréonine-kinase activée très rapidement et fortement par l'ABA indépendamment du calcium dans les cellules de garde de *Vicia faba* a été caractérisée (Li and Assmann, 1996). Cette protéine (AAPK pour "ABA-activated protein kinase") a été

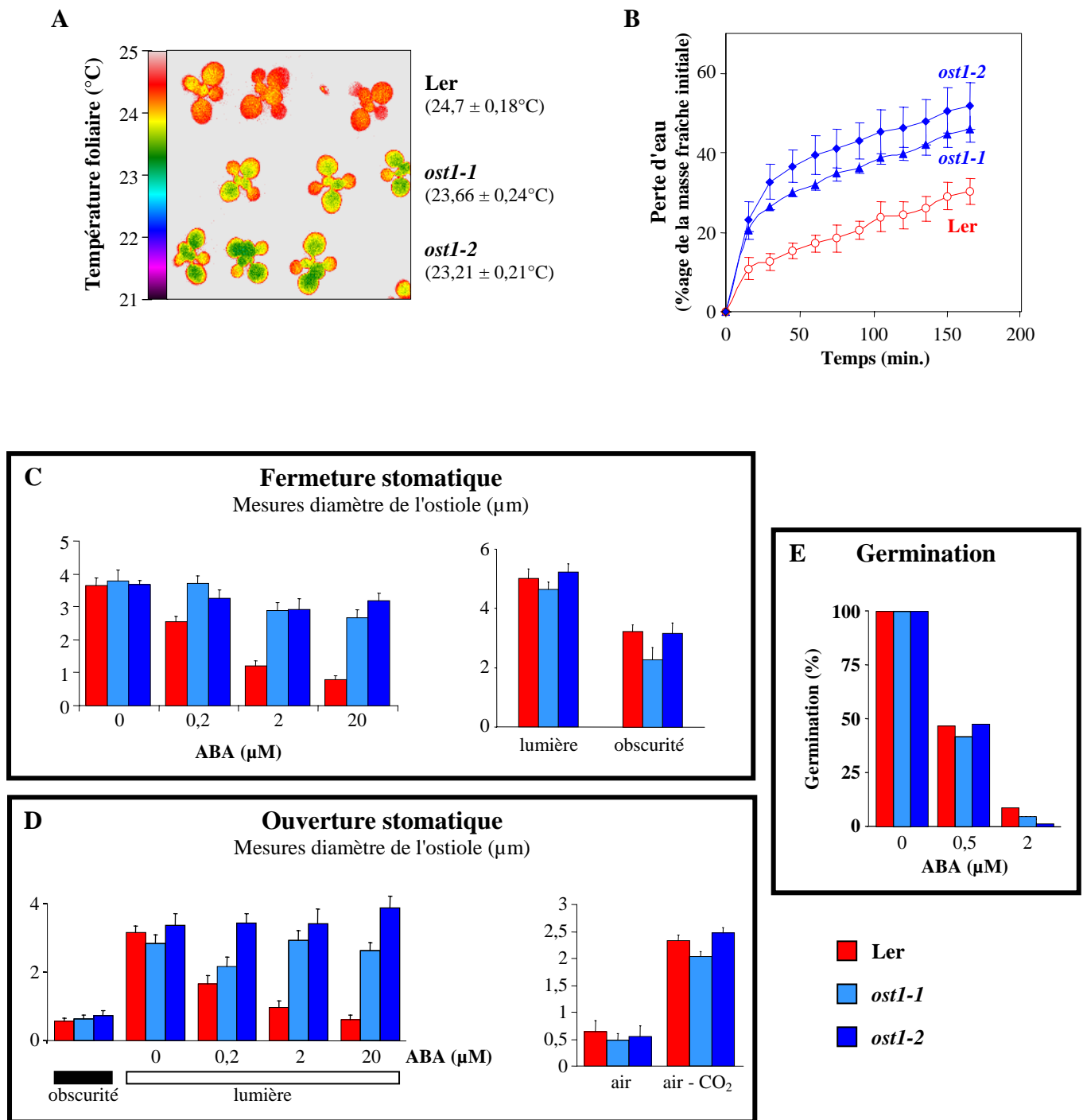


Figure 7 : Phénotypes des mutants *ost1-1* et *ost1-2*

A. Photo de thermographie infrarouge du sauvage (Ler) et des deux allèles mutants *ost1-1* et *ost1-2*. Echelle en fausses couleurs - droite : quantification de ces photos. **B.** Phénotype de perte d'eau au cours du temps de feuilles détachées du sauvage (Ler) et des deux mutants. **C.** Phénotype de fermeture stomatique en réponse à l'ABA (gauche) et à l'obscurité (droite). **D.** Phénotype d'ouverture stomatique en réponse à la lumière en absence ou en présence d'ABA (gauche) et à l'appauvrissement de l'air en CO_2 (droite). **E.** Phénotype de germination en réponse à l'ABA.

identifiée et clairement impliquée dans la fermeture des stomates en réponse à l'ABA via l'activation des canaux anioniques de la membrane plasmique (Li et al., 2000).

Chez *Arabidopsis*, les premiers mutants isolés à l'ISV à partir du crible basé sur la thermographie infrarouge présenté dans le paragraphe II.2.2, *ost1-1* et *ost1-2* (pour "*open stomata 1*"), sont deux allèles du même gène. Le gène *OST1* code une protéine kinase activée par l'ABA de la famille SnRK2, probable orthologue de la protéine AAPK (Mustilli et al., 2002). Ce gène est exprimé dans les tissus vasculaires et les cellules de garde de la plante. La mutation dans l'allèle *ost1-1* affecte un site d'épissage au niveau du 6^{ième} intron alors que l'allèle *ost1-2* aboutit à une substitution de la glycine 33 en arginine au niveau du site de fixation de l'ATP au sein de la kinase. Les deux allèles *ost1* sont fortement affectés dans la réponse des stomates à l'ABA mais ne sont affectés ni dans la réponse des stomates à d'autres facteurs (lumière, obscurité, CO₂), ni dans la réponse d'inhibition de la germination par l'ABA (figure 7). Nous remarquons également sur cette figure que l'allèle *ost1-2* présente des phénotypes d'insensibilité à l'ABA plus forts que l'allèle *ost1-1*.

Enfin, dans le même temps, le groupe de K. Shinozaki a isolé un mutant d'insertion ADN-T, *srk2e*, présentant, par rapport au sauvage, un fort phénotype de flétrissement en réponse à un stress hydrique (Yoshida et al., 2002). Ce mutant est affecté dans le même gène *OST1/SRK2E* que les mutants *ost1-1* et *ost1-2*. Ces travaux ont par ailleurs montré que *OST1/SRK2E* est également impliquée dans la régulation par l'ABA de l'expression génique puisque l'activation de *RD22* et *RD29B* par l'ABA est inhibée chez *srk2e*.

La production de H₂O₂ en réponse à l'ABA est affectée chez les mutants *ost1* (figure 8), ce qui indique que cette kinase agit en amont de H₂O₂ dans la transduction du signal ABA (Mustilli et al., 2002). Ceci suggère une activation très rapide de *OST1* en réponse à l'ABA puisque la production de H₂O₂ est elle-même une étape précoce de la voie de signalisation. D'autre part, la protéine *OST1* n'est plus activée en réponse à l'ABA chez le mutant *abil-1*, ce qui suggère une régulation de l'activité de *OST1* par la protéine *ABI1*. De plus, une étude récente montre que ces deux protéines sont susceptibles d'interagir physiquement (Yoshida et al., 2006).

L'identification par trois groupes, de manière indépendante, du même acteur de la transduction du signal ABA dans deux espèces suggère un rôle critique de cette protéine kinase. De plus, les mutants *ost1* sont les premiers mutants récessifs fortement et spécifiquement affectés dans la voie de signalisation qui nous intéresse. Enfin, *OST1* semble intervenir parmi les événements les plus précoces dans cette voie de signalisation. Tous ces arguments soulignent l'intérêt capital d'étudier la fonction et les mécanismes de régulation de

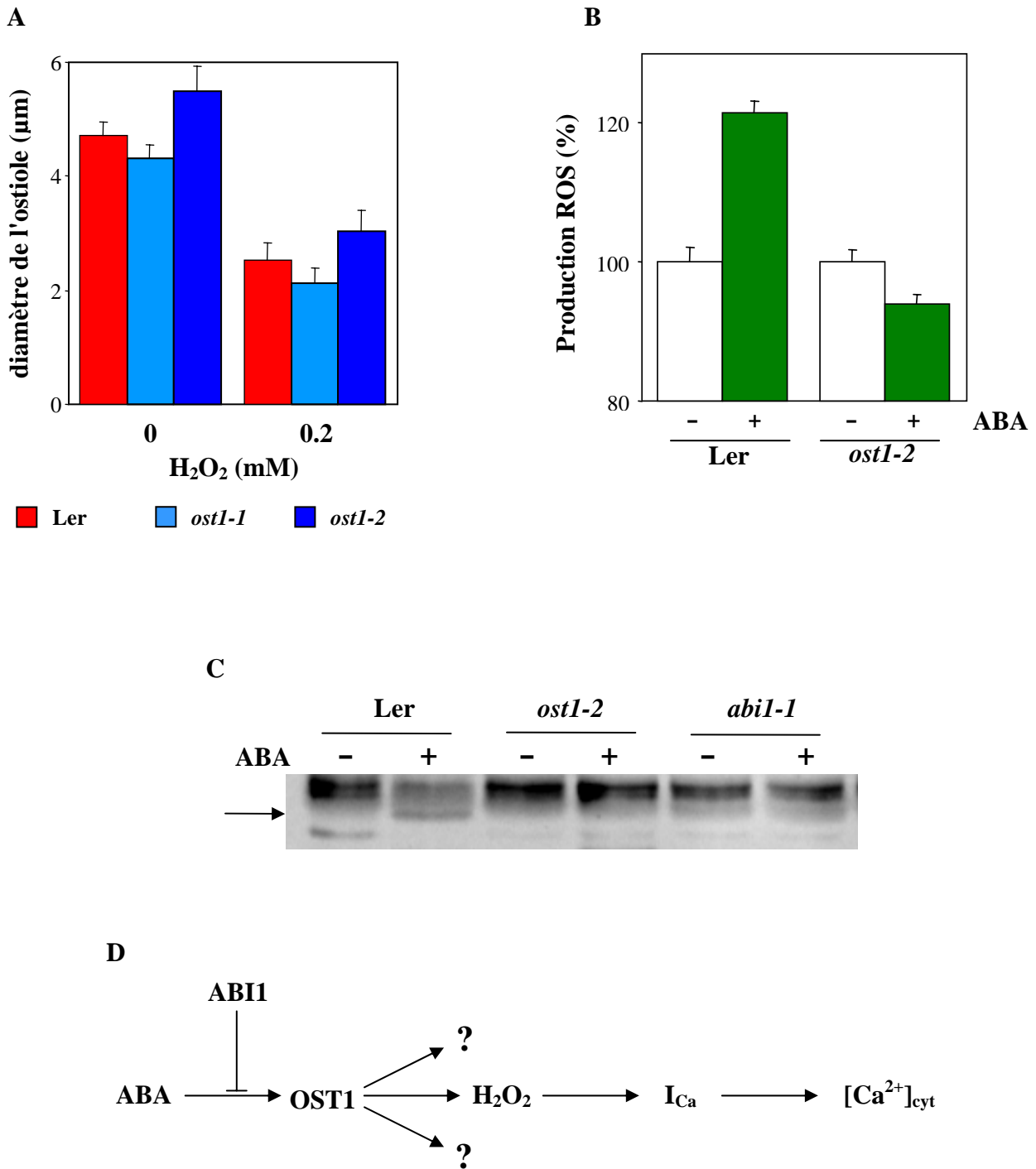


Figure 8 : OST1 dans la voie de signalisation de l'ABA

A. Fermeture des stomates en réponse à H₂O₂ chez le sauvage (Ler) et les deux mutants *ost1-1* et *ost1-2*. **B.** Production d'espèces activées de l'oxygène (ROS) en réponse à l'ABA dans le sauvage et le mutant *ost1-2*. **C.** Activité de OST1 en réponse à l'ABA chez le sauvage, le mutant *ost1-2* et le mutant *abi-1*. Activité kinase en gel sur histone; la flèche indique la bande de 42kDa correspondant à OST1. **D.** Modèle intégrant OST1 dans un des modules de la transduction du signal ABA.

cette protéine kinase dans le cadre de l'étude de la transduction du signal ABA dans les cellules de garde. C'est la raison pour laquelle j'ai choisi de focaliser mes travaux sur ces points au cours de ma thèse.

III. OST1 ET SNRK2 DANS L'UNIVERS DES KINASES

1. Quelques généralités sur les kinases

1. Deux mondes parallèles dans l'univers des kinases

La phosphorylation est une modification covalente post-traductionnelle de nombreuses protéines qui existe chez l'ensemble des êtres vivants. Repérés dès la fin du 19^{ème} siècle, les évènements de phosphorylation sont longtemps restés mal connus et leur importance structurale et fonctionnelle n'a été mise au jour pour la première fois qu'en 1956 grâce à des études métaboliques du muscle du lapin (Krebs and Fischer, 1956). Les acides aminés phosphorylés sont classés en trois principaux groupes (Cozzzone, 1988). Les *O*-Phosphates ou *O*-phosphomonoesters sont formés par phosphorylation d'acides aminés hydroxylés (sérine, thréonine et tyrosine). Les *N*-Phosphates ou phosphoramidates sont produits par phosphorylation d'acides aminés basiques (arginine, histidine et lysine). Enfin, les acyl-phosphates ou anhydrides de phosphate sont générés par phosphorylation d'acides aminés acides (aspartate, glutamate).

Les protéines kinases sont responsables de la formation de ces liaisons dans beaucoup de cas. Traditionnellement, ces protéines sont divisées en deux grands groupes : "kinases bactériennes" et "kinases eucaryotes". Les "kinases bactériennes" correspondent aux histidine-kinases (HPK pour "histidine protein kinases") qui constituent le point de départ d'unités de transduction de signaux appelées "systèmes à deux composantes" (Wolanin et al., 2002). Ces systèmes initient la transduction du signal en s'autophosphorylant sur une histidine, puis le groupement phosphate est transmis à un aspartate du domaine régulateur de la réponse présent sur la même protéine ou sur une protéine partenaire. L'autre grand groupe correspond aux ePK ("eucaryotic protein kinases") qui regroupe la plupart des sérine/thréonine kinases et des tyrosine kinases (Hanks and Hunter, 1995).

Toutefois, on retrouve les deux grandes classes de protéines kinases chez la plupart des êtres vivants, procaryotes et eucaryotes. De plus, quelques kinases ne rentrent pas dans ces groupes et sont nommées "protéines kinases atypiques" (aPK).

2. Les kinases chez les végétaux

Les premières séquences d'ADN codant des protéines kinases végétales ont été isolées en 1989 chez le haricot et le riz (Lawton et al., 1989). Depuis, les travaux reportant la découverte de séquences de nouvelles protéines kinases ont vu leur nombre rapidement augmenter (Hardie, 1999). Le séquençage du génome d'*Arabidopsis thaliana* a finalement permis de se rendre compte de l'importance de cette classe de protéines chez les végétaux. En effet, la première annotation du génome prédisait que 916 gènes sur 25498 codaient des "protéines kinases eucaryotes", soit 3,66% (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Ce pourcentage est légèrement supérieur à ceux retrouvés pour un bon nombre d'animaux, pour lesquels il est généralement compris entre 1,5 et 2,5%. La superfamille des "protéines kinases eucaryotes" fait donc partie des familles les plus représentées dans le génome d'une plante. Comme cela a été fait chez différentes espèces animales (<http://www.kinase.com>), des travaux sont en cours pour réaliser une classification et une annotation complète de toutes les protéines kinases végétales connues. Ces travaux sont regroupés au sein d'une base de données publique disponible sur le site internet "PlantsP : Functional Genomics of Plant Phosphorylation" (http://www.sdsc.edu/mpr/plant_pk/).

A l'heure actuelle, 989 protéines kinases d'*Arabidopsis* sont répertoriées dans cette base de données et sont regroupées en 4 grandes classes, plus une classe regroupant les protéines inclassables. La première grande classe de kinases regroupe 610 protéines qui présentent un domaine transmembranaire et un domaine C-terminal cytosolique. Il s'agit de la famille des RLK (pour "receptor-like kinases") qui regroupe elle-même 44 sous-familles (Shiu and Bleecker, 2001). Elles sont proches de la grande famille animale des récepteur-kinases mais s'en distinguent par leur fonction sérine/thréonine kinase alors que la plupart des récepteur-kinases chez les animaux possèdent une activité tyrosine kinase. Elles présentent des domaines extracellulaires de types très divers (domaine "leucine-rich repeat", domaine "proline-rich", domaine lectine, domaine LysM, etc.) et certaines sont même dépourvues de ce domaine extracellulaire. Les fonctions d'une grande majorité de ces kinases restent inconnues mais certaines RLK assurent des fonctions majeures dans les plantes (Shiu and Bleecker, 2001). Ainsi, elles sont impliquées dans le maintien des méristèmes (CLAVATA1) et le développement des organes (ERECTA), dans la formation de nodules (NORK), dans la réponse aux brassinostéroïdes (BRI1), dans la réponse aux pathogènes (Pto, WAK) ou encore dans les mécanismes d'autoincompatibilité sporophytique (SRK). La classe 2 regroupe des kinases assez hétérogènes et peu nombreuses. La classe 3 regroupe des caséine kinases de type I qui partagent la particularité de pouvoir phosphoryler la caséine. Enfin, la classe 4

Table 4. Principales caractéristiques structurales du domaine catalytique des kinases

Sous domaine	Motif / Résidu	Fonction
I	G-x-G-x-x-G très conservé 2 feuillets β antiparallèles	Site de fixation de l'ATP (phosphates α et β) 7 aa avant 1° Gly : début du domaine catalytique
II	K invariable	Essentielle pour l'activité de la kinase Orientation de la molécule d'ATP
III	E extrêmement conservé dans hélice α importante	Stabilisation de l'ATP
V		Connexion petit et grand lobes du domaine catalytique Stabilisation ATP et reconnaissance du substrat
VIb	H-R-D-L-K-x-x-N (K \Rightarrow R pour Y kinases)	Boucle catalytique D : Accepteur du proton du groupe hydroxyle du substrat K : Aide transfert du phosphate : neutralise la charge négative
VII	D-F-G très conservé	D chélate l'ion divalent associé aux phosphates α et β de l'ATP
VIII	A-P-E très conservé	Stabilité du grand lobe Reconnaissance du peptide substrat E : liaison avec R domaine XI (stabilité lobe)
IX	Grande hélice α	Stabilité de la boucle catalytique
XI	R très conservée	Stabilité des hélices α de la structure Fin du domaine catalytique mal définie

Table 5. Motifs caractéristiques des différents types de protéines kinases "eucaryotes"

Protéine kinase	VIb	VIII	XI
S/T kinase	D-L-K-x-x-N	G-T/S-x-x-Y/F-x-A-P-E	x-x-(x) ₆ -R-x-x-x
Y kinase	D-L-R-A-A-N D-L-A-A-R-N	x-P-I/V-K/R-W-T/M-A-P-E	C-W-(x) ₆ -R-P-x-F
S/T/Y kinase	D-L-K-S-D-N	G-T-Y-R-W-M-A-P-E	C-W-(x) ₆ -R-P-x-F

regroupe notamment les grandes familles de kinases non transmembranaires (http://www.sdsc.edu/mpr/plant_pk/). Parmi ces kinases, nous retrouvons les familles participant aux cascades MAP (Mitogen associated protein) kinases (20 MAPK, 10 MAP2K, 80 MAP3K et 10 MAP4K), les kinases dépendantes du calcium (34 CPK pour calcium dependent protein kinases), les GSK/Shaggy (10 Glycogen synthase kinases), les SnRK (Snf1-related kinases), les CDK (12 cyclin dependent kinases) ou encore les PCK (2 phosphoenolpyruvate carboxylase kinases).

Le génome des plantes code également des "kinases bactériennes" appartenant à des systèmes à deux composantes. Chez *Arabidopsis*, leur nombre (16 + 6 protéines associées) est faible comparé aux "kinases eucaryotes", mais elles assurent des fonctions de signalisation importantes puisqu'il s'agit des phytochromes, et de récepteurs à l'éthylène et aux cytokinines.

3. *Structure du domaine catalytique des ePKs et boucle d'activation*

Cette superfamille est définie par un domaine catalytique commun de 250 à 300 acides aminés qui permet de déterminer la phylogénie des kinases (Hanks et al., 1988). Il présente douze motifs caractéristiques (I, II, III, IV, V, VIa, VIb, VII, VIII, IX, X, XI) entrecoupés de séquences moins conservées, et une structure secondaire bien définie (Hanks and Hunter, 1995). Ce domaine catalytique est impliqué dans la liaison et l'orientation d'une molécule d'ATP (ou GTP) associée à un ion divalent (Mg^{2+} ou Mn^{2+}), dans la liaison d'un peptide substrat spécifique et dans le transfert du phosphate γ de l'ATP sur le groupement hydroxyle de l'acide aminé cible (S, T ou Y). Les caractéristiques et fonctions principales des sous domaines, définies à partir de la protéine kinase modèle de souris PKA-C α (sous domaine catalytique de l'"AMP-dependent protein kinase"), sont résumés dans la table 4.

Les sous domaines VI et VIII sont déterminants pour discriminer les tyrosine kinases des sérine/thréonine kinases. Certaines protéines kinases sont néanmoins capables de phosphoryler des sérines, des thréonines et des tyrosines. Ces kinases appartiennent à la famille des STY kinases. Elles sont représentées par 57 membres dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* et sont encore peu caractérisées (Rudrabhatla et al., 2006). Les motifs consensus permettant de discriminer ces différents types de "kinases eucaryotes" sont répertoriés dans la table 5.

Entre les triplets D-F-G et A-P-E des sous-domaines VII et VIII se trouve une boucle très importante pour l'activité de la protéine. La phosphorylation d'un résidu de cette boucle au sein du sous-domaine VIII est très souvent indispensable pour cette activité (Hanks and Hunter, 1995). Cette boucle est appelée "boucle d'activation" ou "T-loop". Deux modèles sont

proposés, selon les protéines, pour l'activation de la kinase par phosphorylation de cette boucle (Adams, 2003). Selon le premier modèle, la boucle non phosphorylée bloquerait l'accès du substrat et la phosphorylation entraînerait un changement de conformation de la boucle qui rendrait le site actif accessible au substrat et qui induirait l'activité du transfert de phosphate de 2 à 4 fois. Dans d'autres protéines, au contraire, le substrat aurait toujours accès au site actif et le changement d'état de phosphorylation n'aurait pour conséquence qu'une augmentation de l'activité catalytique.

2. OST1 et les SnRK2

1. Présentation générale des CDPK et SnRK

Parmi les "kinases eucaryotes" végétales non transmembranaires, un ensemble de sept familles forme un groupe phylogénétique séparé des autres kinases (Hrabak et al., 2003).

Parmi ces sept familles, celle des kinases de type CaMK ("calmodulin-dependent kinase") ne possède aucun membre connu chez les plantes alors qu'elles sont très répandues chez les animaux où elles jouent un rôle important dans beaucoup de réponses au calcium. D'autre part, quelques CCaMK ("calcium and calmodulin dependent kinases") ont été isolées chez le tabac et chez le lis et une a récemment été identifiée dans le génome du riz. Cependant, cette famille ne semble pas représentée dans le génome d'Arabidopsis. Les kinases impliquées dans le relais du signal calcique chez les végétaux sont essentiellement les SnRK3 que nous aborderons dans le paragraphe suivant et les membres de la famille CDPK ou CPK ("calcium-dependent protein kinases"). Les CDPK (34 chez Arabidopsis) possèdent un domaine régulateur à domaines EF capable de lier directement le calcium, indépendamment de la calmoduline (Cheng et al., 2002). Enfin, les kinases de la famille des CRK ("CDPK related kinases"), représentées par 8 membres chez Arabidopsis, possèdent des sites non fonctionnels de fixation du calcium, et ne semblent pas régulées par le calcium malgré leur homologie avec les CDPK.

La famille des PPCK ("Phosphoenolpyruvate carboxylase kinases") a été définie comme l'ensemble des protéines indépendantes du calcium capables de phosphoryler la PEPC. Leur fonction a été définie dans le cadre des métabolismes de type C4 ou CAM où elles modulent l'activité PEPC suivant un rythme circadien. Deux membres sont néanmoins présents dans le génome d'Arabidopsis où leur fonction reste inconnue. Deux kinases de type PEPRK ("PEPC kinase related kinases"), homologues des PPCK mais apparemment dépourvues de tout domaine régulateur, sont également présentes chez Arabidopsis.

Table 6. Liste des SnRK2 identifiées et publiées

Espèce	Kinase(s)	Identification	Références
Blé	TaPKABA1	Banque ADNc embryons Transcrit induit par l'ABA	Anderberg and Walker-Simmons, 1992
Blé	TaPK3	Banque génomique plantules Pas d'induction des transcrits par le froid, la sécheresse ou l'ABA	Holappa and Walker-Simmons, 1997
Orge	HvPKABA1	Cellules à aleurone Participe à la répression par l'ABA de la voie des GAs lors de la germination	Gomez-Cadenas et al., 1999
<i>T. tauschii</i> (blé diploïde)	PK1	Banque ADNc plantules	Holappa et al., 2005
Soja	SPK1, SPK2, SPK3, SPK4	Banque ADNc plantules de 4 jours <i>SPK3</i> et <i>SPK4</i> induits par NaCl et sécheresse <i>SPK3</i> induit par ABA	Yoon et al., 1997
Fève	AAPK	Activité kinase fortement activée par l'ABA dans les cellules de garde	Li and Assmann, 1996
Arabidopsis	ASK1, ASK2	Banque ADNc fleurs & feuilles	Park et al., 1993
Riz	REK	Banque ADNc graines	Hotta et al., 1998
Tabac	NtOSAK	Kinase iduite par stress osmotique Purification et microséquençage	Mikolajczyk et al., 2000
Ficoïde glaciale (<i>M. crystallinum</i>)	Mcpk9	Banque ADNc de feuilles	Baur et al., 1994
Chlamydomonas	Sac3	Crible de mutants présentant une activité arylsulfatase constitutive	Davies et al., 1999

Enfin, un dernier groupe de protéines apparentées à la kinase Snf1 ("Sucrose non-fermenting 1") de levure, les SnRK, complète cette superfamille. Il est subdivisé en trois sous-familles (SnRK1, SnRK2, SnRK3) au sein desquelles sont regroupées 38 kinases chez Arabidopsis. Cette famille nous intéresse particulièrement puisqu'OST1 en est un des membres et j'y consacrerai donc les paragraphes suivants.

La superfamille des CDPK/SnRK est donc représentée chez Arabidopsis par 84 membres qui ont un domaine catalytique relativement proche. Il faut noter que les CRK, les PPCK, les PEPRK, les SnRK2 et les SnRK3 sont strictement spécifiques du règne végétal alors que les CDPK ne sont présents que chez les végétaux et un sous-groupe spécifique de protistes (Hrabak et al., 2003).

2. La famille SnRK

Trois sous-familles

La sous-famille SnRK1 est la plus proche de la kinase Snf1 de levure mais aussi des protéines AMPK ("AMP-activated protein kinases") des animaux. Les SnRK1, comme Snf1 et les AMPK animales, sont impliquées dans la régulation du métabolisme carboné en réponse à des stress nutritionnels ou environnementaux (Halford et al., 2003). Elles codent les sous-unités catalytiques de complexes hétérotrimériques et trois membres sont présents chez Arabidopsis. Les SnRK2 et SnRK3 présentent des domaines catalytiques fortement homologues aux SnRK1 mais des extensions carboxy-terminales plus petites et très différentes.

Les SnRK3 (25 PKS/CIPK chez Arabidopsis) ont la particularité d'être régulés par l'interaction avec les membres d'une famille de protéines de liaison du calcium, nommées ScaBP ou CBL (Kolukisaoglu et al., 2004). Les quelques SnRK3 caractérisées fonctionnellement ont été impliquées dans les voies de signalisation et de réponse aux stress abiotiques, comme la protéine SOS2 ("Salt oversensitive 2"), qui interagit avec SOS3 et active l'échangeur sodium/protons SOS1 dans la voie de signalisation des stress salins (Liu et al., 2000), ou PKS3, impliquée dans la transduction du signal ABA via son interaction avec ScaBP5 (Guo et al., 2002).

Enfin, les SnRK2 se distinguent par la présence d'un domaine C-terminal très riche en résidus acides, de fonction inconnue. Nous détaillerons les connaissances actuelles sur cette sous-famille à laquelle appartient OST1 dans le paragraphe suivant.

Table 7. *Correspondance entre les différentes nomenclatures des SnRK2 chez Arabidopsis*

<u>OSKL</u>	<u>SRK2</u>	<u>SnRK2</u>	<u>Code AGI</u>	<u>Autres noms</u>
OST 1	SRK2 E	SnRK2- 6	At4g33950	
OSKL 2	SRK2 I	SnRK2- 3	At5g66880	ATHPROKINB 41K
OSKL 3	SRK2 D	SnRK2- 2	At3g50500	ATHPROKINA SPK2
OSKL 4	SRK2 C	SnRK2- 8	At1g78290	
OSKL 5	SRK2 F	SnRK2- 7	At4g40010	
OSKL 6	SRK2 B	SnRK2- 10	At1g60940	
OSKL 7	SRK2 A	SnRK2- 4	At1g10940	ASK1
OSKL 8	SRK2 G	SnRK2- 1	At5g08590	ASK2
OSKL 9	SRK2 H	SnRK2- 5	At5g63650	
OSKL 10	SRK2 J	SnRK2- 9	At2g23030	

Mécanismes de régulation

Contrairement à leurs homologues AMPK chez les animaux, les SnRK ne sont pas directement régulées par l'AMP. Les protéines SnRK1 sont régulées par des sous-unités spécifiques dans le cadre de complexes hétérotrimériques. Les SnRK3 possèdent un domaine C-terminal auto-inhibiteur et sont activées via l'interaction du motif FISL de ce domaine avec les protéines de liaison au calcium (Guo et al., 2001). Cependant, rien n'est encore établi concernant la régulation des SnRK2. En effet, l'extension C-terminale correspond très probablement à un domaine régulateur auquel peut se fixer ABI1 (Yoshida et al., 2006) mais son action précise sur l'activité de la kinase reste à déterminer.

D'autre part l'une des spécificités des SnRK au sein de la superfamille des CDPK/SnRK est la présence d'une thréonine au sein de la boucle d'activation, dans le sous-domaine VIII (Hrabak et al., 2003). La mutation de cette thréonine en aspartate, supposé mimer une phosphorylation constitutive, dans la protéine SOS2 aboutit à une kinase constitutivement active (Guo et al., 2001). La même mutation a le même effet chez plusieurs membres de la famille SnRK3 (Gong et al., 2002; Gong et al., 2002). D'autre part, chez les animaux, la protéine AMPK est également activée par phosphorylation par une AMPK kinase. Cette phosphorylation touche principalement la thréonine de la boucle d'activation (Hardie et al., 1998). Enfin, des travaux ont montré la régulation d'une SnRK1 d'épinard par des mécanismes de phosphorylation et déphosphorylation d'une thréonine de la boucle d'activation (Sugden et al., 1999). En revanche, rien n'était connu en ce qui concerne l'activation des SnRK2 au début de ce travail.

La régulation des protéines kinases de type SnRK semble donc faire intervenir à la fois des mécanismes de phosphorylation, notamment dans la boucle d'activation, et l'interaction avec des partenaires spécifiques.

3. Les SnRK2

Les SnRK2 ont été caractérisées pour la première fois par l'isolement d'un ADNc à partir d'embryons de blé. Cet ADNc a été nommé *PKABA1* puisque le transcrit correspondant est induit en réponse à l'ABA (Anderberg and Walker-Simmons, 1992). Des études complémentaires ont montré que l'expression de ce gène est également induite par la sécheresse, le froid et les stress osmotiques (Holappa and Walker-Simmons, 1995). Enfin, son orthologue chez l'orge a été cloné et impliqué dans la régulation de la germination par l'ABA, via l'inhibition de la voie de signalisation des gibbérellines dans les cellules à aleurone (Gomez-Cadenas et al., 1999; Gomez-Cadenas et al., 2001). Plusieurs autres SnRK2 ont été

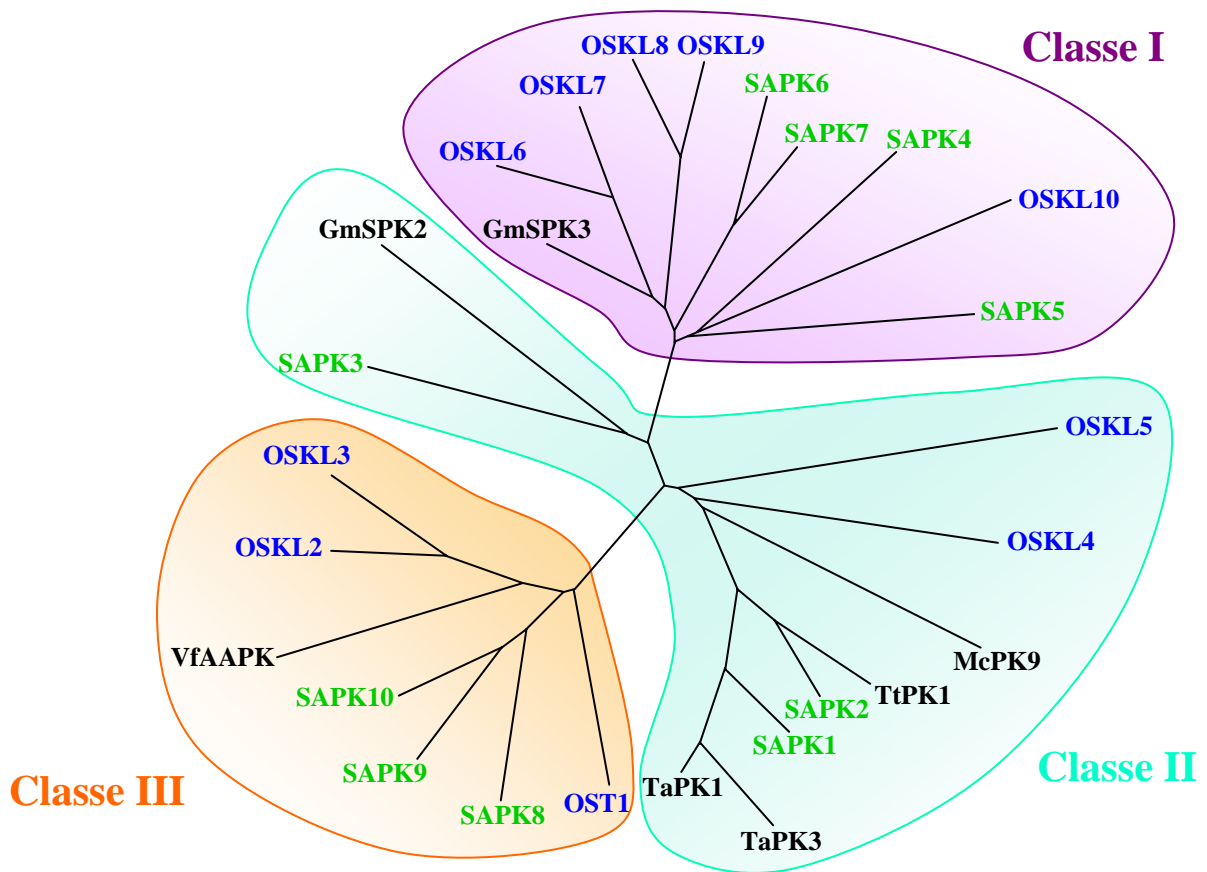


Figure 9 : Arbre phylogénétique des SnRK2

Cet arbre représente les 10 SnRK2 d'Arabidopsis (OST1 et OSKL en bleu) et du riz (SAPK en vert) ainsi que quelques autres SnRK2. TaPK1 = TaPKABA1.

caractérisées dans de nombreuses espèces et sont regroupées dans la table 6. Parmi ces protéines, VfAAPK et OST1 sont impliquées dans la voie de signalisation de l'ABA dans les cellules de garde comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent.

Le séquençage et l'annotation des génomes d'Arabidopsis et du riz ont permis de mieux définir les sous-familles SnRK2 dans ces deux espèces (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Sequencing Project International Rice Genome, 2005). Elles contiennent 10 membres chacune et peuvent être subdivisées en trois classes d'après l'analyse des séquences du riz et d'Arabidopsis (figure 9). Trois nomenclatures existent pour la famille SnRK2 d'Arabidopsis et sont détaillées dans la table 7. J'ai choisi de garder dans cette thèse la nomenclature OSKL (OST1 kinase-like) qui présente l'avantage par rapport aux autres de suivre un ordre logique basé sur l'homologie des séquences, les chiffres croissants représentant des séquences de moins en moins proches de OST1. Des études sur l'ensemble des membres de la famille exprimés en protoplastes dans chacune des deux espèces ont montré que toutes (exceptée OSKL10) sont activées par un stress osmotique. En revanche, seules les kinases de classe III sont fortement activées par l'ABA (Boudsocq et al., 2004; Kobayashi et al., 2004). Ce sont les kinases OST1, OSKL2 et OSKL3 d'Arabidopsis et SAPK8, SAPK9 et SAPK10 du riz (figure 9).

Plusieurs substrats des SnRK2 ont été identifiés chez diverses espèces. La plupart de ces substrats aujourd'hui connus sont des facteurs de transcription de type bZIP. Ainsi une première étude a montré la phosphorylation d'une protéine de type ABF/AREB spécifique des graines par TaPKABA1 chez le blé (Johnson et al., 2002). De même, des études récentes suggèrent fortement que des ABF/AREB de riz et d'Arabidopsis, respectivement TRAB1 et AREB1, sont phosphorylés par des SnRK2 en réponse à l'ABA (Kobayashi et al., 2005; Furihata et al., 2006). D'autre part, des travaux sur VfAAPK ont montré que cette SnRK2 est capable de phosphoryler AKIP1 ("AAPK interacting protein"), une protéine de liaison à l'ARN qui interagit elle-même avec l'ARNm de déhydrines induites par l'ABA (Li et al., 2002). L'ensemble de ces travaux a donc permis de caractériser certains substrats de SnRK2 liés plus particulièrement à l'implication de ces kinases dans la régulation de l'expression génétique en réponse à l'ABA. Enfin, une étude a montré la phosphorylation d'une PITP ("Phosphatidylinositol transfer protein") par des SnRK2 en réponse à un stress hyperosmotique chez le soja (Monks et al., 2001). Les PITP ont été initialement décrites comme des transporteurs diffusibles de phosphatidyl inositol et de phosphatidyl-choline et la PITP de levure est une protéine essentielle, impliquée dans la formation de vésicules de sécrétion à partir du complexe golgien. Dans l'étude citée auparavant, les résultats montrent

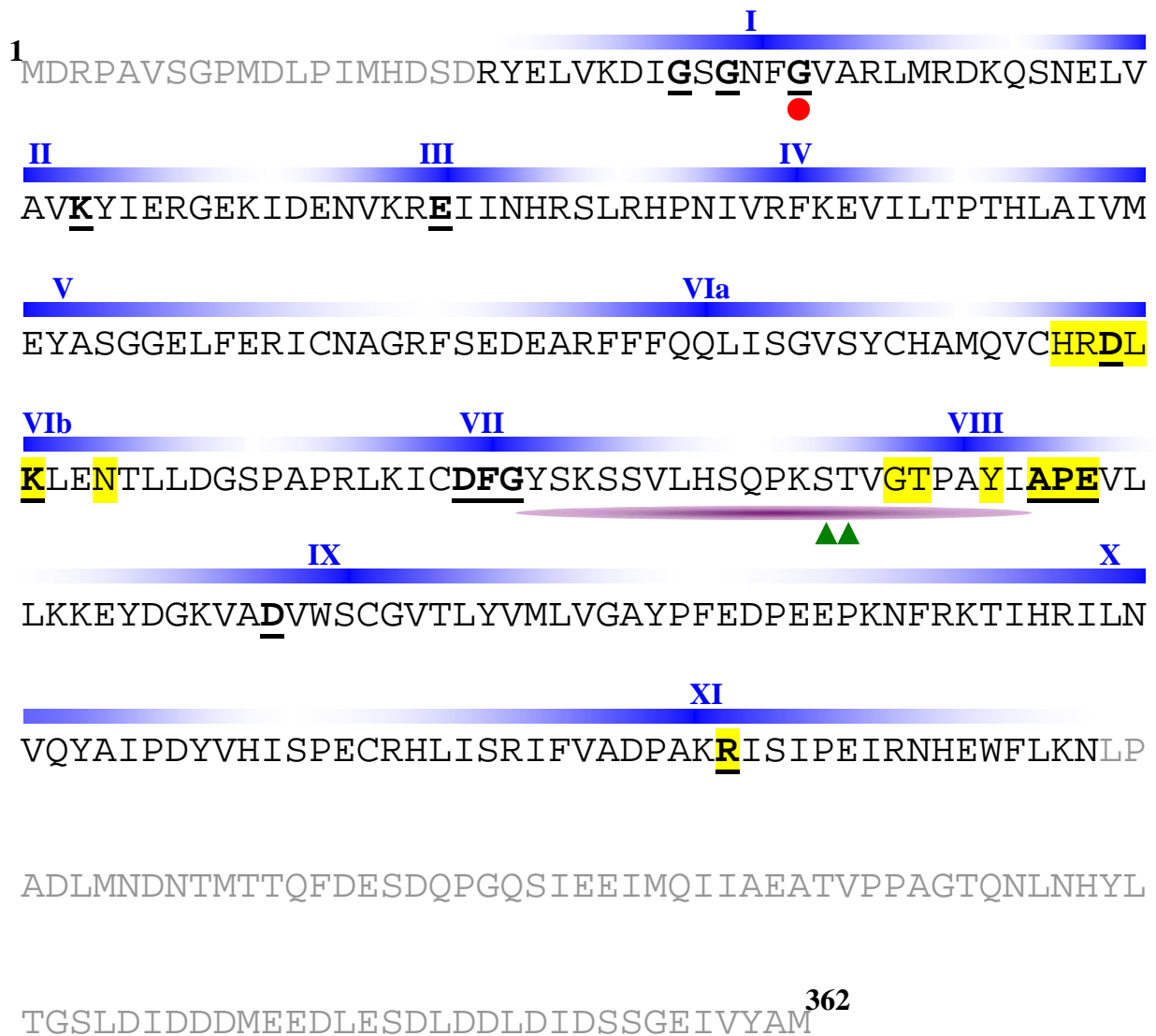


Figure 10 : Séquence et structure de la protéine OST1

Le domaine catalytique est indiqué en lettres noires et les extensions N- et C-terminales en gris. Les 12 sous-domaines caractéristiques sont indiqués en bleu et numérotés de I à XI. Les résidus surlignés en jaune sont ceux qui caractérisent les sérine/thréonine kinases et les résidus soulignés et en gras sont les résidus invariables ou extrêmement conservés du domaine catalytique, répertoriés dans la table 4. La boucle d'activation entre les sous domaines VII et VIII est soulignée en violet. Les résidus S175 et T176 de cette boucle sont indiqués par des triangles verts. Enfin, la glycine en position 33, mutée en arginine dans le mutant *ost1-2*, est indiquée par un rond rouge.

que la phosphorylation de Ssh1p, une P1TP de soja, active les PI3K et PI4K *in vitro*. Ces résultats relient les SnRK2 avec un des modules de la voie de signalisation de l'ABA présentés figure 6, en amont de la production de H₂O₂, ce qui coïncide avec la place attribuée à OST1 dans cette voie (figure 8). Cependant, aucune cible de SnRK2 clairement impliquée dans la transduction du signal ABA dans la cellule de garde n'a encore été identifiée.

4. La protéine OST1

La kinase OST1 est activée par l'ABA et les stress osmotiques et appartient à la classe III des SnRK2. C'est une protéine de 362 acides aminés contenant un domaine catalytique propre aux sérine/thréonine kinases précédé d'un petit domaine amino-terminal de 19 résidus et possédant un domaine carboxy-terminal très acide de 82 acides aminés (figure 10). Cette protéine possède en positions 175 et 176 respectivement une sérine et une thréonine. La position 175 correspond aux positions des thréonines phosphorylées dans les boucles d'activation des SnRK1 et SnRK3. D'autre part, la fonction du domaine C-terminal était totalement inconnue au début de ma thèse. Ces différents motifs sont susceptibles de jouer un rôle important dans la régulation de la protéine OST1 au sein de la voie de signalisation de l'ABA dans les cellules de garde. La compréhension des mécanismes de régulation des SnRK2 et plus particulièrement de la protéine OST1 serait donc d'un intérêt crucial dans l'étude de cette voie de signalisation.

OBJECTIFS

ET PRESENTATION GENERALE

Lors de mon arrivée au laboratoire, OST1 venait d'être identifiée comme un régulateur majeur de la fermeture des stomates. De nombreuses problématiques ont émergé suite à cette découverte et j'ai envisagé plusieurs axes de travail possibles dans le cadre de ma thèse afin de répondre à l'une ou l'autre de ces problématiques et d'approfondir nos connaissances sur la fonction de OST1 dans la plante.

En premier lieu, aucun des autres membres de la famille SnRK2 chez *Arabidopsis* n'avait de fonction déterminée. Il me semblait donc intéressant de rechercher d'autres membres éventuellement redondants avec OST1 dans la fermeture stomatique en réponse à l'ABA ou impliqués dans d'autres mécanismes affectés par l'ABA. La séquence de OST1 étant particulièrement proche de celles de OSK1 et OSK2, nous envisagions notamment d'étudier plus précisément ces deux membres. L'étude de l'expression des dix gènes, la recherche de mutants dans chacun d'eux et l'analyse de leurs phénotypes, nous auraient permis de mieux comprendre les fonctions de cette famille de protéines kinases et leurs éventuelles redondances dans les voies de signalisation de l'ABA.

Une deuxième possibilité était d'analyser en détails la place de OST1 au sein de la voie de transduction du signal ABA dans la cellule de garde. Dans ce cadre, nous aurions pu étudier le comportement des seconds messagers décrits en réponse à l'ABA et analyser l'activité des différents effecteurs de cette réponse chez le mutant *ost1*. Nous aurions également pu analyser les relations entre OST1 et d'autres protéines de la voie de transduction de l'ABA en étudiant les doubles mutants entre *ost1* et les autres mutants de la voie de signalisation et en analysant l'activité de OST1 en réponse à l'ABA dans divers mutants. Il aurait notamment été pertinent d'étudier l'interaction *in planta* entre la PP2C ABI1 et la protéine OST1 puisque les travaux préliminaires avaient montré que l'activité de OST1 en réponse à l'ABA est affectée dans le mutant *abi1-1*. Finalement, des approches sans a priori étaient envisagées à partir de cribles double-hybrides et d'expériences de co-immunoprécipitation.

Cependant, il m'a semblé qu'avant d'étudier les fonctions d'autres SnRK2 dans les réponses à l'ABA dans les plantes, avant d'analyser la place exacte de OST1 dans la transduction du signal ABA dans les cellules de garde et même avant de rechercher les partenaires de la protéine OST1, il était primordial de connaître le fonctionnement et les mécanismes d'activation de cette protéine kinase elle-même. Comme je l'ai déjà mentionné à la fin de l'introduction, contrairement aux kinases des familles SnRK1 et SnRK3, ces mécanismes de régulation des protéines SnRK2 étaient totalement inconnus à mon arrivée au laboratoire. Dans le but de mieux comprendre les mécanismes qui régissent la fonction de

ALOST1 ----LPADLMNNTMTTQFDESQ----PQSSSEEMGIIAATVPAQTQNLN--HYLT
 ALOSKL2 ----LPADLMNENTGSGQFQEPQ----PMSLDTMGIISEATFVNRKLD--DFWT
 ALOSKL3 ----LPQDLNENRWSGQFQEPQ----PMSLDTMGIISEATFVNRKLD--DFWA
 ALOSKL4 ----LPVEMY----EGSLMNGPS----TQVVEIVWIIIEARKKIVATGLAGAGSSG
 ALOSKL5 PLVVPFEEKCNGVEEVEEVEEK----CQSVVEIVWIIIEARKKIVGTDNNGGLGLID
 ALOSKL6 ----LPRELT--EIAQAAVFREKNP--TPSLQSVVEIVWIIIEARKKIVSRISIGAPGWGG
 ALOSKL7 ----LPTQAVFREKNP--TPSLQSVVEIVWIIIEARKKIVSRISIGAPGWGG
 ALOSKL8 ----LPRELK--EPAQATYYQRVNLINPSPQVVEEIMKIVGEARTFNLKSRFVESLGS
 ALOSKL10

Identification d'éléments

ALOST1 GS-----**structuraux**-----
 ALOSKL2 EN-----
 ALOSKL3 EN-----
 ALOSKL4 GS-----
 ALOSKL5 GS-----IDLEDDIDADIYD--VDDEE--RNSDFYCAL-----
 ALOSKL6 GEEDEEKEE--DASEVEVEVEEEDDEYD--KTVKQVIAQMEVEVVS
 ALOSKL7 NQDADGKEEDAEVVEEVEEVEEEDDEYD--KTVKQVHAS--GEVRIS
 ALOSKL8 D-----EE--EEEDVEAEVEEEDDEYD--KHVKAQSCQSDKA--
 ALOSKL9 EVDVEDEVEE--EEEEEEEEEEEEDEYD--KHVKAHSCQSPFKA--
 ALOSKL10 -----DREDEEVEYLDANDEWYD--DVA-----

Purification d'une protéine recombinante active
 (Chapitre II)

Compréhension des phénotypes mutants
Tests de complémentation
 (Chapitre III)

Activité kinase de la protéine OST1 purifiée

Fonction de la protéine OST1 dans les cellules de garde

Régulation par les PP2C ?
 (Chapitre IV)

Régulation de la quantité de OST1 ?
 (Chapitre IV)

Rôle des autres SnRK2 ?
 (Chapitre V)

Importance et fonction des éléments structuraux identifiés

Figure 11 : Stratégie adoptée et plan de la thèse

Ce schéma représente la stratégie adoptée pour l'identification d'éléments structuraux importants pour la fonction de OST1 (flèches). L'ensemble de ces résultats est présenté dans le manuscrit de l'article, dans le premier chapitre de cette thèse. Cette stratégie a nécessité la levée de deux verrous importants et les études correspondantes sont détaillées dans les chapitres II et III. Enfin, les chapitres IV et V visent à une meilleure compréhension de la fonction de OST1 dans la cellule de garde par l'analyse de mécanismes de régulation ou de redondance entre les SnRK2.

OST1 dans la voie de signalisation de l'ABA dans les cellules de garde, j'ai donc décidé de focaliser mon travail de thèse sur les relations entre la structure de la protéine OST1, son activité et son rôle dans la réponse des stomates à l'ABA.

Un ensemble d'approches moléculaires, biochimiques et physiologiques m'ont permis de caractériser des motifs essentiels à l'activité kinase de OST1 ou à sa fonction dans la voie de signalisation de l'ABA dans la cellule de garde d'*Arabidopsis thaliana*. Ces travaux ont donc permis de caractériser plusieurs types de mécanismes de régulation de la protéine OST1, ce qui était l'objectif premier de ma thèse, défini dans le paragraphe précédent. Ils constituent l'épine dorsale de cette thèse et font l'objet d'une publication en cours de révision dans le journal "*Plant Physiology*". J'ai choisi de vous les présenter sous forme de manuscrit correspondant qui constitue le premier chapitre de cette thèse (figure 11).

Ces études ont nécessité un va-et-vient continu entre l'analyse de la protéine OST1 recombinante purifiée et sa fonction intégrée dans la plante. L'obtention et la caractérisation de protéines recombinantes actives, et la mise au point des analyses fonctionnelles par des tests de complémentation du mutant ont constitué des étapes clés dans la mise en place de la stratégie utilisée. Je détaillerai ces travaux préliminaires cruciaux dans les deux chapitres suivants (figure 11).

D'autre part, j'ai été amené à m'intéresser à certains aspects complémentaires de la régulation de la protéine OST1 via d'autres approches. Le quatrième chapitre de ce manuscrit sera consacré à ces travaux qui suggèrent l'implication d'autres mécanismes sans toutefois amener de réponses définitives.

Enfin, OST1 appartient à une famille de 10 membres chez *Arabidopsis* et la question de la redondance entre ces différentes SnRK2 est critique afin de mieux comprendre la fonction de OST1 dans la transduction du signal ABA dans la cellule de garde. Deux approches menées au cours de ma thèse permettent d'apporter des éléments de réponse à cette question. J'ai en effet réalisé une première caractérisation de l'expression des 10 gènes *SnRK2* chez *Arabidopsis* et j'ai cherché à savoir si d'autres SnRK2 étaient fonctionnellement homologues à la protéine OST1. Le dernier chapitre de cette thèse présentera les résultats de ces approches.

J'ai choisi de ne pas faire de chapitre "Matériel et Méthodes" puisque cette partie est exhaustivement décrite dans le manuscrit de l'article. Les méthodes supplémentaires seront données sous forme d'un encadré en début de la partie correspondante (chapitre V).

CHAPITRE I :

IDENTIFICATION DE MOTIFS

STRUCTURAUX IMPLIQUES DANS LA

FONCTION DE OST1

I. VERS UNE MEILLEURE COMPREHENSION DES MECANISMES DE REGULATION DE LA PROTEINE OST1

Ce premier chapitre présente les travaux ayant permis d'identifier des motifs de la protéine OST1 indispensables à sa fonction dans la transduction du signal ABA dans la cellule de garde. Ils sont regroupés dans le manuscrit ci-dessous soumis au journal "*Plant Physiology*" et actuellement en révision.

RESUME

L'acide abscissique (ABA) relaie certaines réponses des plantes à la sécheresse, notamment la fermeture des stomates. Des protéines kinases de type SnRK2 ("Snf1-related kinase 2") ont été impliquées dans les voies de signalisation de l'ABA chez différentes espèces végétales. La protéine OST1/SRK2E/SnRK2-6 est un régulateur positif crucial de la transduction du signal ABA dans les cellules de garde d'*Arabidopsis thaliana*. Une meilleure compréhension des mécanismes d'activation des SnRK2 est donc un objectif majeur dans l'étude des voies de signalisation de l'ABA. Nos travaux aboutissent, pour la première fois, à la production chez *E.coli* et la purification d'une protéine recombinante OST1 active qui s'autophosphoryle. Une approche de spectrométrie de masse nous permet d'identifier 5 résidus cibles de cette autophosphorylation au sein de la protéine recombinante. L'analyse de la séquence de OST1 nous conduit par ailleurs à définir 2 boîtes conservées dans le domaine C-terminal de la protéine : la boîte "SnRK2" (Gln303 – Pro 318) et la boîte "ABA" (Leu333 – Met 362). Des approches de mutagenèse dirigée et de délétions progressives du domaine C-terminal révèlent que la sérine 175 de la boucle d'activation et le motif conservé "SnRK2" sont nécessaires pour l'activité de la kinase OST1 recombinante. L'expression des différentes versions de OST1 dans les cellules de garde du mutant nul permet de caractériser d'autres résidus et motifs, non requis pour l'activité kinase de la protéine, mais importants pour son activation par l'ABA et sa fonction dans la cellule de garde : les sérines 7, 18, 29 et 43 et la boîte "ABA". Les sérines sont des cibles potentielles d'événements de phosphorylation et la boîte "ABA" pourrait être impliquée dans l'interaction avec d'autres régulateurs, positifs ou négatifs, de la voie de signalisation dans la cellule de garde.

Identification of features regulating OST1 kinase activity and OST1 function in guard cells¹

Christophe Belin*, Pierre-Olivier de Franco, Clara Bourbousse, Stéphane Chaignepain, Jean-Marie Schmitter, Jérôme Giraudat, Hélène Barbier-Brygoo, Sébastien Thomine

Institut des Sciences du Végétal, CNRS, 1 avenue de la terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France (C.B., P.O.F., C.B., J.G., H.B.B., S.T.); Institut Européen de Chimie et Biologie, 2 rue Robert Escarpit, 33607 Pessac, France (S.C., J.M.S.)

Running title: Structural requirements for OST1 function

Footnotes

¹This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique. C.B. is supported by a fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et des Nouvelles Technologies.

*Corresponding author; e-mail belin@isv.cnrs-gif.fr; fax +33 1 69823768; phone +33 1 69823872

ABSTRACT

The phytohormone abscisic acid (ABA) mediates drought responses in plants and in particular triggers stomatal closure. Snf1-related kinase 2 (SnRK2) proteins from several plant species have been implicated in ABA signalling pathways. In *Arabidopsis thaliana*, guard cell OST1/SRK2E/SnRK2-6 is a critical positive regulator of ABA signal transduction. A better understanding of the mechanisms responsible for SnRK2 protein kinase activation is thus a major goal towards understanding ABA signal transduction. Here, we report the first successful purification of OST1 produced in *E.coli*: the protein is active and autophosphorylates. Using mass spectrometry, we identify 5 target residues of autophosphorylation in recombinant OST1. Sequence analysis delineates two conserved boxes located in the carboxy-terminal moiety of OST1 after the catalytic domain: the "SnRK2-specific" box (Gln303 to Pro318) and the "ABA-specific" box (Leu333 to Met362). Site directed mutagenesis and serial deletions reveal that Ser175 in the activation loop and the "SnRK2-specific" box are critical for the activity of recombinant OST1 kinase. Targeted expression of variants of OST1 kinase in guard cells uncovered additional features which are critical for OST1 function *in planta* although not required for OST1 kinase activity: serines 7, 18 and 29 and the "ABA-specific" box. Serines 7, 18, 29 and 43 represent putative targets for regulatory phosphorylations and the "ABA-specific" box may be a target for the binding of signalling partners in guard cells.

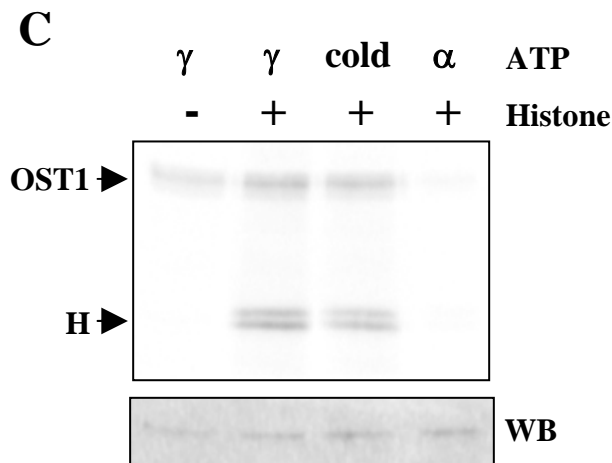
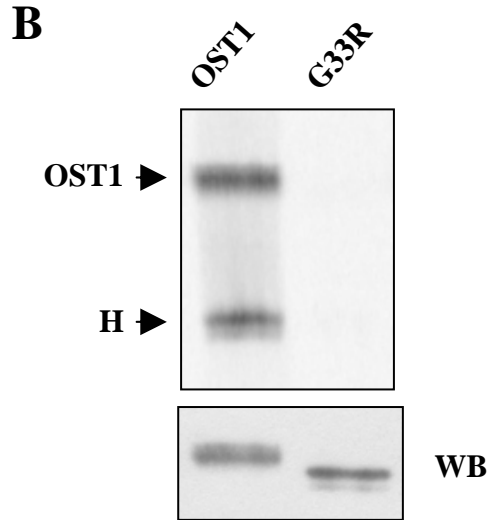
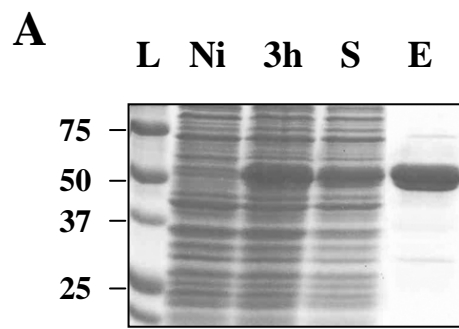


Figure I.1: OST1 recombinant protein is active and autophosphorylates

A. Different steps of 10xHis-OST1 production and native purification – SDS-PAGE and Coomassie staining (L: ladder, Ni: non induced bacteria lysate, 3h: bacteria lysate 3 hours after IPTG induction, S: soluble fraction, E: elution). **B.** *In vitro* kinase activity (upper panel) of the native recombinant 10xHis-OST1 (OST1) and the mutated version 10xHis-OST1^{G33R} (G33R). **C.** *In vitro* kinase activity (upper panel) of the native recombinant 10xHis-OST1 without (-) or with (+) histone III-S substrate and with usual [γ -³³P]ATP (γ), [α -³³P]ATP (α), or with usual [γ -³³P]ATP followed by a pulse of cold ATP 1 minute before stopping the reaction (cold). **B,C.** Arrows indicate autophosphorylation (OST1) and phosphorylation of histone III-S substrate (H). The lower panel shows the detection of the protein level by immunodetection using antibodies directed against the poly-histidine tag (WB).

INTRODUCTION

Drought is a major environmental constraint, and plants have developed several protective strategies to survive this stress. Most plants first respond to drought by closing their stomata to prevent water loss via transpiration. Abscisic acid (ABA) is a major phytohormone in higher plants which mediates drought responses in plants and particularly reduction of stomatal conductance through its action on guard cells (Tardieu et al., 1992). Indeed regulation of potassium and anion channels in response to ABA leads to a rapid decrease in osmotic pressure and consequently a massive efflux of water from guard cells. This decrease in turgor results in closing of the stomatal pore. If the mechanism of the stomatal closure is now quite well described (Roelfsema and Hedrich, 2005), a thorough understanding of the signal transduction pathway of ABA in guard cells will clearly require further research. Many second messengers and genes have been shown to be involved in ABA signal transduction, but little evidence exists concerning molecular interactions between these components (Hetherington, 2001; Schroeder et al., 2001; Himmelbach et al., 2003). Moreover, although an ABA receptor was recently characterized (Razem et al., 2006), it is not active in guard cells and the molecular mechanisms of ABA perception in these cells remain unknown.

Former studies reported the involvement of Snf1 Related Kinase 2 (SnRK2) proteins in ABA signal transduction pathways. First, PKABA1 was implicated in ABA signal transduction in wheat (TaPKABA1) and barley (HvPKABA1) seeds (Anderberg and Walker-Simmons, 1992; Gomez-Cadenas et al., 1999). Then, the *Vicia faba* SnRK2 protein AAPK was shown to be activated by ABA in guard cells (Li et al., 2000) and to control stomatal response to ABA. More recently, its ortholog in Arabidopsis, OST1/SRK2E, has been identified as a key component of ABA signal transduction in guard cells (Mustilli et al., 2002; Yoshida et al., 2002). Mutations in *OST1* gene severely impair the ability of stomata to close in response to drought or ABA. In contrast, *ost1* mutants display wild-type ABA responsiveness in seeds. They are thus the first recessive mutants which specifically affect ABA signal transduction in guard cells.

Several studies have reported the phosphorylation of substrates by ABA activated SnRK2 in different plant species. They include bZIP transcription factors such as TaABF from wheat (Johnson et al., 2002), TRAB1 from rice (Kagaya et al., 2002) and AREB1 from Arabidopsis (Furihata et al., 2006) or RNA binding proteins like VfAKIP1 from *Vicia faba* (Li et al., 2002). In contrast, OST1 has been positioned as the most upstream positive

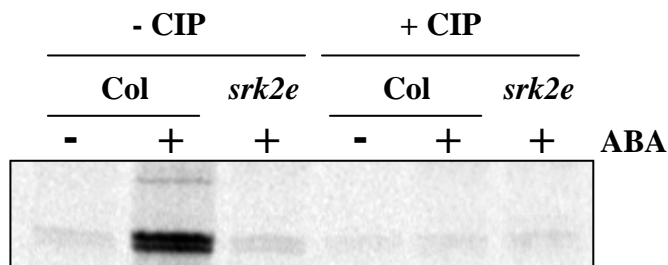


Figure I.2: *In planta* OST1 phosphorylation is required for its activity

Kinase assay of proteins immunoprecipitated from guard cells protoplasts extracts using a serum which recognizes specifically OST1. Protoplasts were treated for 30 minutes with 30 μ M ABA (+) or with ethanol solvent (-). Immunoprecipitated proteins were treated with a calf intestinal phosphatase (+ CIP) or were submitted to the same treatment without any phosphatase (- CIP). The faint band at high MW (molecular weight) corresponds to autophosphorylation and the high intensity band at low MW represents histone phosphorylation.

regulator known in the ABA signalling pathway in Arabidopsis guard cells (Mustilli et al., 2002) and nothing is known about the identity of upstream components targeting activation of SnRK2 in plants. Understanding the mechanisms of OST1 activation in response to ABA in guard cells is a major question.

Many kinases are themselves regulated by phosphorylation and dephosphorylation events. Recent studies reported the importance of phosphorylation in rice SnRK2 activation in response to osmotic stresses (Kobayashi et al., 2004). Moreover, OST1 kinase activation in response to ABA is suppressed in the dominant *abi-1* mutant (Mustilli et al., 2002), indicating that the protein phosphatase 2C ABI1 (Koorneef et al., 1984; Leung et al., 1994; Meyer et al., 1994) negatively regulates ABA signal transduction upstream of OST1. A recent study indicates that ABI1 may bind OST1 protein suggesting that it could directly modulate its phosphorylation status (Yoshida et al., 2006). SnRK2 kinases also have a very acidic carboxy-terminal region with unknown function. Recent works on Arabidopsis and rice SnRK2 families reported that three proteins out of the ten in each species are strongly activated in response to ABA in cultured cell protoplasts whereas all of them are activated in response to osmotic stress (Boudsocq et al., 2004; Kobayashi et al., 2004). Domain swapping experiments using rice SAPKs have demonstrated that grafting the non catalytic C-terminal region from ABA-activated SnRK2 (Glu254-Met372 from SAPK8) onto other (SAPK2 catalytic domain) is sufficient to confer ABA responsiveness (Kobayashi et al., 2004). Hence, phosphorylation and dephosphorylation events, as well as binding of partners to the regulatory carboxy-terminus of the protein are probably both involved in OST1 activation. We decided to investigate the relationships between OST1 structure and its function in guard cells, focusing on these two types of regulation.

Many previous studies using SnRK2 proteins from different plant species, including soybean, faba bean, tobacco, wheat or Arabidopsis, report that expression of recombinant proteins in *E.coli* results in inactive proteins (Yoon et al., 1997; Li et al., 2000; Johnson et al., 2002; Mustilli et al., 2002; Kelner et al., 2004). Authors hypothesized that SnRK2 activity requires activation by specific signalling cascades in plants. A single study on rice SnRK2 OsREK (SAPK3) reported some autophosphorylation of the recombinant kinase partially purified from *E.coli* extracts (Hotta et al., 1998) suggesting that active SnRK2 can be obtained. Production of SnRK2 in *E.coli* would make it easier to obtain large amounts of pure proteins and thus to perform biochemical studies than by using immunoprecipitated proteins from plant systems. Moreover, production of pure recombinant proteins in *E.coli* would allow

Table I.1. *Accurate mass determination indicates multiple phosphorylation of recombinant OST1*

ESI-LC-TOF mass measurements for 10xHis-OST1 and mutant version 10xHis-OST1^{G33R}. The third column indicates the experimental average mass of the various isoforms found in each sample. The fourth one indicates for each isoform the calculated number of phosphate groups based on the difference between experimental and theoretical masses (79.96 Da per phosphate group).

Recombinant protein	Theoretical mass (Da)	Experimental masses (Da)	Calculated number of phosphate groups
10xHis-OST1	46,342	46,658 ± 6	4
		46,740 ± 5	5
		46,820 ± 8	6
		46,899 ± 4	7
		46,978 ± 5	8
		47,060 ± 5	9
		47,151 ± 7	10
10xHis-G33R	46,442	40,299 ± 7	x^a
		46,436 ± 8	0

^aThis isoform does not correspond to a full length protein

studying their biochemical kinase activity independently of plant factors that might be co-immunoprecipitated.

Here we demonstrate that the recombinant fusion protein 10xHis-OST1 produced in *E.coli* and purified under native conditions is active and is able to autophosphorylate. This allows the identification of phosphorylated serine residues representing putative targets of upstream kinases or phosphatases. The importance of these residues is investigated both *in vitro* to study biochemical activity and in Arabidopsis guard cells to analyse their impact on OST1 function in signal transduction. Truncated versions also allow us to investigate the role of the C-terminus. We report here the identification of conserved features critical for OST1 kinase activity and function in guard cells.

RESULTS

The recombinant OST1 protein is an active kinase and autophosphorylates

To study the kinase activity of recombinant OST1, a vector was constructed which allowed expression of a 10xHis N-terminal tagged OST1 protein in *E.coli*. Figure I.1A shows the different steps of 10xHis-OST1 production and purification under native conditions. Large amounts (>20 mg) of highly purified recombinant OST1 were obtained. Assays for kinase activity show that this recombinant kinase is able to efficiently phosphorylate generic substrates such as histone (Figure I.1B) and MBP (Myelin Basic Protein, data not shown). Moreover, the occurrence of a band corresponding to the size of OST1 (about 50 kDa) suggests it is able to autophosphorylate. This is confirmed by kinase assays performed in the absence of a substrate (Figure I.1C). In addition, a modified kinase assay, using either [α - ^{33}P]ATP as a substrate or with the addition of unlabelled ATP 1 minute prior to stopping the reaction, shows that the signal at OST1 size is due to autophosphorylation rather than binding of radioactive ATP (Figure I.1C). In contrast, the mutated recombinant version 10xHis-OST1^{G33R} corresponding to the protein encoded by the *ost1-2* allele (Mustilli et al., 2002) purified in the same conditions is totally inactive (Figure I.1B).

We tested whether OST1 activity is modulated by second messengers involved in ABA signal transduction or ABA itself. Changes of external pH (from 7 to 8.5) or calcium concentrations (from 0 to 500 μM CaCl_2) did not significantly alter OST1 activity *in vitro*

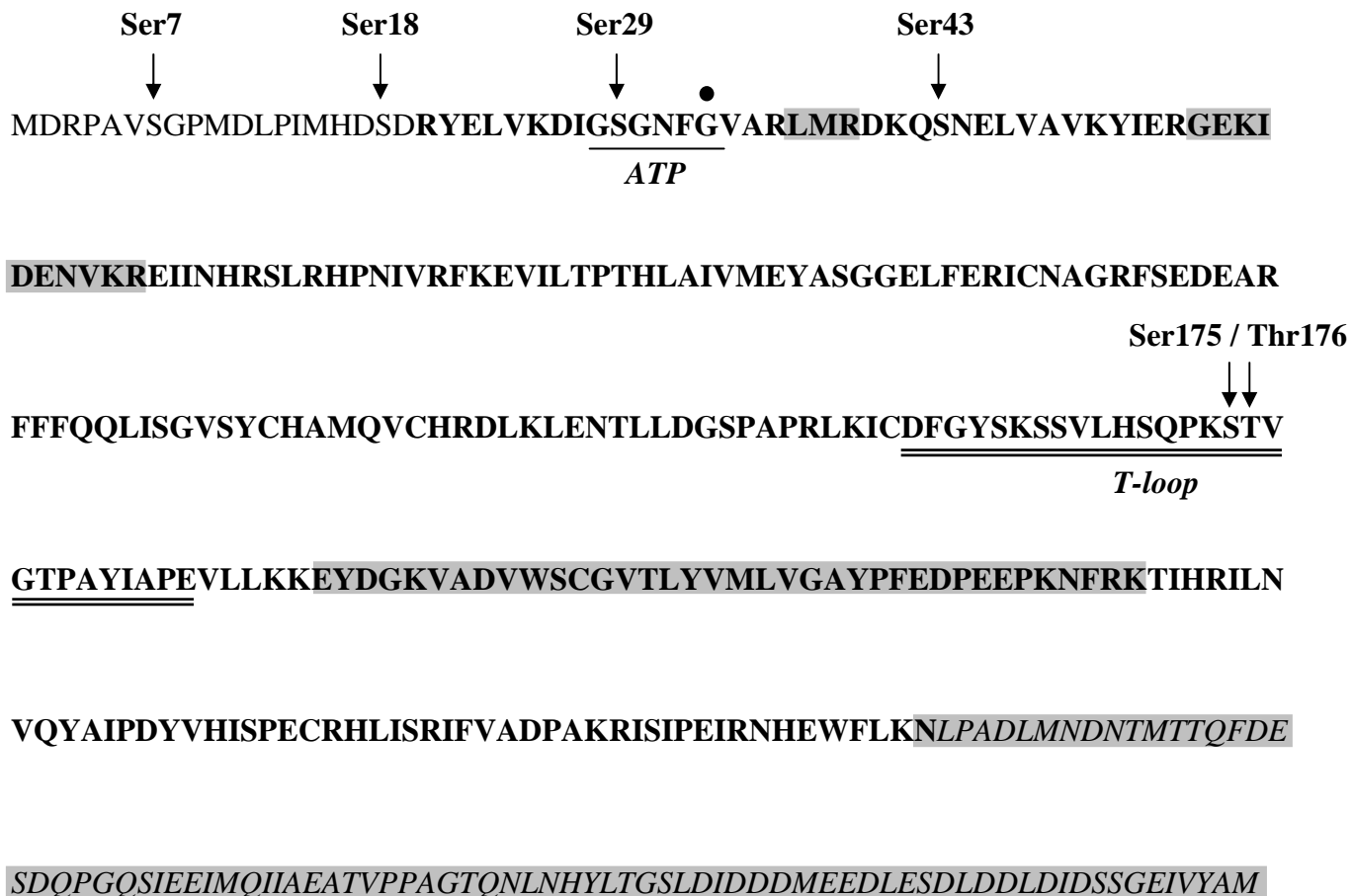


Figure I.3: Recombinant OST1 phosphorylated residues identified by Mass Spectrometry

Arrows indicate positions of identified phosphorylated residues in OST1 sequence. The catalytic domain and carboxy-terminal region are represented by bold and italic letters, respectively. Shaded sequences are not covered by mass spectrometry analysis. Underlined stretches represent conserved ATP-binding site GXGXXG (ATP) and activation segment (T-loop). The filled circle shows Gly33 which results in an inactive protein when mutated to arginine.

(data not shown). Finally, we demonstrated that ABA does not directly regulate OST1 *in vitro* activity (data not shown).

We are thus able to purify under non denaturing conditions a recombinant OST1 protein kinase and we demonstrate that it is active alone without any additional factor. This provides us a powerful tool to investigate structure-function relationships of OST1 protein.

Serines 7, 18, 29, 43 and T-loop are targets of autophosphorylation of OST1 *in vitro*

Active OST1 kinase is slightly shifted to higher apparent molecular mass compared to inactive OST1^{G33R} mutant (Figure I.1B). In rice, such shifts have been correlated with phosphorylations of SnRK2 kinases (Kobayashi et al., 2004). Moreover, active recombinant OST1 is able to autophosphorylate. These results lead us to test the importance of OST1 phosphorylation status for its activation in guard cells. Using an OST1 specific antiserum, we immunoprecipitated OST1 from extracts of purified guard cells treated or not with ABA. Figure I.2 shows that ABA induced kinase activity is immunoprecipitated from wild type guard cells. This kinase activity is absent from *srk2e* extracts, demonstrating that it corresponds to OST1. It is abolished when immunoprecipitated proteins are dephosphorylated before the kinase assay (Figure I.2). This indicates that OST1 phosphorylation is critical for its activity in guard cells and lead us to analyse differences of phosphorylation status between active and inactive recombinant proteins.

Mass spectrometry (MS) studies were performed in order to detect phosphorylated residues in the recombinant OST1 protein. The average mass of 10xHis-OST1 was measured by MALDI-MS analysis was about 400 Da above the theoretical value calculated from the sequence. However, the pseudo-molecular ion cluster was broad and unresolved. More convincing indications of phosphorylation were obtained by means of ESI-MS analysis of recombinant proteins 10xHis-OST1 and 10xHis-OST1^{G33R}. Seven different protein species were separated for active OST1 with masses ranging between 46,658 and 47,151 Da (Table I.1). A comparison between the theoretical mass of the recombinant protein (46,342 Da, taking into account excision of the N-terminal methionine) and experimental masses indicates that these different species correspond to isoforms of the protein carrying from 4 to 10 phosphate groups. Indeed, the average masses of the seven detected protein species differ by 80 Da, *i.e.* the mass of one added phosphate group. The analysis of OST1^{G33R} led to a major peak at 46,436 Da that matches the theoretical mass of OST1^{G33R} and a minor one which

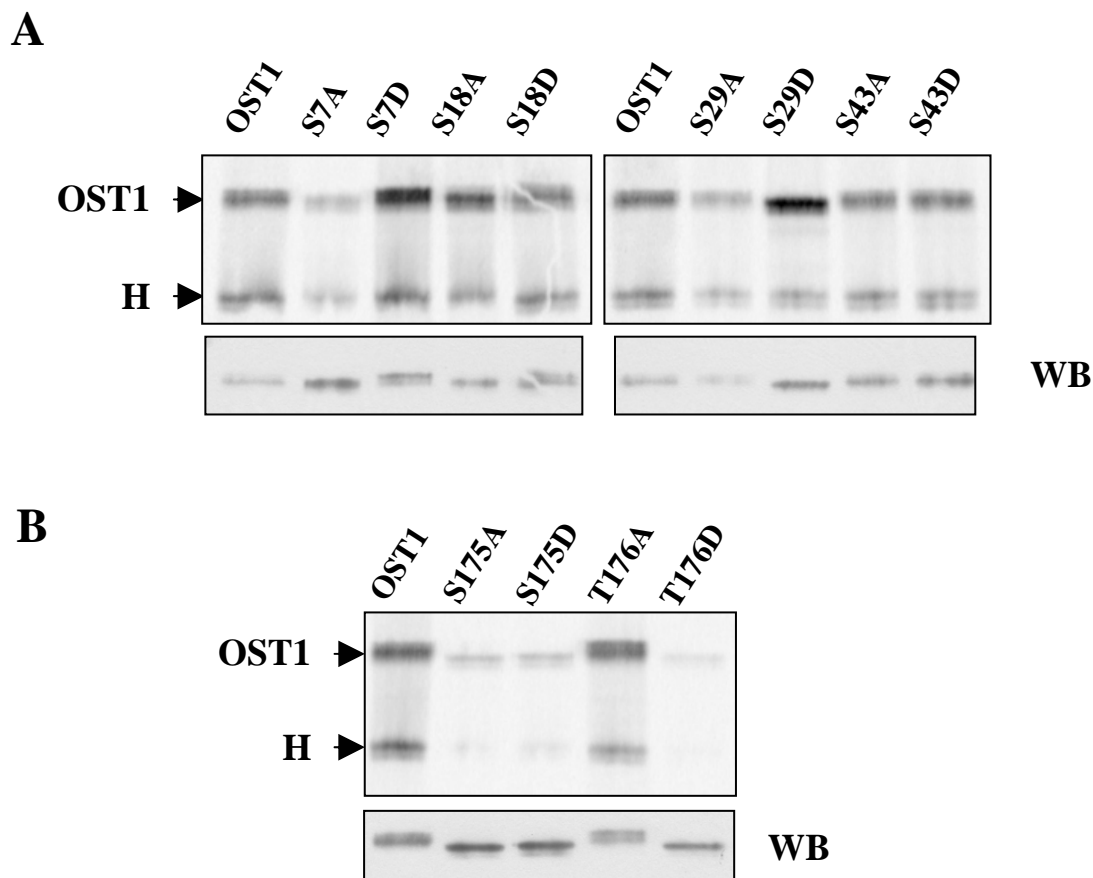


Figure I.4: Phosphorylation of Ser175 is required for OST1 kinase activity

A. Point mutations on serines 7, 18, 29 and 43. **B.** Point mutations on serine 175 and threonine 176. **A,B.** Each residue was mutated to alanine or aspartate. As in figure I.1, the upper band corresponds to autophosphorylation (OST1) and the lower one to phosphorylation of histone III-S (H). The lower panels (WB) show the protein level by immunodetection using antibodies directed against the poly-histidine tag .

probably corresponds to a degradation product. We may thus conclude that 10 residues of 10xHis-OST1 recombinant protein are targets of autophosphorylation.

In a second stage, MS/MS analysis of a tryptic digest of recombinant OST1 was used to map target residues. A combination of MALDI-Q/ToF and nano-LC-ESI-Q/ToF analysis led to 68% sequence coverage of the fusion protein; this low score is explained by the fact that the [280-369] tryptic peptide accounting alone for 22 % of the sequence was not detected. Nine potential phosphorylation sites were detected by a combination of exact mass measurement of precursor ions and observation of neutral loss (H_3PO_4) from these ions (Supplemental Table 1). Four phosphorylated sites belong to the N-terminal tag (residues -25, -24, -10 and -9) and are not relevant for OST1 function. Serines 7, 18, 29 and 43 belonging to the catalytic domain are modified by phosphate groups (Figure I.3). Peptide $^{175}STVGTPAYIAPEVLLK^{190}$ corresponds to the activation loop (also called activation segment or T-loop) that is conserved in most kinases. The MS/MS spectrum of this peptide ruled out the modification of ^{179}T , but did not allow the assignment of the phosphate group to ^{175}S or ^{176}T . No trace of a ^{175}S and ^{176}T doubly modified peptide was found, and incomplete coverage of the protein sequence presumably hindered identification of the tenth phosphorylated residue.

Thus, mass spectrometry pointed out 6 residues that are putatively important for OST1 activity regulation by phosphorylation, namely serines 7, 18, 29, 43, 175 and threonine 176 (Figure I.3).

S175 and T176 are critical for OST1 biochemical *in vitro* activity

In a first step, the requirement of each of the candidate phosphorylated residues identified for kinase activity of the recombinant fusion protein was tested. Each was substituted, either for an alanine to prevent phosphorylation or for an aspartate to mimic a constitutive phosphorylation. All point mutants ($OST1^{S7A}$, $OST1^{S7D}$, $OST1^{S18A}$, $OST1^{S18D}$, $OST1^{S29A}$, $OST1^{S29D}$, $OST1^{S43A}$, $OST1^{S43D}$, $OST1^{S175A}$, $OST1^{S175D}$, $OST1^{T176A}$ and $OST1^{T176D}$) were produced as recombinant 10xHistidine N-terminal tagged proteins in *E.coli*. Circular dichroism measurements in far UV (200 – 250 nm) revealed that none of the mutations drastically modified OST1 secondary structure (mostly α helices – data not shown). Figure I.4A shows that mutations of serines 7, 18, 29 and 43 do not critically affect kinase activity. Indeed quantification of three independent assays shows that activity ratios

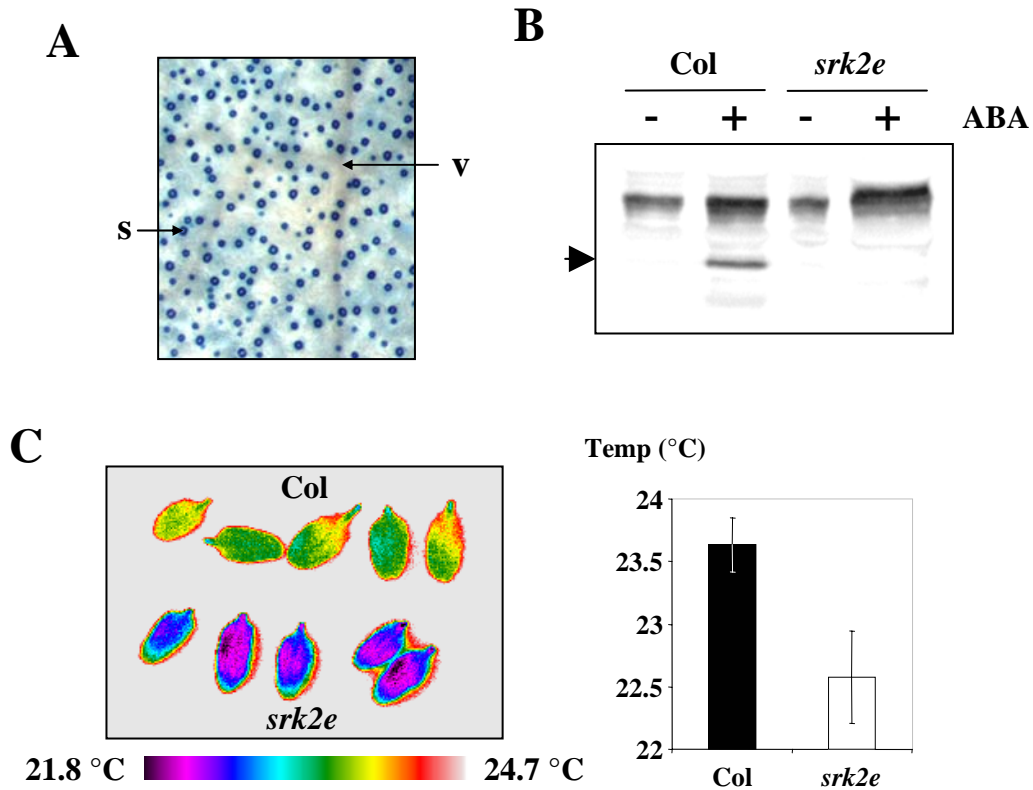


Figure I.5: OST1 expression is targeted to guard cells where it is activated by ABA and limits transpiration

A. Histochemical detection of GUS activity in the leaf of a representative line *srk2e* / $PRO_{OST1}:3xHA-GUS$ (s : stomata, v : vascular tissue). **B.** In-gel kinase assay of guard cells total protein extracts with histone III-S as the substrate. The arrow indicates the 42 kDa band corresponding to OST1. **C.** Infrared thermography false colour picture of detached leaves from Col and *srk2e* plants. The histogram represents the quantification of this picture (mean \pm sd).

for the corresponding mutants are included in the range 0.6 to 1.3 compared with wild-type OST1. Phosphorylation on these 4 residues is thus not required for OST1 kinase activity *in vitro*.

In contrast, both mutations of S175 greatly affect ability of the kinase to phosphorylate a substrate (Figure I.4B). In this case, it would appear that substitution of S175 for an aspartate does not mimic constitutive phosphorylation of the residue, as both mutants are equally impaired in kinase activity. The mutation T176 to aspartate is also critical for OST1 activity as we can only detect a slight band of autophosphorylation. However, the mutation of the same threonine to alanine has no effect on the kinase activity, demonstrating that phosphorylation of T176 is not required for OST1 activity. Two hypotheses may account for these results: either the threonine to aspartate mutation does, in this case, mimic constitutive phosphorylation and phosphorylation of this residue inactivates the kinase, or the T176D mutation results in a miss-folded protein when expressed in *E.coli*, which could explain the very low activity. At this stage, we cannot discriminate between the two hypotheses.

We conclude that serine 175 is critical for OST1 biochemical activity, in contrast with serines 7, 18, 29 and 43. However, these residues might still be targets of regulatory phosphorylation events *in planta*.

***In planta* studies focus on OST1 function in guard cells**

To test the functionality of OST1 point mutants in plants, we generated a binary vector driving the expression of the protein of interest in fusion with a triple hemagglutinin (3xHA) N-terminal tag under the control of *OST1* promoter. The use of the gateway™ cloning system and of seed-specific GFP expression as the selection marker (Bensmihen et al., 2004) allowed us to quickly generate and sort numerous lines in the *srk2e* background (Yoshida et al., 2002).

The *uidA* gene was first inserted in this vector to test *OST1* promoter specificity. Histochemical GUS staining in leaves (figure I.5A) and all aerial organs (data not shown) confirmed that this vector allows a strong and specific expression of the protein of interest in guard cells. This is in agreement with the results reported previously (Mustilli et al., 2002).

An in-gel kinase assay (figure I.5B) was performed on total protein extracts from Col and *srk2e* guard cells. This experiment confirmed that OST1 is strongly activated by ABA in wild-type guard cells while OST1 kinase activity is totally absent in the *srk2e* mutant background. In agreement with these results, *srk2e* mutant shows increased water-loss due to

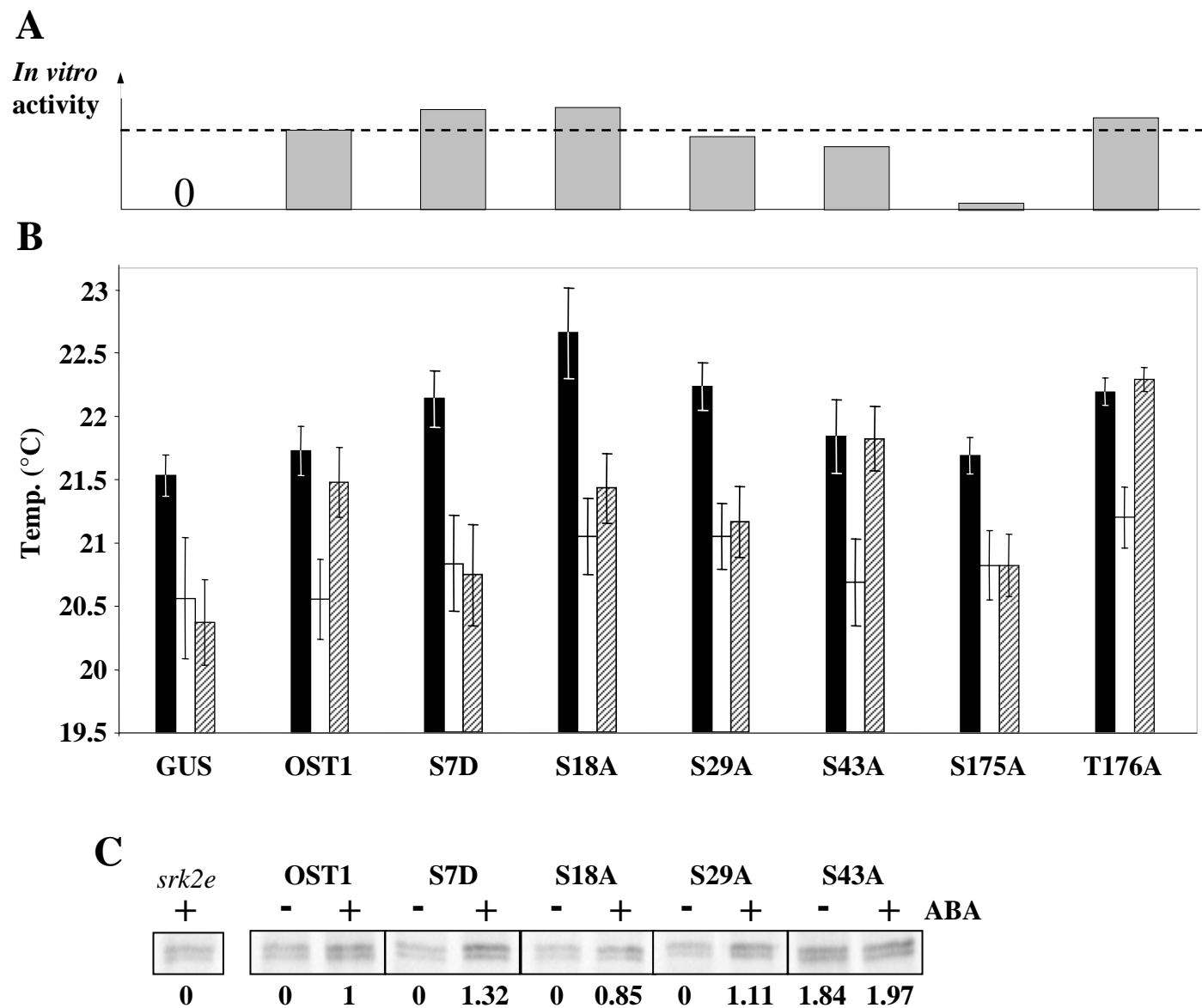


Figure I.6: Several phosphorylable serine residues are required for OST1 function *in planta*

A. *In vitro* biochemical activity of recombinant proteins produced in *E. coli*: quantification of 1 to 4 kinase assays as shown in figure I.4 (0 means no activity – dotted line = OST1 activity). **B.** Quantification of infrared thermography pictures of detached leaves. Black, white and hatched bars respectively represent the WT (Col), mutant (*srk2e*) and one representative line *srk2e* / *PRO_{OST1}:3xHA-X* (with *X* = *uidA*, *OST1* or a point-mutated version of *OST1*) for each construct (mean \pm sd, n = 3 or 4 leaves). **C.** *In planta* activation of fusion proteins in response to ABA. *In vitro* kinase assay on proteins immunoprecipitated from plants treated (+) or not (-) by 30 μ M ABA for 3 hours. Values represent normalized activity of each version: quantification of the gel using ImageJ, subtraction of the background (*srk2e*+ = 0) and values normalized (OST1+ = 1). *srk2e*: negative control (immunoprecipitation from *srk2e* plants treated by ABA).

defects in stomatal closure. This phenotype can be monitored by infrared thermography (Merlot et al., 2002) as shown on figure I.5C.

Guard cell specific expression in *srk2e* null mutant allows us to investigate OST1 function in the signalling pathways leading to stomatal closure whilst avoiding possible side-effects caused by ectopic expression from a 35S promoter or the presence of an inactive OST1 protein. OST1 function was investigated by testing mutant complementation using the infrared thermography approach on detached leaves to monitor stomatal aperture.

Serines 7, 18, 29, 43 and 175 play distinct roles in OST1 function *in planta*

In order to investigate *in planta* the function of the serines and threonine identified as putative phosphorylation targets, the point-mutated versions of OST1 were introduced into the *srk2e* null background and several independent lines selected for all constructs. GUS and OST1 lines were used as negative and positive controls for mutant complementation, respectively. Infrared images of detached leaves with wild type (Col) and mutant (*srk2e*) control leaves on each image were used to quantify the leaf temperature. Results in figure I.6B show that GUS is unable to complement *srk2e* mutant whereas the wild-type "warm" phenotype is restored when OST1 is expressed in *srk2e* guard cells. This figure shows one representative line for each of the residues targeted by site directed mutagenesis. Similar results were obtained when the residues were mutated to alanine or aspartate and in several lines for each substitution (Supplemental figure 2).

Both mutations affecting serine 175 totally abolish OST1 ability to complement the *srk2e* mutant in agreement with the decreased kinase activity of the corresponding recombinant proteins (Figures I.6A, I.6B, and supplemental figure 2). In the case of threonine 176, both mutants (Thr to Ala and Thr to Asp) fully restore the wild-type phenotype when expressed in the mutant background (Supplemental figure 2). This threonine is thus not necessary for OST1 function. The lack of *in vitro* activity reported for the OST1^{T176D} recombinant protein is most likely due to incorrect protein folding in *E.coli*.

Serines 7, 18, 29 and 43 are not required for OST1 kinase activity *in vitro*. Complementation assays show that mutations of serines 7, 18 or 29 greatly impair the ability of OST1 to complement the *srk2e* mutant phenotype (Figure I.6B and supplemental figure 2). To determine whether S7, S18 and S29 mutations impair OST1 activation by ABA *in planta*, we tested the activity in response to ABA of the corresponding versions. Fusion proteins were

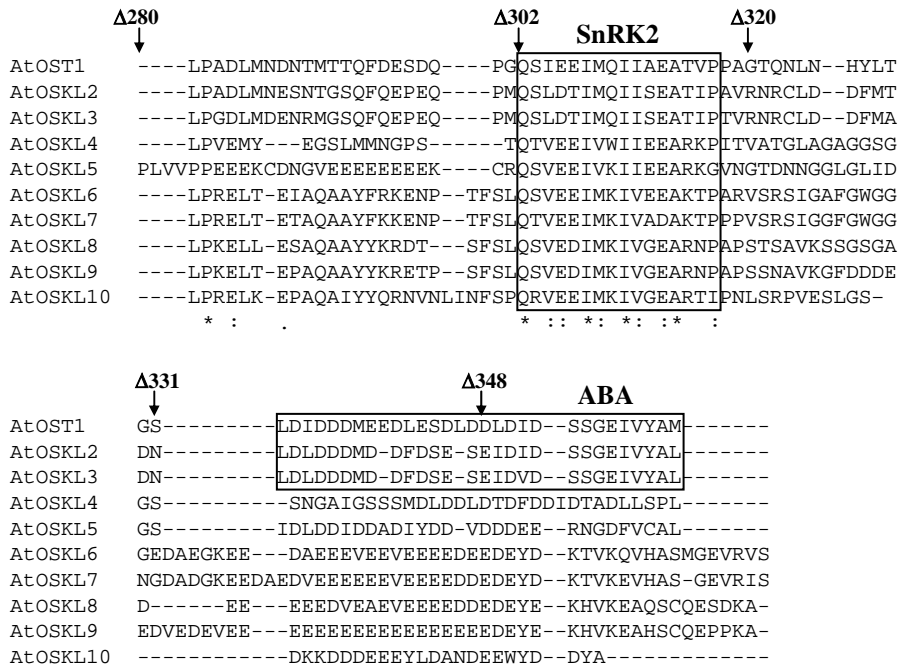


Figure I.7: SnRK2 C-terminus is composed of 2 putative functional boxes

Alignment of the C-terminal regions of the 10 Arabidopsis SnRK2. Boxes show the 2 conserved features: the "SnRK2-specific" one which is conserved among all 10 kinases and the "ABA-specific" one only found in strongly ABA-responsive kinases. Arrows indicate the end of the 5 truncated versions we have generated.

immunoprecipitated from plants treated or not by ABA using an antibody directed against the 3xHA tag. Kinase assay shows that mutations on serines 7, 18 and 29 do not affect the activation of the kinase in response to ABA (Figure I.6C). In contrast, mutations of serine 43 do not prevent *srk2e* complementation by OST1. Interestingly, OST1^{S43A} version immunoprecipitated from plants is not activated by ABA but rather constitutively active (Figure I.6C). We conclude therefore that serines, 7, 18 and 29 are critical for OST1 function in the signalling pathway leading to stomatal closure whereas serine 43 controls negative regulation of OST1 activity in the absence of ABA.

The C-terminal domain affects OST1 function through two conserved motives

In order to better understand how the carboxy-terminal domain affects OST1 function, we investigated the structure-function relationship of this domain. The alignment of the ten Arabidopsis SnRK2, shown in figure I.7, reveals a highly conserved feature among the 10 proteins, between the Gln303 and the Pro318. We name this the "SnRK2-specific" box. This box is also conserved in all rice SAPK (Supplemental figure 1). A second region after Ser332, which we name "ABA-specific" box, is conserved specifically among the three strongly ABA-activated kinases: OST1, OSKL2, OSKL3 (Figure I.7), as well as in ABA-activated rice SAPK (Supplemental figure 1). Based on these observations, we decided to dissect the function of these 2 domains by generating five truncated versions of the OST1 protein: OST1 Δ 280 which is lacking all the C-terminal region, OST1 Δ 302 which is lacking the "SnRK2" box, OST1 Δ 320, OST1 Δ 331 and OST1 Δ 348 which is lacking half of "ABA" box (Figure I.7). Truncated versions of OST1 were expressed in *E.coli*, as recombinant proteins, and were introduced in plants in the *srk2e* background.

In vitro kinase assays of recombinant proteins (Figure I.8) show that OST1 Δ 280 and OST1 Δ 302 truncated proteins have no kinase activity, while OST1 Δ 320 activity is similar to the full length OST1 protein. Circular dichroism measurements in far UV (200 – 250 nm) on recombinant proteins revealed that none of the truncations drastically modified OST1 secondary structure (mostly α helices – data not shown). Hence, the "SnRK2-specific" domain is necessary for OST1 kinase activity and its conservation suggests that it is responsible for the activation of all SnRK2 proteins. Longer truncated versions are all active when produced in *E.coli*. This implies that the second half of the C-terminal region, after Ala320, is not necessary for OST1 kinase activity. The efficiency of substrate

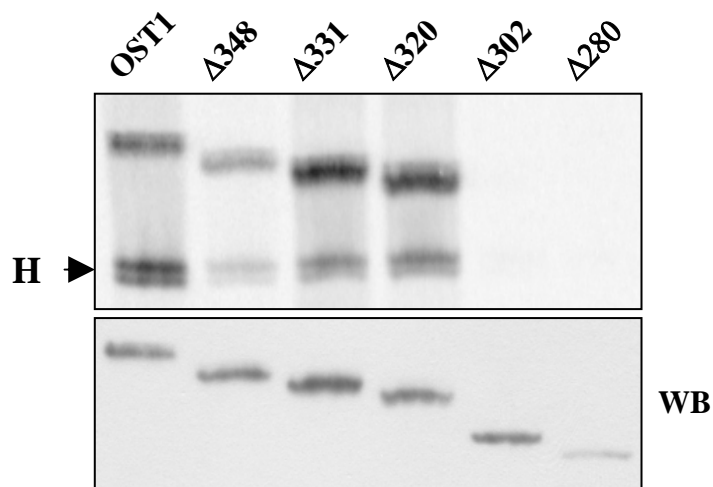


Figure I.8: Truncation of the SnRK2-specific feature abolishes kinase activity *in vitro*

The upper band corresponds to autophosphorylation and the lower one to phosphorylation of histone III-S (H). The lower panel indicates protein level by immunoblot against the histidine tag (WB). OST1: full length recombinant protein. Δ348, Δ331, Δ320, Δ302 and Δ280 are the last residue of each truncated version, respectively.

phosphorylation however differs between versions, suggesting a role of this domain in modulating OST1 kinase activity.

Results of *in planta* complementation assays are shown in figure I.9B and supplemental figure 3. As expected, OST1 Δ 280 and OST1 Δ 302, which do not display kinase activity *in vitro*, do not complement the *srk2e* phenotype. More surprisingly, truncation after Ala320, which results in an active protein when expressed in *E.coli*, totally abolishes the activation of the kinase by ABA *in planta* and the ability of OST1 to complement the *srk2e* mutant (Figures I.9B and I.9C). Likewise, OST1 Δ 331 which retains substantial kinase activity *in vitro* is not activated by ABA *in planta* and is not able to complement the mutant. This indicates that the "ABA-specific" domain is very important for OST1 activation by ABA and function in plants. In contrast, OST1 Δ 348 fully complements *srk2e* phenotype and displays stronger activation by ABA than OST1 in plants (Figure I.9) although it shows a lower kinase activity *in vitro* than the full-length protein. We conclude that the Leu333-Asp348 stretch within the "ABA-specific" box is critical for the activation by ABA and the function of OST1 in guard cells. Hence, we decided to check whether ABA could directly regulate OST1 activity through this stretch. However, *in vitro* treatment of the OST1 protein immunoprecipitated from plants by 10 μ M ABA did not induce kinase activity (data not shown). Finally, the Asp348-Met362 stretch may be involved in a mechanism which negatively regulates OST1 activity.

DISCUSSION

OST1 protein kinase has been shown to act as a positive regulator of stomatal closure in guard cells (Mustilli et al., 2002; Yoshida et al., 2002). Here, we present results leading to a better understanding of how the structure of OST1 protein affects its function in guard cell specific signal transduction.

Several previous works reported that recombinant SnRK2 were inactive (Yoon et al., 1997; Li et al., 2000; Johnson et al., 2002; Mustilli et al., 2002; Kelner et al., 2004). For the first time, we successfully produced in *E.coli* and purified a recombinant SnRK2 protein in a native active form. This discrepancy is probably due to the use of different tags. Indeed, former attempts used GST or short 6xHistidine tags in N-terminal or C-terminal positions. In our case, a short 6xHistidine tag fused at the N-terminal did not allow a purification of native recombinant proteins (data not shown). Only the construct with the gateway cassette allowed

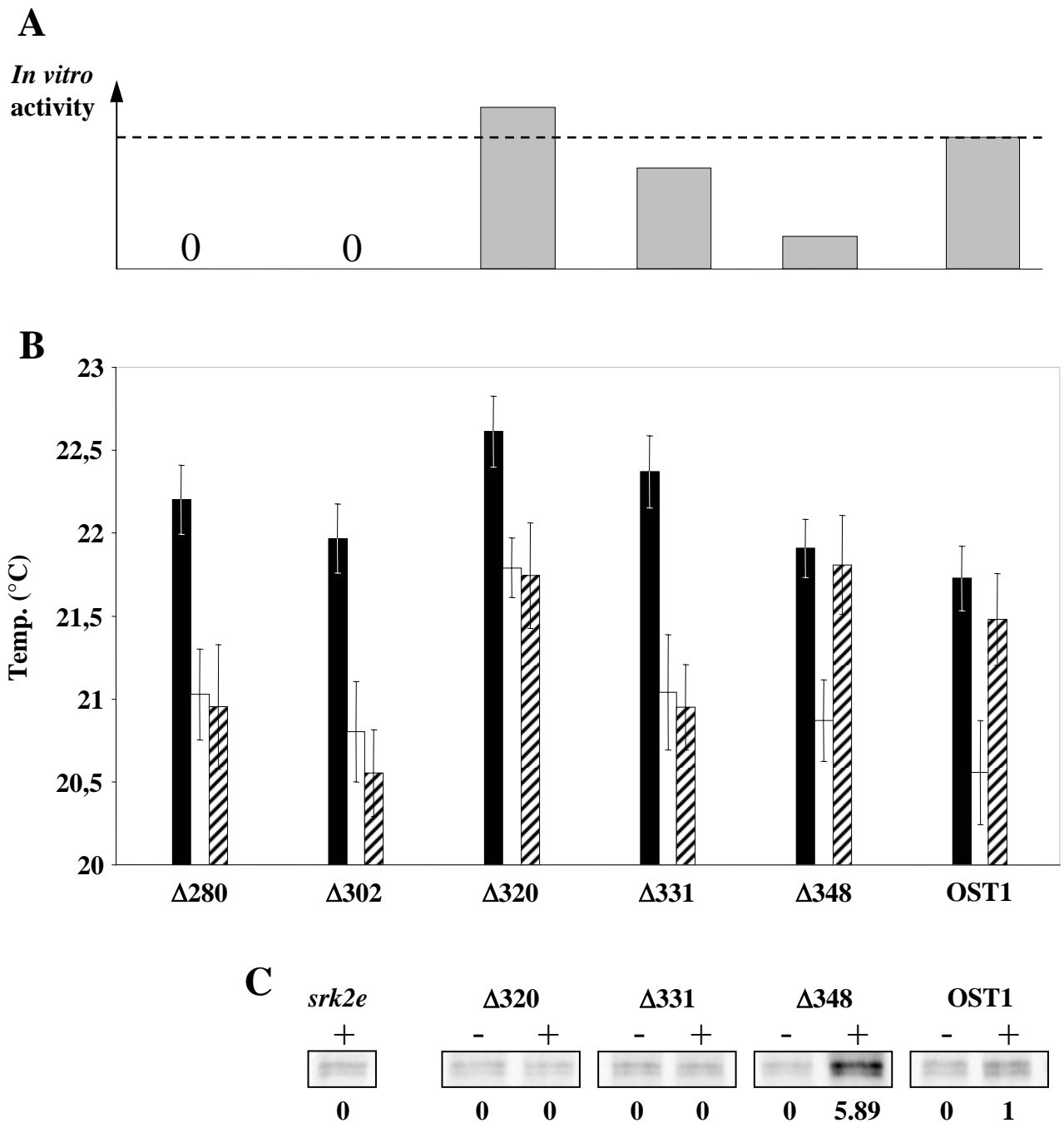


Figure I.9: Impact of C-ter deletions on OST1 *in planta* activity

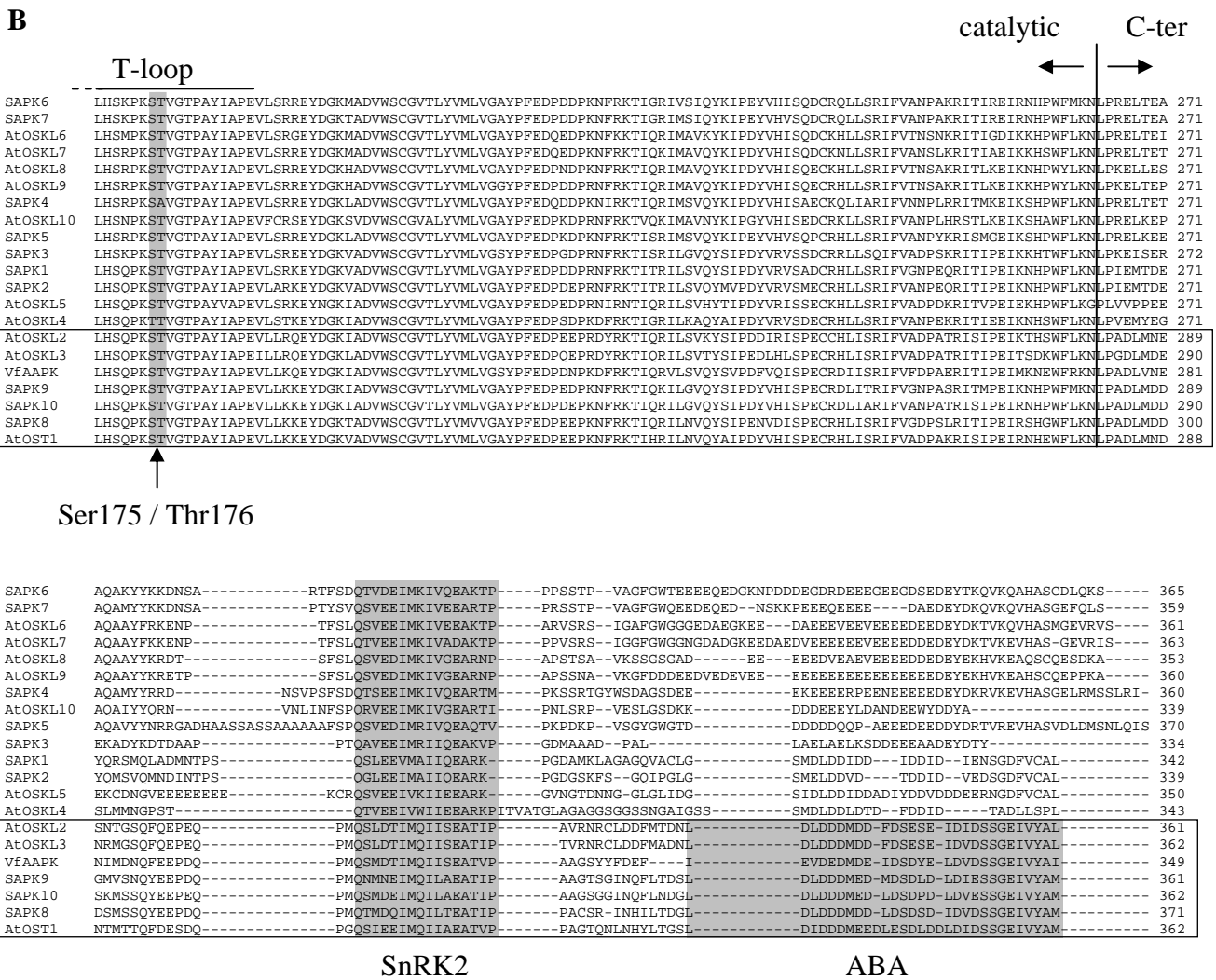
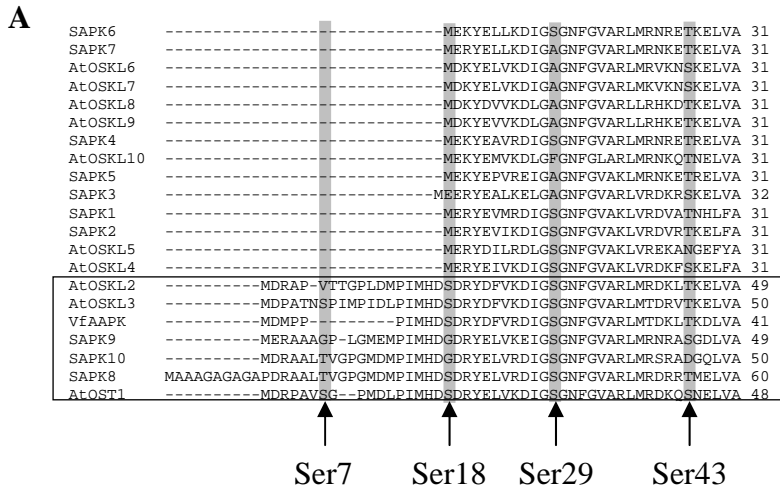
A. *In vitro* biochemical activity of recombinant proteins produced in *E.coli*: quantification of kinase activity shown in figure I.8 (0 means no detectable activity – dotted line = OST1 activity). **B.** Histograms represent quantification of infrared thermography pictures of detached leaves. Black, white and hatched bars respectively represent the WT (Col), mutant (*srk2e*) and one representative line *srk2e* / *PRO_{OST1}:3xHA-X* (with X = OST1 or a truncated version of OST1) for each construct (mean \pm sd, n = 3 or 4 leaves). **C.** *In planta* activation of fusion proteins in response to ABA. *In vitro* kinase assay on proteins immunoprecipitated from plants treated (+) or not (-) by 30 μ M ABA for 3 hours. Values represent normalized activity of each version: quantification of the gel using ImageJ, subtraction of the background (*srk2e*+ = 0) and values normalized (OST1+ = 1). *srk2e* : negative control (immunoprecipitation from *srk2e* plants treated by ABA).

us to purify the 10xHistidine tagged protein, probably thanks to the short linker encoded by this cassette which provides a slightly longer tag.

The expression of SnRK2 recombinant proteins in *E.coli* allowed us to identify target residues of autophosphorylation *in vitro*. Using mass spectrometry, we found 4 unequivocal target residues: Ser7, Ser18, Ser29 and Ser43, as well as a fifth peptide carrying 1 phosphate group for which we could not distinguish which one of Ser175 or Thr176 was the target residue. This peptide corresponds to the OST1 activation loop (or T loop). Activation loops of many kinases have been extensively studied and their phosphorylation is often necessary for kinase activity of the protein (Johnson et al., 1996; Adams, 2003). In the SnRK3 protein SOS2 for instance, mimicking constitutive phosphorylation of one specific residue of the T loop (Thr168 mutated to aspartate) results in a constitutive active protein when expressed in *E.coli* whereas the native protein is inactive (Guo et al., 2001). Previous results on rice SAPK have shown that this mechanism cannot be simply extended to SnRK2 proteins (Kobayashi et al., 2004). Indeed, substitution of serine (Ser158) or threonines (Thr159, Thr162) of the T loop for an aspartate inactivates the SAPK2 kinase when expressed in rice cultured cell protoplasts.

Production of active recombinant proteins in *E.coli* allowed us to investigate the importance of this activation loop and other residues targets of autophosphorylation by testing the *in vitro* activity of versions of the protein in which each has been mutated. Our results are in agreement with reports on immunoprecipitated SAPKs (Kobayashi et al., 2004). Indeed, the non-mutated OST1 protein produced in *E.coli* is active and mutations on Ser175 in the T loop greatly affect this activity. In addition, our results show that the mutation Thr176 to Ala results in a fully active recombinant protein. Phosphorylation of Thr176 is thus not required for activity of the OST1 recombinant protein. This is further supported by *srk2e* mutant complementation by OST1^{T176A} and OST1^{T176D} (Figure I.6). In contrast, Ser175 is critical for kinase activity and is most likely the phosphorylated residue of the peptide identified using mass spectrometry. Accordingly, neither OST1^{S175A} nor OST1^{S175D} are able to complement the *srk2e* stomatal phenotype.

Production of recombinant proteins also allowed us to investigate the structure-function relationships of the regulatory C-terminus of OST1 protein. Former studies on rice have demonstrated that SnRK2 family may be divided in three subclasses and only rice kinases from the subclass III (SAPK8, SAPK9 and SAPK10) were strongly activated in response to ABA (Kobayashi et al., 2004). In Arabidopsis, previous reports have also shown that strong activation by ABA is restricted to the members of the same subclass (OST1/SnRK2-6,



Supplemental figure 1: Conservation of identified features among rice, Arabidopsis and *Vicia faba* SnRK2 sequences

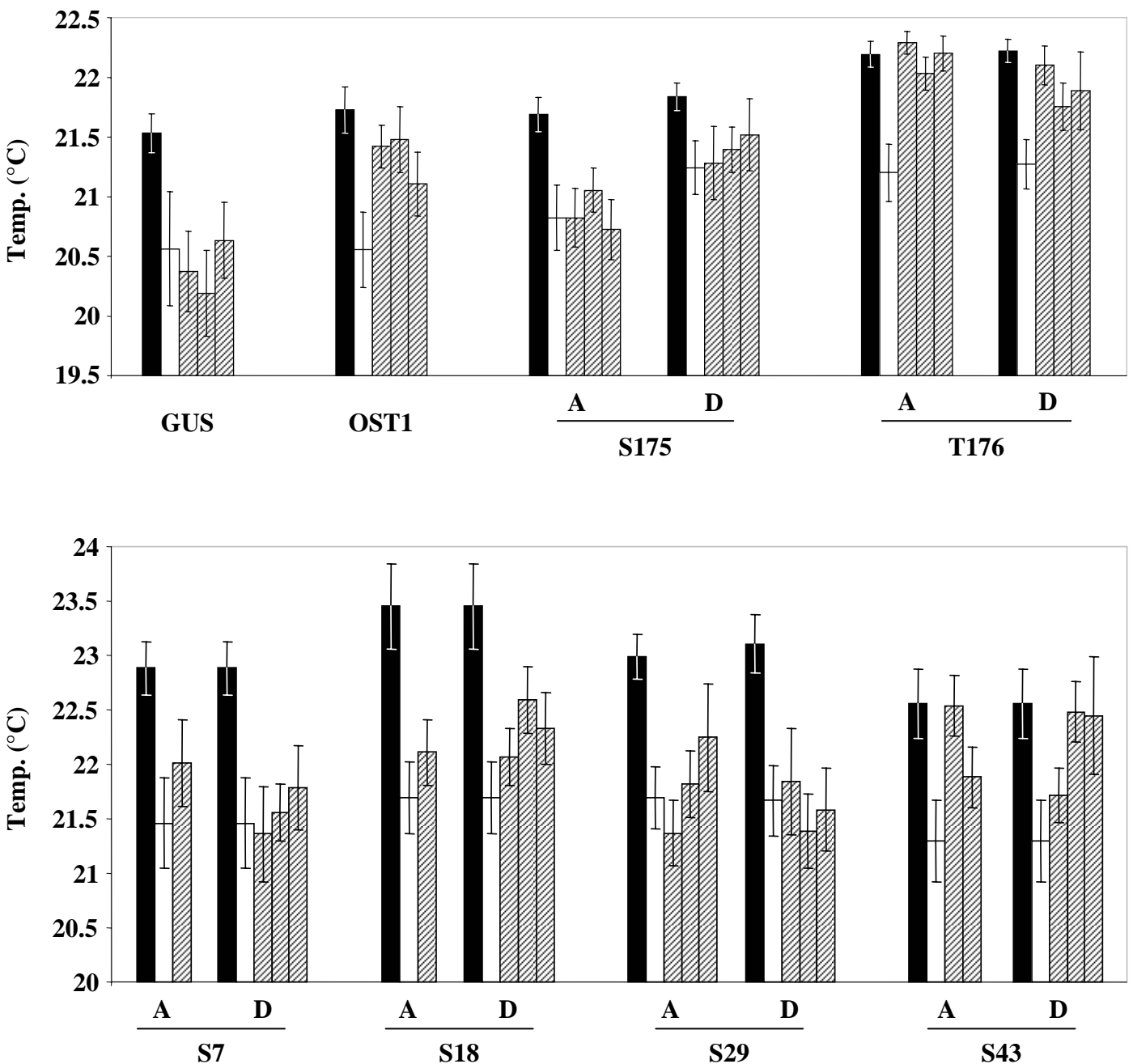
A. N-terminal extremity. **B.** C-terminal moiety.

OSKL2/SnRK2-3 and OSKL3/SnRK2-2 – (Boudsocq et al., 2004)). The alignment of the carboxy-terminal domain of all SnRK2 reveals 2 conserved boxes within the 2 domains recently defined (Yoshida et al., 2006): the "SnRK2-specific" box shared by all SnRK2 kinases and the "ABA-specific" box specifically conserved in subclass III of ABA-activated SnRK2. We demonstrate here that the "SnRK2-specific" box is necessary for recombinant OST1 kinase activity. Indeed, whereas the OST1 Δ 320 version is fully active, removal of this box in OST1 Δ 302 results in an inactive kinase. We propose therefore that the "SnRK2" box is important for general intramolecular mechanisms of SnRK2 activation rather than specific low humidity ABA-independent activation (Yoshida et al., 2006).

We also identify four phosphorylated serines (Ser7, Ser18, Ser29 and Ser43) and another box ("ABA-specific") between Leu333 and the end of the protein (Met362) which are not required for recombinant OST1 kinase activity. These features represent good candidates as regulatory sites for OST1 function in plants. Mechanisms of activation of OST1 in plants probably involve some of these features through binding of upstream partners or phosphorylations.

OST1 is expressed in vascular tissues of all plant organs but its function in this context is unknown. In contrast, OST1 is a key regulator of stomatal movements. Because stomata are very specialized structures, it is likely that the mechanisms of OST1 regulation in guard cells differ with respect to other cell types. We use the *OST1* promoter to focus our assay for *in planta* OST1 function on guard cell signalling pathway leading to stomatal closure. GUS histochemical staining (Figure I.5A) confirmed that *OST1* promoter principally drives expression in guard cells (Mustilli et al., 2002). In our staining conditions, expression in vascular tissues is hardly detectable. Moreover, we investigated specific guard cell function of OST1 by monitoring stomatal aperture by infrared thermography. Our functional analysis of OST1 structure-function in guard cells complements previous studies using suspension cells overexpressing SnRK2 proteins (Boudsocq et al., 2004; Kobayashi et al., 2004) or studies of OST1 in roots, where its function remains unknown (Yoshida et al., 2006). It allows the identification of key structural features that might be relevant for OST1 modulation in the context of stomatal regulation.

The expression in the *srk2e* mutant of truncated OST1 versions which are inactive when produced in *E.coli* (OST1 Δ 280 and OST1 Δ 302) as well as point mutations of Ser175, which greatly affect *in vitro* activity of OST1 recombinant protein, do not allow mutant



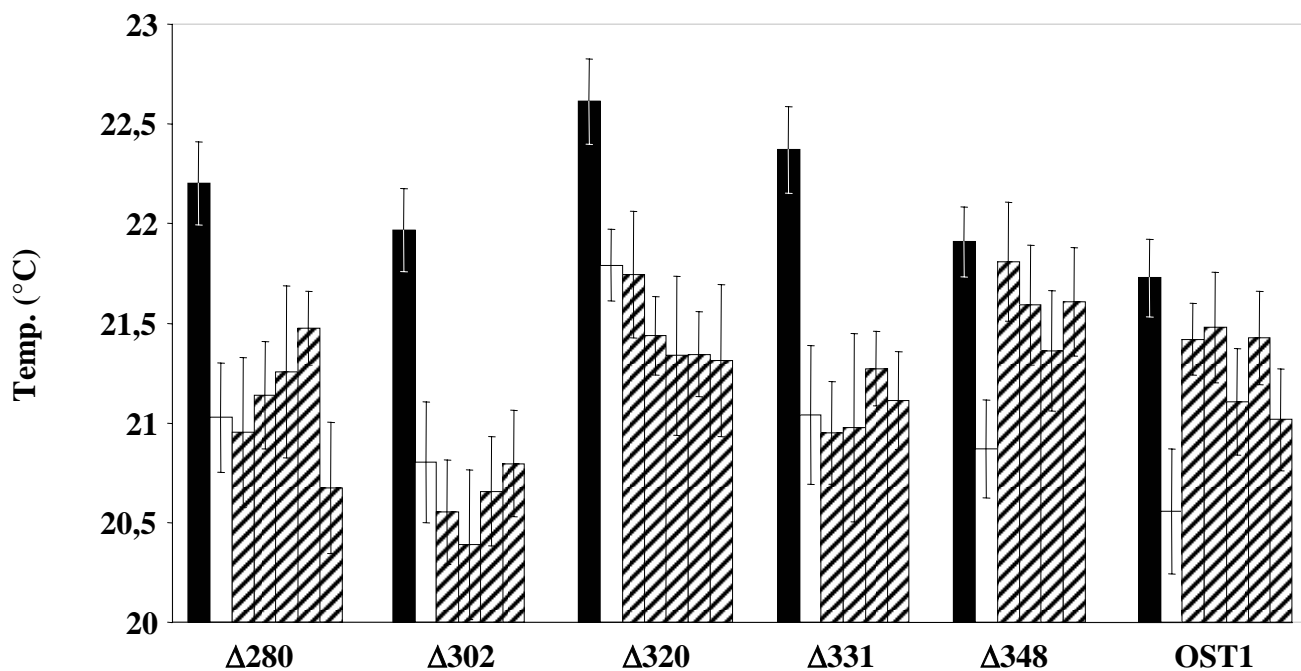
Supplemental figure 2: Several amino acid substitutions on OST1 phosphorylable residues prevent complementation of *srk2e* mutant

Histograms represent quantification of infrared thermography pictures of detached leaves. Black, white and hatched bars respectively represent the WT (Col), mutant (*srk2e*) and different independent lines *srk2e* / *PRO_{OST1}:3xHA-X* (with X = *uidA*, *OST1* or a point-mutated version of *OST1* as indicated) for each construct (mean \pm sd, n = 3 or 4 leaves).

complementation. These results indicate that the function of OST1 in guard cells involves its kinase activity rather than a scaffolding of transduction components.

Among the mutations that do not impair recombinant OST1 protein kinase activity, mutated versions on Ser43 are able to complement *srk2e* mutant for guard cell phenotype. Interestingly, the OST1^{S43A} mutant kinase is constitutively active in plants. We propose that phosphorylation of this serine, which is perfectly conserved in SnRK2 and SnRK3 families, represses OST1 activity in the absence of ABA. Mutations on the three other identified serines affect the ability of OST1 to complement the mutant but not its activation by ABA in plants. We suggest that Ser7, Ser18 and Ser29 may be targets of phosphorylation and dephosphorylation events in guard cell specific signalling pathway, and participate in the regulation of the stability of the protein, the target recognition or the docking of OST1 to a specific transduction complex. Ser7, in the N-terminal extension peptide specific to OST1, and Ser18, which links this N-terminal peptide with the catalytic domain (Figure I.3), are specific of the subclass III SnRK2 proteins as defined previously (Kobayashi et al., 2004). This supports their implication in regulating OST1 function in guard cell signalling pathway. Moreover, difficulties to purify a native active OST1 protein when fused with a N-terminal tag supports the importance of the N-terminus conformation for OST1 activity. Finally, it is in agreement with a recent work (Yoshida et al., 2006) which shows that this N-terminal extension enhances OST1 kinase activity but does not participate in activation by ABA or osmotic stress. We propose that phosphorylation of this peptide may regulate recruitment and phosphorylation of substrates by changing the conformation of the N-terminus.

Domain-swapping experiments between ABA-responsive and non ABA-responsive members of the rice SnRK2 family have shown that the carboxy-terminal domain confers ABA responsiveness (Kobayashi et al., 2004). More recently, 2 sub-domains (I and II) were identified within the C-terminus of Arabidopsis SnRK2 (Yoshida et al., 2006). This laboratory proposed a model in which "domain II" would be responsible for ABA activation and "domain I" for activation by an ABA-independent pathway. Our results show that "domain I" is critical for OST1 kinase activity. In contrast, we agree that "domain II" is not necessary for kinase activity but is critical for OST1 function in guard cells since we demonstrate here that integrity of the "ABA-specific" box is absolutely necessary for the activation of OST1 by ABA and its function in guard cells. Taken together, these results suggest that the Leu333-Asp348 motif is responsible for the binding of regulatory components positively regulating OST1 kinase activity in the signalling pathway. In contrast, our data suggest that the Asp348-Met362 extremity is involved in the negative regulation of



Supplemental figure 3: Impact of C-ter deletions on OST1 function in planta

Histograms represent quantification of infrared thermography pictures of detached leaves. Black, white and hatched bars respectively represent the WT (Col), mutant (*srk2e*) and different independent lines *srk2e* / *PRO_{OST1}::3xHA-X* (with *X* = *OST1* or a truncated version of *OST1* as indicated) for each construct (mean \pm sd, n = 3 or 4 leaves).

OST1 activity in response to ABA. This is in agreement with the binding of ABI1 on "ABA" box to negatively regulate OST1 function in the ABA signalling pathway in guard cells (Yoshida et al., 2006).

Combining studies of OST1 kinase activity *in vitro* and OST1 function in guard cells, we could identify two classes of regulatory features. Serine 175 and the "SnRK2-specific" box are critical for kinase activity and the mechanisms involved are probably shared by all kinases of SnRK2 family, whatever the signalling pathway in which they act. In contrast, serines 7, 18 and 29, and the "ABA-specific" box are required for OST1 function in guard cells. In addition, our results show that serine 43 is involved in repression of OST1 activity in the absence of ABA. These serines may be targets of upstream phosphorylation or dephosphorylation events, and the "ABA-specific" motif may bind specific regulatory components of the pathway. These phosphorylations and interactions with upstream partners may regulate the function of OST1 kinase in guard cells by modulating its activity, its stability, or recruitment of specific substrates. Detailed knowledge of the structural features responsible for OST1 regulation *in planta* will help to identify interacting transduction components.

MATERIAL AND METHODS

Plant material and culture conditions

The *srk2e* (Yoshida et al., 2002) mutant carries a T-DNA insertion in the first intron of *OST1* gene and is derived from the *Arabidopsis thaliana* accession Columbia (Col). *srk2e* seeds were kindly provided by Dr Kazuo Shinozaki. Plants were grown routinely in a greenhouse (22°C with a 16 h light period) on soil irrigated with mineral nutrients. Transgenic plants used for immunoprecipitation of fusion proteins were grown *in vitro* in ½ MS liquid medium (Murashige and Skoog Basal Salt Mixture, Sigma) supplemented with 0.5 % sucrose, 0.5 g.L⁻¹ MES and B5 vitamins, on an orbital shaker (110 rpm) at 21°C with a 16 h light period.

Isolation and ABA treatment of guard cell protoplasts

Guard cell protoplasts (GCPs) were prepared essentially as reported (Pandey et al., 2002). GCPs were then washed twice in 0.35 M mannitol, 10 mM KCl, and 1 mM Mes-

Supplemental table 1. Identification of phosphorylation sites for recombinant OST1

Mass differences expressed in ppm (third and fourth column from left) refer to theoretical values of monoisotopic ions of phosphorylated species. For the [175-190] peptide stretch, phosphorylation of ^{179}T was ruled out by b and y ions from the corresponding MS/MS spectrum.

Sequence	Phosphorylated residues	LC-ESI-MS Mass difference (ppm)	MALDI-MS Mass difference (ppm)	MALDI-MS/MS (- H_3PO_4 ion) Mass difference (ppm)
$^{(-36)}\text{GHHHHHHHHHHSSGHI EGR}^{(-18)}$	$^{(-25)}\text{S}$ or $^{(-24)}\text{S}$		2	17
$^{(-36)}\text{GHHHHHHHHHHSSGHI EGR}^{(-18)}$	$^{(-25)}\text{S}$ and $^{(-24)}\text{S}$		19	14
$^{(-17)}\text{HMLEDHQTSLYKK}^{(-5)}$	$^{(-10)}\text{T}$ or $^{(-9)}\text{S}$		5	20
$^{(-17)}\text{HMLEDHQTSLYKK}^{(-5)}$	$^{(-10)}\text{T}$ and $^{(-9)}\text{S}$		24	
$^{(-3)}\text{AGFPDRPAVSGPMDLPIMHDSDR}^{20}$	^7S or ^{18}S		9	17
$^{(-3)}\text{AGFPDRPAVSGPMDLPIMHDSDRYELVK}^{25}$	^7S or ^{18}S	5	1	11
$^{(-3)}\text{AGFPDRPAVSGPMDLPIMHDSDRYELVK}^{25}$	^7S and ^{18}S		13	19
$^{26}\text{DIGSGNFGVAR}^{36}$	^{29}S		18	10
$^{40}\text{DKQSNELVAVK}^{50}$	^{43}S	2		
$^{175}\text{STVGTPAYIAPEVLLK}^{190}$	^{175}S or ^{176}T	4		
$^{166}\text{SSVLHSQPKSTVGTPAYIAPEVLLK}^{190}$	^{175}S or ^{176}T	7	8	21

NaOH, pH 6.1, and incubated in the same solution with ABA or its solvent ethanol as control. Then, GCPs were collected by centrifugation (20,000 g, 2 minutes), frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Construction of entry vectors

The *OST1* cDNA was amplified by PCR from a pBS-OST1 (Mustilli et al., 2002) vector using high fidelity polymerase and oligonucleotides GWOST1-F and GWOST1-R (Supplemental table 2). A BP Gateway™ recombination was performed with the pDONR201 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) as described in the manufacturer's instructions. The same method was used to generate entry clones for truncated versions using 5' primer GWOST1-F and 3' primers GWOST1ΔC-R, 3'GWOST1/G302, 3'GWOST1/A320, 3'GWOST1/G331, 3'GWOST1/D348 (Supplemental table 2) for OST1ΔC, OST1/G302, OST1/A320, OST1/G331 and OST1/D348 versions, respectively. Point-mutations were generated directly in the OST1 entry vector, using the QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) according to the manufacturer's instructions using mutagenic oligonucleotides (Supplemental table 2). All entry clones were sequenced and displayed only the introduced mutation.

Expression in *E.coli* and native purification

OST1 variants were introduced using the LR recombination in a pET16b (Novagen, Madison, WI, USA) modified to Gateway™ destination vector (Invitrogen). This modification was made by insertion of an RfC cassette (Invitrogen) into a blunt ended BamH1 site. The recombined expression vectors were introduced into the *E.coli* Rosetta(DE3)pLysS strain (Novagen). Bacteria were grown to OD 0.6 and 0.4 mM IPTG was added to induce the production of 10xHis-tagged proteins during 3 hours at 25°C. Cells were collected by centrifugation and then lysed in the lysis buffer using both 1 mg mL⁻¹ lysozyme and sonication. After DNase 1 (5 μg mL⁻¹) and RNase A (10 μg mL⁻¹) treatment, a second centrifugation was performed to remove the insoluble fraction. Native purification was performed using Ni-NTA resin (Qiagen, Hilden, Germany) in columns according to the manufacturer's instructions. Buffers were composed of 50 mM Na₂HPO₄ and 300 mM NaCl (pH 7.5) with 20 mM, 50 mM and 1 M imidazole respectively for lysis, wash and elution buffers. Proteins were concentrated and dialysed using Vivaspin 2mL concentrators with 10,000 Da cut-off (Vivascience, Hannover, Germany) and finally stored at -20°C in a 50 mM Na₂HPO₄, 55% (v/v) glycerol buffer.

Supplemental table 2. *Sequence of oligonucleotides used for generation of entry vectors*

Name	Sequence (5' to 3')
GWOST1-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCCCGGATCGACCAGCAGTG
GWOST1-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCATTGCGTACACAATCTC
GWOST1ΔC-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAATCTTTAGAAACCATTTCAT
3' GWOST1/G302	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCTAGCCCGGTTGATCCGATTCAT
3' GWOST1/A320	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCTATGCAGGAGGAACAGTTGCTT
3' GWOST1/G331	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCTATCCTGTGAGGTAATGGTTCA
3' GWOST1/D348	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCTAATCAAGGTCGCTCTCTAAGT
S7A-F	ATCGACCAGCAGTGGCTGGTCCAATGGATTTG
S7A-R	CAAATCCATTGGACCAGCCACTGCTGGTTCGAT
S7D-F	ATCGACCAGCAGTGGATGGTCCAATGGATTTG
S7D-R	CAAATCCATTGGACCATCCACTGCTGGTTCGAT
S18A-F	CGATTATGCACGATGCTGATAGGTATGAAC
S18A-R	GTTTCATACCTATCAGCATCGTGCATAATCG
S18D-F	CGATTATGCACGATGATGATAGGTATGAAC
S18D-R	GTTTCATACCTATCATCATCGTGCATAATCG
S29A-F	TCAAGGATATTGGCGCCGGTAATTTTGGAGT
S29A-R	ACTCCAAAATTACCGGCGCCAATATCCTTGA
S29D-F	TCAAGGATATTGGCGACGGTAATTTTGGAGT
S29D-R	ACTCCAAAATTACCGTTCGCCAATATCCTTGA
S43A-F	TGAGAGACAAGCAAGCTAATGAGCTTGTTGCT
S43A-R	AGCAACAAGCTCATTAGCTTGCTTGCTCTCA
S43D-F	TGAGAGACAAGCAAGATAATGAGCTTGTTGCT
S43D-R	AGCAACAAGCTCATTATCTTGCTTGCTCTCA
S175A-F	CATTTCGCAACCAAAAAGCAACTGTTGGAACCTCCTGCTTACATCGC
S175A-R	GCGATGTAAGCAGGAGTTCCAACAGTTGCTTTTGGTTGCGAATG
S175D-F	CATTTCGCAACCAAAAAGATACTGTTGGAACCTCCTGCTTACATCGC
S175D-R	GCGATGTAAGCAGGAGTTCCAACAGTATCTTTTGGTTGCGAATG
T176A-F	CATTTCGCAACCAAAAATCAGCTGTTGGAACCTCCTGCTTACATCGC
T176A-R	GCGATGTAAGCAGGAGTTCCAACAGCTGATTTTGGTTGCGAATG
T176D-F	CATTTCGCAACCAAAAATCAGATGTTGGAACCTCCTGCTTACATCGC
T176D-R	GCGATGTAAGCAGGAGTTCCAACATCTGATTTTGGTTGCGAATG

Antibody production

In order to detect and immunoprecipitate OST1 from wild-type plants, we produced an OST1-specific antibody (OST1^N) against a synthetic peptide corresponding to the N-terminus of the protein (MDRPAVSGPMDLC). Polyclonal antiserum was raised in rabbit (Eurogentec, Liege, Belgium).

Immunoprecipitation (IP) of endogenous or transgenic proteins from plants

Whole plants were grinded using a Mixer Mill MM 301 (Retsch, Haan, Germany). Proteins were extracted in an IP buffer: 20 mM Hepes (pH 7.5), 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 4 mM DTT, 10 mM NaF, 50 mM β -glycerophosphate, 0.1 mM *ortho*-vanadate, 1X Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Indianapolis, IN, USA), 200 mM NaCl, 0.5% (v/v) Triton X-100, 0.5% (v/v) NP40. After centrifugation (4°C, 15 minutes, 14000 rpm), the supernatant was isolated and 500 μ L (2 μ g. μ L⁻¹ proteins) were incubated during 30 minutes with in IP buffer (Sigma). After centrifugation, the flow-through was saved and incubated 1 hour with 1.5 μ L of monoclonal anti-HA antibody (Sigma) or 2 μ L of OST1^N serum, followed by a 20 minutes incubation with 30 μ L of protein A-sepharose 50% slurry. This slurry was washed three times in 1 mL IP buffer and 3 times in 1 mL kinase (see below - Figures I.6 and I.9) or phosphatase buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM MgCl₂, 1X Protease Inhibitor Cocktail – Roche – Figure I.2). ProteinA-sepharose was finally resuspended adding 25 μ L of the same buffer.

For phosphatase treatment of immunoprecipitated proteins, 30 μ L of this suspension were incubated at 37°C during 16 hours with 10 units of Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA).

Mass spectrometry analyses

Full length proteins were analysed by MALDI-MS (Reflex III, Bruker) in the linear mode using sinapinic acid as a matrix and bovine serum albumin for external calibration (singly and doubly charged species).

ESI mass spectrometry (Q-ToF micro, Waters) of OST1 isoforms was achieved by after on-line fast desalting on a C18 column, (300 μ m i.d.). Multiply charged species of horse heart myoglobin were used for external mass calibration.

Nano LC-ESI-MS/MS spectra of tryptic peptides were acquired with a Q-ToF micro (Waters) instrument interfaced to a CapLC chromatographic system using a C18 column, 75

μm i.d. (Waters). Accurate mass analysis was obtained by means of singly and doubly charged ion species of reference peptides as lock masses (Lockspray system, Waters).

MALDI-MS and -MS/MS data were acquired with a Q-ToF Ultima mass spectrometer (Waters). The matrix was alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid. Monoisotopic masses were corrected by using the pseudo-molecular ion of GluFibrinopeptide as a lock mass. Peptide ions found with masses in excess of 79.97 Da or multiples of this value relative to theoretical masses were selected for MS/MS analysis and searched for neutral loss of phosphoric acid (97.977 Da).

***In vitro* kinase assays**

Phosphorylation assays on recombinant proteins were performed by incubation for 45 minutes at room temperature of 100 ng kinase and 200 ng histone III-S substrate (Sigma, Saint-Louis, MI, USA) in 12.5 μL of 20 mM Hepes (pH 7.5), 0.5% (v/v) Triton X-100, 2 mM MnCl_2 , 1X Protease Inhibitor Cocktail (Roche), 10 mM NaF, 5 mM β -glycerophosphate with 5 μCi of $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ (3,000 Ci mmol^{-1}). Reaction was stopped by adding 12.5 μL Laemmli 2X (Laemmli, 1970) supplemented with 100 mM EDTA and heating at 95 $^\circ\text{C}$ for 5 minutes. Phosphorylation assays on immunoprecipitated proteins were performed in the same conditions using 15 μL of protein A-sepharose slurry in a final reaction volume of 25 μL .

Proteins were separated by SDS-PAGE using a 10 % (w/v) acrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane. Radioactivity was detected on the dried membranes using a Storm imaging system (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). The same membrane was used, after scanning, for immunodetection of recombinant proteins (see below). Quantification of the activity was performed using the public domain image-analysis program ImageJ version 1.32j (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Radioactive bands were quantified using the "plot lanes" function on the image of the scan and data were normalized using the level of recombinant kinases quantified by the same method on immunoblot images.

In-gel kinase assay

Protein extraction and in-gel protein kinase assay were performed as described (Droillard et al., 2000). Protein extracts (20 μg) were separated by SDS-PAGE using a 10% (w/v) acrylamide gel embedded with 0.5 mg mL^{-1} Histone III-S (Sigma) as substrate. After renaturation, kinase activity was assayed in 40 mM Hepes, pH 7.5, 2 mM DTT, 5 mM MnCl_2 , 2 mM EGTA, 0.1 mM *ortho*-vanadate, 25 μM cold ATP and 80 μCi $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ per gel. After an extensive wash in 5% (w/v) TCA and 1% (w/v) disodium-pyrophosphate solution,

gels were dried on Whatman 3MM paper and analysed using a Storm imager (Molecular Dynamics).

Generation of transgenic lines

The *OST1* promoter excised from the *pOST1::GUS* vector (Mustilli et al., 2002) was cloned in a pBluescript vector upstream a triple hemagglutinin (HA) tag followed by a NOS terminator excised from *pFP101* (Bensmihen et al., 2004). This combination was then transferred into the *pFP100* plasmid carrying *Pro_{At2S3}:GFP* selection marker (Bensmihen et al., 2004). The RfA cassette (Invitrogen) was introduced in 3' of the 3xHA tag to generate a destination vector we named *p\$POHA*. Expression vectors were obtained by LR recombination between entry vectors and *p\$POHA* according to Invitrogen's instructions. Transformation was performed by floral dip using the AGL.0 *Agrobacterium tumefaciens* strain (Lazo et al., 1991). Seeds were selected using a Leica MZFLIII epifluorescence stereomicroscope with excitation at 470 nm and emission band pass (525 ± 50 nm) filter.

Histochemical GUS staining

A transcriptional fusion between *OST1* promoter and *uidA* was generated by recombination of the *pENTRTM-gus* vector (Invitrogen) with our *p\$POHA* vector. We performed β-glucuronidase histochemical staining on five *srk2e / Pro_{OST1}:3xHA-gus* lines as described (Jefferson et al., 1987).

Infrared thermography complementation assays

Thermal imaging was performed on leaves 5 to 10 minutes after they were detached from 3 week old plants grown in the greenhouse. The Col and *srk2e* controls were present on each image with transgenic lines (3 to 4 leaves from independent plants for each line). Images were obtained using a Thermacam PM250 infrared camera (Inframetrics, North Billerica, MA, USA), saved on a PCMCIA memory card and analysed using the public domain image-analysis program ImageJ version 1.32j (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) as described formerly (Merlot et al., 2002). First, false colour scale was calibrated using the defined temperature range. Then, the complete surface of the different leaves of one line was selected and the average temperature was calculated applying the calibration line on all pixels of this surface.

Immunoblot analyses

Triple-HA tagged proteins extracted from plants were separated by SDS-PAGE using a 10% (w/v) acrylamide gel, transferred on nitrocellulose membranes and detected by monoclonal anti-HA antibody (1:10,000 – Sigma) and 10xHis tagged recombinant proteins used for *in vitro* kinase assays were detected by monoclonal anti-His antibody (1:10,000 – Sigma). Then they were revealed by a horseradish peroxidase conjugated anti-mouse IgG (1:10,000 – Sigma) or anti-rabbit IgG (1:10,000) using the chemiluminescence ECL plus kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England). All Western blot analyses were performed as described (Sambrook et al., 1989) with 0.3% (v/v) Tween 20 and 0.5% (w/v) fat free milk powder in all incubation buffers. Quantification was performed as described for *in vitro* kinase assays.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Drs J. Coffey, D. Uria and N. Tomczyk (Waters) for MS experiments performed with OST1 isoforms. We thank Marie-Ange Badet-Denisot for her help with the circular dichroism technique. We thank Helen North, Thierry Gaude, Thierry Meinel and Sylvain Merlot for helpful discussions, and Daniel Couch for his critical reading of the manuscript.

LITERATURE CITED

- Adams JA** (2003) Activation loop phosphorylation and catalysis in protein kinases: is there functional evidence for the autoinhibitor model? *Biochemistry* **42**: 601-607
- Anderberg RJ, Walker-Simmons MK** (1992) Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid-inducible transcript with homology to protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 10183-10187
- Bensmihen S, To A, Lambert G, Kroj T, Giraudat J, Parcy F** (2004) Analysis of an activated ABI5 allele using a new selection method for transgenic Arabidopsis seeds. *FEBS Lett* **561**: 127-131
- Boudsocq M, Barbier-Brygoo H, Lauriere C** (2004) Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* **279**: 41758-41766
- Droillard MJ, Thibivilliers S, Cazale AC, Barbier-Brygoo H, Lauriere C** (2000) Protein kinases induced by osmotic stresses and elicitor molecules in tobacco cell suspensions: two crossroad MAP kinases and one osmoregulation-specific protein kinase. *FEBS Lett* **474**: 217-222
- Furihata T, Maruyama K, Fujita Y, Umezawa T, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2006) Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 1988-1993
- Gomez-Cadenas A, Verhey SD, Holappa LD, Shen Q, Ho TH, Walker-Simmons MK** (1999) An abscisic acid-induced protein kinase, PKABA1, mediates abscisic acid-suppressed gene expression in barley aleurone layers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 1767-1772
- Guo Y, Halfter U, Ishitani M, Zhu JK** (2001) Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell* **13**: 1383-1400
- Hetherington AM** (2001) Guard cell signaling. *Cell* **107**: 711-714
- Himmelbach A, Yang Y, Grill E** (2003) Relay and control of abscisic acid signaling. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 470-479
- Hotta H, Aoki N, Matsuda T, Adachi T** (1998) Molecular analysis of a novel protein kinase in maturing rice seed. *Gene* **213**: 47-54

- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW** (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *Embo J* **6**: 3901-3907
- Johnson LN, Noble ME, Owen DJ** (1996) Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* **85**: 149-158
- Johnson RR, Wagner RL, Verhey SD, Walker-Simmons MK** (2002) The abscisic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific abscisic acid response element-binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences. *Plant Physiol* **130**: 837-846
- Kagaya Y, Hobo T, Murata M, Ban A, Hattori T** (2002) Abscisic acid-induced transcription is mediated by phosphorylation of an abscisic acid response element binding factor, TRAB1. *Plant Cell* **14**: 3177-3189
- Kelner A, Pekala I, Kaczanowski S, Muszynska G, Hardie DG, Dobrowolska G** (2004) Biochemical characterization of the tobacco 42-kD protein kinase activated by osmotic stress. *Plant Physiol* **136**: 3255-3265
- Kobayashi Y, Yamamoto S, Minami H, Kagaya Y, Hattori T** (2004) Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. *Plant Cell* **16**: 1163-1177
- Koornneef M, Reuling G, Karssen CM** (1984) The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* **61**: 377-383
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA** (1991) A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology (N Y)* **9**: 963-967
- Leung J, Bouvier-Durand M, Morris PC, Guerrier D, Cheddor F, Giraudat J** (1994) *Arabidopsis* ABA response gene *ABI1*: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* **264**: 1448-1452
- Li J, Kinoshita T, Pandey S, Ng CK, Gygi SP, Shimazaki K, Assmann SM** (2002) Modulation of an RNA-binding protein by abscisic-acid-activated protein kinase. *Nature* **418**: 793-797
- Li J, Wang XQ, Watson MB, Assmann SM** (2000) Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science* **287**: 300-303

- Merlot S, Mustilli AC, Genty B, North H, Lefebvre V, Sotta B, Vavasseur A, Giraudat J** (2002) Use of infrared thermal imaging to isolate *Arabidopsis* mutants defective in stomatal regulation. *Plant J* **30**: 601-609
- Meyer K, Leube MP, Grill E** (1994) A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **264**: 1452-1455
- Mustilli AC, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F, Giraudat J** (2002) *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* **14**: 3089-3099
- Pandey S, Wang XQ, Coursol SA, Assmann SM** (2002) Preparation and applications of *Arabidopsis thaliana* guard cell protoplasts. *New Phytol* **153**: 517-526
- Razem FA, El-Kereamy A, Abrams SR, Hill RD** (2006) The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* **439**: 290-294
- Roelfsema MR, Hedrich R** (2005) In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. *New Phytol* **167**: 665-691
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular Cloning : a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Schroeder JI, Kwak JM, Allen GJ** (2001) Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature* **410**: 327-330
- Tardieu F, Zhang J, Katerji N, Bethenod O, Palmer S, Davies WJ** (1992) Xylem ABA controls the stomatal conductance of field-grown maize subjected to soil compaction or soil drying. *Plant Cell Environ* **15**: 193-197
- Yoon HW, Kim MC, Shin PG, Kim JS, Kim CY, Lee SY, Hwang I, Bahk JD, Hong JC, Han C, Cho MJ** (1997) Differential expression of two functional serine/threonine protein kinases from soybean that have an unusual acidic domain at the carboxy terminus. *Mol Gen Genet* **255**: 359-371
- Yoshida R, Hobo T, Ichimura K, Mizoguchi T, Takahashi F, Alonso J, Ecker JR, Shinozaki K** (2002) ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **43**: 1473-1483
- Yoshida R, Umezawa T, Mizoguchi T, Takahashi S, Takahashi F, Shinozaki K** (2006) The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **281**: 5310-5318

II. DANS LES COULISSES DE L'ANALYSE FONCTIONNELLE DE OST1

Dans ce manuscrit, nous définissons avec précision deux types de motifs, impliqués respectivement dans l'activité kinase de la protéine et dans sa fonction au sein de la cellule de garde en réponse à l'ABA.

Une des approches clés qui m'a permis de réaliser ce travail est la purification chez *E.coli* d'une protéine kinase SnRK2 recombinante active. Les tentatives rapportées jusqu'à ce jour n'avaient pas permis de réaliser cette purification avec succès. Dans le second chapitre de cette thèse, je décrirai donc les travaux préparatoires qui ont abouti à la mise au point de protocoles de purification et de tests d'activité optimaux. De plus, je présenterai quelques caractéristiques supplémentaires de l'activité de la protéine OST1 recombinante et montrerai que cette activité enzymatique n'est pas directement modulée par l'ABA. Elle n'est pas non plus sensible au pH ou au calcium, deux seconds messagers importants dans la voie de signalisation de l'ABA. L'autre approche clé ayant permis la caractérisation fonctionnelle des différents motifs étudiés est la stratégie de complémentation de mutants *ost1* par la réintroduction de versions mutées ou tronquées de OST1. Dans l'introduction, j'ai présenté l'isolement, au sein du laboratoire, d'un allèle fortement affecté dans les réponses stomatiques à l'ABA, *ost1-2*. Je décrirai dans le troisième chapitre de cette thèse les difficultés rencontrées lors de la complémentation de l'allèle *ost1-2*. Ces difficultés m'ont amené à réaliser une comparaison détaillée des différents allèles de *ost1* et à finalement choisir l'allèle *srk2e*.

Le quatrième chapitre de cette thèse sera consacré à des résultats complémentaires sur les mécanismes de régulation de la protéine OST1. Tout d'abord, j'ai pu montrer que la PP2C HAB1, contrairement à ABI1, ne semble pas impliquée dans la régulation de l'activité de OST1 en réponse à l'ABA. D'autre part, la caractérisation par western-blot des lignées transgéniques obtenues a suggéré une possible régulation de la quantité de protéine OST1 en réponse à l'ABA. Je présenterai les arguments en faveur d'une telle hypothèse et les résultats qui montrent que cette régulation n'a pas lieu dans la cellule de garde. Enfin, dans le cinquième et dernier chapitre, je présenterai d'une part la caractérisation de l'expression des différents SnRK2 et d'autre part les résultats des analyses d'homologie fonctionnelle entre les SnRK2 réalisées grâce à des tests de complémentation du mutant *srk2e* par différentes SnRK2. Ce chapitre a pour but d'analyser la possible redondance de OST1 avec d'autres SnRK2.

L'ensemble de ces résultats nous permettra de discuter avec plus de précisions la fonction de OST1 dans la voie de transduction du signal ABA dans la plante.

CHAPITRE II :

PRODUCTION, PURIFICATION

ET ACTIVITE *IN VITRO* DES

PROTEINES OST1 RECOMBINANTES

Ce chapitre est consacré à la caractérisation de l'activité *in vitro* des protéines OST1 recombinantes. Dans la première partie, je détaillerai les travaux d'optimisation de la production et de la purification des protéines recombinantes natives à partir d'*E.coli*. Je présenterai également les études de dichroïsme circulaire qui nous ont permis de tester l'intégrité structurale des protéines ainsi purifiées. Dans une seconde partie, je montrerai comment j'ai optimisé les tests d'activité *in vitro* de ces kinases en me basant sur les principales caractéristiques de l'activité de OST1 et je présenterai l'influence de l'ABA, du pH et du calcium sur l'activité kinase *in vitro* de la protéine OST1 recombinante.

I. OBTENTION DE PROTEINES RECOMBINANTES NATIVES ET STRUCTUREES

1. Un système permettant de produire abondamment OST1 sous forme soluble

Les précédentes tentatives de production de protéines SnRK2 recombinantes chez *E.coli* n'ayant jamais abouti à des protéines actives (Yoon et al., 1997; Li et al., 2000; Johnson et al., 2002; Mustilli et al., 2002; Kelner et al., 2004), le choix du système de production a fait l'objet d'un soin particulier. J'ai choisi de produire des protéines de fusion avec une étiquette 10xHis à l'extrémité amino-terminale grâce à une version Gateway™ du vecteur pET16b présentée en annexe 1 dans des bactéries *E.coli* de souche Rosetta(DE3)pLysS. Le système Gateway™ permet d'introduire rapidement dans le vecteur de destination, grâce à des recombinaisons *in vitro*, les différentes versions de OST1 à partir de vecteurs d'entrée qui seront également utilisés pour l'obtention de vecteurs d'expression binaires. La souche Rosetta(DE3)pLysS présente deux avantages majeurs pour la production de OST1. Tout d'abord elle possède le plasmide pRARE qui code des ARNt pour 6 codons rares dans les bactéries et présents à 41 reprises dans la protéine OST1 (11% des codons). De plus, elle possède le plasmide pLysS qui code le lysozyme T7 permettant de réduire le niveau basal de production et donc de s'affranchir de tout problème de toxicité qui pourrait être associé à la production de OST1. Cette souche nous a permis de produire des quantités importantes de protéines recombinantes entières ou tronquées en 3 heures après induction par l'IPTG à 25°C (figure II.1).

Sur la figure II.1A, nous pouvons observer qu'après induction par IPTG, le système utilisé permet d'obtenir des protéines recombinantes entières en grande partie solubles. En effet, OST1 se retrouve majoritairement dans le surnageant du lysat obtenu par sonication des cellules. Ceci nous a permis d'en purifier de grandes quantités (entre 10 et 20 mg). Cependant,

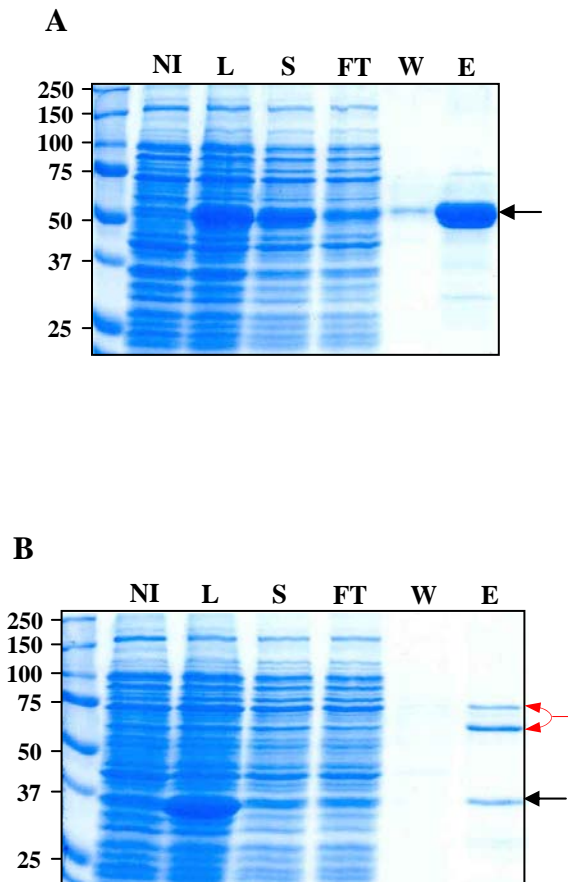


Figure II.1 : Purification des protéines recombinantes étiquetées 10xhistidines

A. Purification de la version entière 10xHis-OST1. **B.** Purification de la version tronquée 10xHis-OST1 Δ 280. NI : lysat de cultures d'*E.coli* non induites; L : lysat de cultures d'*E. coli* après 3h d'induction par l'IPTG (A : 400 μ M, B : 100 μ M) à 25°C; S : fraction soluble du lysat; FT : fraction non retenue sur la colonne de Ni-NTA; W : tampon de lavage après passage sur la colonne; E : élution. NI, L, S, FT et W : dépôt 1/2000 des fractions totales; E : dépôt 1/200 de l'élution totale. Les flèches noires représentent les bandes correspondant aux protéines recombinantes et les flèches rouges correspondent aux protéines contaminantes majoritaires. L'échelle de taille est donnée en kDa.

j'ai rencontré des difficultés de solubilité des versions tronquées à l'extrémité C-terminale. Lors des premières purifications, je n'obtenais quasiment pas de protéine OST1 et j'ai dû optimiser les conditions de production afin d'augmenter la solubilité de ces versions. Plusieurs tentatives de production à différentes températures (30°C, 27°C, 21°C) ou en présence d'éthanol (3%) n'ont pas permis d'améliorer la solubilité. En revanche, une réduction de la concentration en IPTG à 100 μ M (contre 400 μ M pour les versions entières) a permis la production d'une fraction suffisante des protéines dans le surnageant en contrepartie d'une diminution du rendement (figure II.1B).

2. Purification des protéines recombinantes

J'ai purifié les protéines recombinantes grâce à l'étiquette 10xHis qui m'a permis de les fixer à une résine de nickel avant de les éluer par compétition avec l'imidazole. Lors des premières tentatives, j'ai utilisé les concentrations en imidazole préconisées par le fournisseur de 10, 20 et 250 mM respectivement pour les étapes de fixation, lavages et éluions. Ces conditions n'ont pas permis d'éluer la totalité des protéines fixées à la résine et j'ai observé une contamination importante, notamment dans le cas des versions tronquées. Les protéines recombinantes étant fortement accrochées à la résine, j'ai décidé d'augmenter les concentrations en imidazole à, respectivement, 20 mM et 50 mM lors des étapes de fixation et de lavages afin d'éliminer une plus grande partie des contaminants. De plus, j'ai réalisé des éluions à une concentration en imidazole de 1M afin d'éluer la totalité des protéines. Le résultat de ces éluions est présenté sur les gels de la figure II.1. Pour les versions entières, la protéine recombinante, totalement éluee de la colonne, est largement majoritaire (>95%) et les contaminants ne sont présents qu'à l'état de traces. En revanche, deux bandes contaminantes majoritaires sont éluees avec la version tronquée OST1 Δ 280 qui ne représente que 30% environ des protéines de la fraction. La purification de la version OST1 Δ 302 présente également une contamination mais elle est moins importante (~65%). Les autres versions tronquées sont d'une pureté comparable aux versions entières. Les protéines recombinantes ainsi purifiées ont été dialysées contre un tampon phosphate 50 mM pour éliminer les sels et l'imidazole, et conservées à -20°C dans 55% glycérrol durant toute la durée de ma thèse sans dégradation observable.

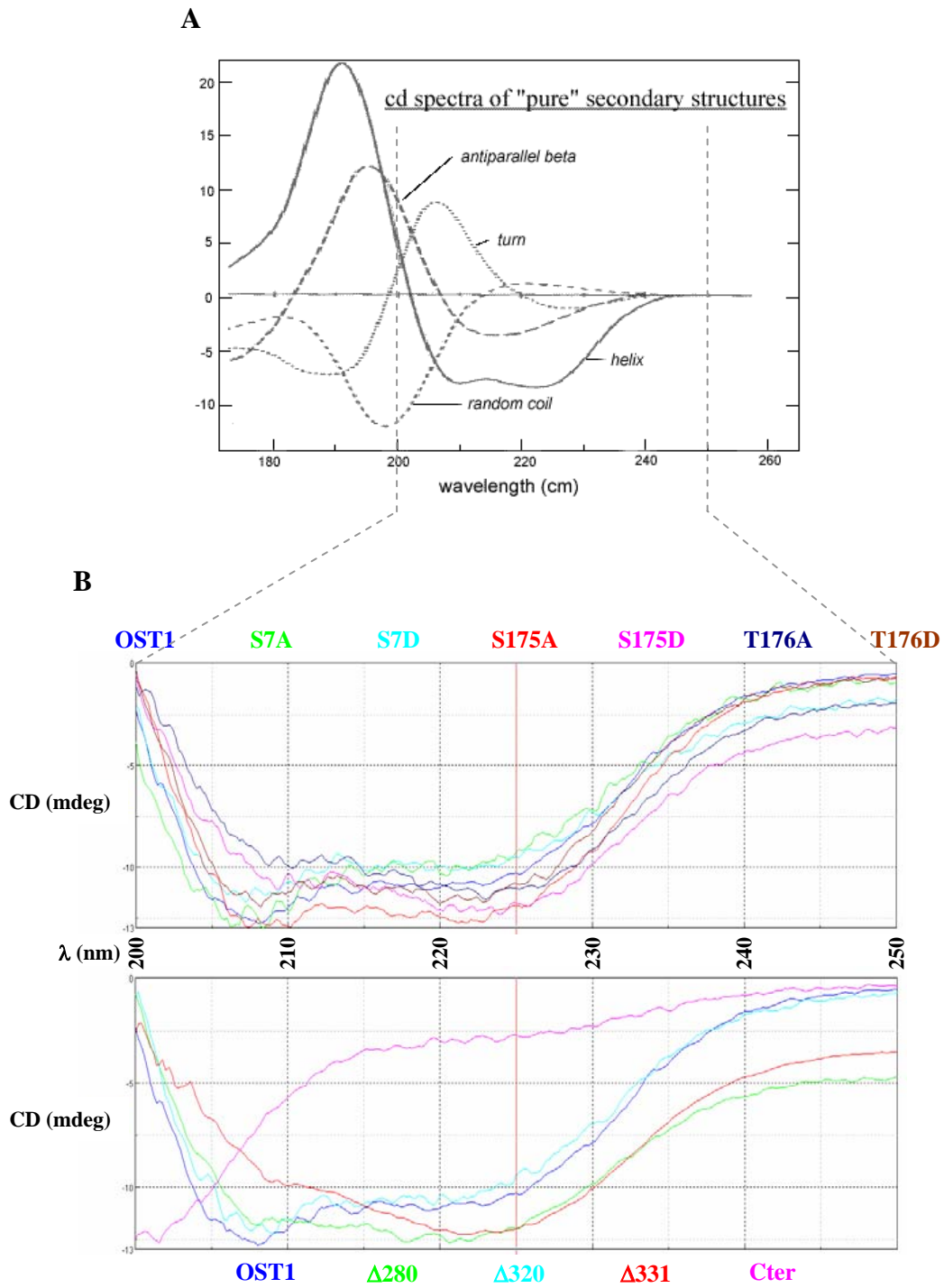


Figure II.2 : Analyse des protéines recombinantes par dichroïsme circulaire (D.C.)

A. Spectres théoriques des différentes structures secondaires (Brahms and Brahms, 1980). **B.** Spectres de D.C. en UV lointain des différentes versions mutées (haut) ou tronquées (bas) de la protéine recombinante 10xHis-OST1. Cter = domaine carboxy-terminal seul fusionné à l'étiquette 10xHis.

3. Vérification de la structure des protéines purifiées

Certaines des protéines recombinantes testées dans le premier chapitre sont inactives *in vitro*. Lorsqu'une protéine recombinante mutante est inactive, on peut se demander si c'est un effet spécifique de la mutation ou si c'est un effet indirect associé à une perturbation de la structure secondaire ou tertiaire de la protéine.

La technique de dichroïsme circulaire (DC) permet d'identifier des différences de structures secondaires et tertiaires entre plusieurs protéines (Brahms and Brahms, 1980; Kelly et al., 2005). Cette technique est basée sur le fait qu'une protéine possède une activité optique : elle est capable d'absorber de manière différente les lumières polarisées circulairement à droite et à gauche. Cette activité optique est modifiée lorsque la structure secondaire ou tertiaire de la protéine est altérée. D'une part, les chaînes latérales des acides aminés aromatiques et les ponts disulfures génèrent une activité optique dans le domaine de l'UV proche (250 – 300 nm). Le spectre de DC dans ce domaine est donc caractéristique de la structure tridimensionnelle de la protéine. D'autre part, les liaisons peptidiques génèrent une activité optique entre 180 et 240 nm. Cette activité est modulée en fonction des angles entre un acide aminé et son voisin, eux-mêmes corrélés aux différents types de structures secondaires (hélice α , feuillets β , etc...). Cela donne à chaque structure secondaire un spectre caractéristique de DC dans le domaine de l'UV lointain (figure II.2A). Le spectre de DC d'une protéine dans ce domaine est donc caractéristique des structures secondaires présentes.

La figure II.2B présente les spectres de DC en UV lointain de plusieurs versions mutées ou tronquées recombinantes. La comparaison du spectre de OST1 avec les spectres caractéristiques des différentes structures secondaires nous permet de conclure à une forte prédominance d'hélices α dans la protéine OST1, ce qui correspond bien à ce qui est connu pour les protéines kinases (Hanks and Hunter, 1995) et à ce qui est prédit pour OST1 (figure II.3). Il n'y a aucune différence notable entre les spectres de OST1 et de ses mutants ponctuels (spectres du haut), ce qui peut s'expliquer par la position des mutations dans des régions non structurées d'après les prédictions de structure secondaire (figure II.3). En ce qui concerne les versions tronquées, elles ont le même profil général que OST1 mais certaines présentent des petites différences avec le spectre de OST1 (spectres du bas). Ces petites différences peuvent en partie s'expliquer, d'une part, par la faible concentration des échantillons correspondants qui induit une perte de sensibilité de la technique, et d'autre part par la contamination de certains échantillons par d'autres protéines (OST1 Δ 280 notamment). De plus, il est logique que les versions tronquées n'aient pas tout à fait la même structure secondaire du fait de la

perte d'une partie plus ou moins longue de l'extrémité C-terminale. En revanche, nous voyons que le spectre du domaine C-terminal seul correspond à un spectre moyen entre les spectres caractéristiques de motifs non structurés et d'hélices α , en accord avec les prédictions bioinformatiques qui suggèrent la présence de deux hélices α et d'une forte proportion de régions non structurées dans ce domaine (figure II.3). Les versions non représentées sur la figure ont également été étudiées et présentent le même profil, à l'exception des versions OST1 Δ 302 et OST1 Δ 348 pour lesquelles je n'avais pas une concentration suffisante pour cette analyse. Nous pouvons en déduire que les mutations ponctuelles et les délétions réalisées n'ont aucune conséquence sur la structure secondaire des protéines recombinantes.

Malheureusement, nous n'avons pas pu réaliser les mesures de DC dans le domaine de l'UV proche car elles nécessitent des quantités de protéines bien supérieures. Nous ne pouvons donc pas conclure quant à la conservation d'un bon repliement tridimensionnel dans les différentes versions.

II. ACTIVITE KINASE *IN VITRO* DE LA PROTEINE OST1 RECOMBINANTE

1. Mise au point des tests d'activité

J'ai effectué les premiers tests d'activité kinase *in vitro* en gel, en incorporant de l'histone dans le gel en tant que substrat. Cette technique m'a permis de révéler l'activité de la protéine OST1 recombinante mais plusieurs raisons m'ont poussé à me tourner vers des tests d'activité en tubes. En effet, les tests d'activité en gel sont longs et nécessitent des quantités d'ATP radioactif importantes. De plus, ils sont moins sensibles et ne permettent pas de discriminer la phosphorylation du substrat de l'autophosphorylation. La figure II.4A montre que les tests d'activité en tubes nous ont permis de révéler l'autophosphorylation de la protéine recombinante OST1 (PR) et de révéler une activité résiduelle des versions S175A, S175D et T176D, indétectable dans les activités en gel.

Nous avons par ailleurs testé différents substrats génériques des kinases. La figure II.4B nous montre que la MBP (myeelin basic protein) comme l'histone sont efficacement phosphorylées par OST1. D'autre part, nous observons sur la même figure que la version inactive OST1 Δ 280 est phosphorylée par la protéine OST1 entière. Ce résultat suggère que l'autophosphorylation observée pour la protéine OST1 peut mettre en jeu un mécanisme intermoléculaire.

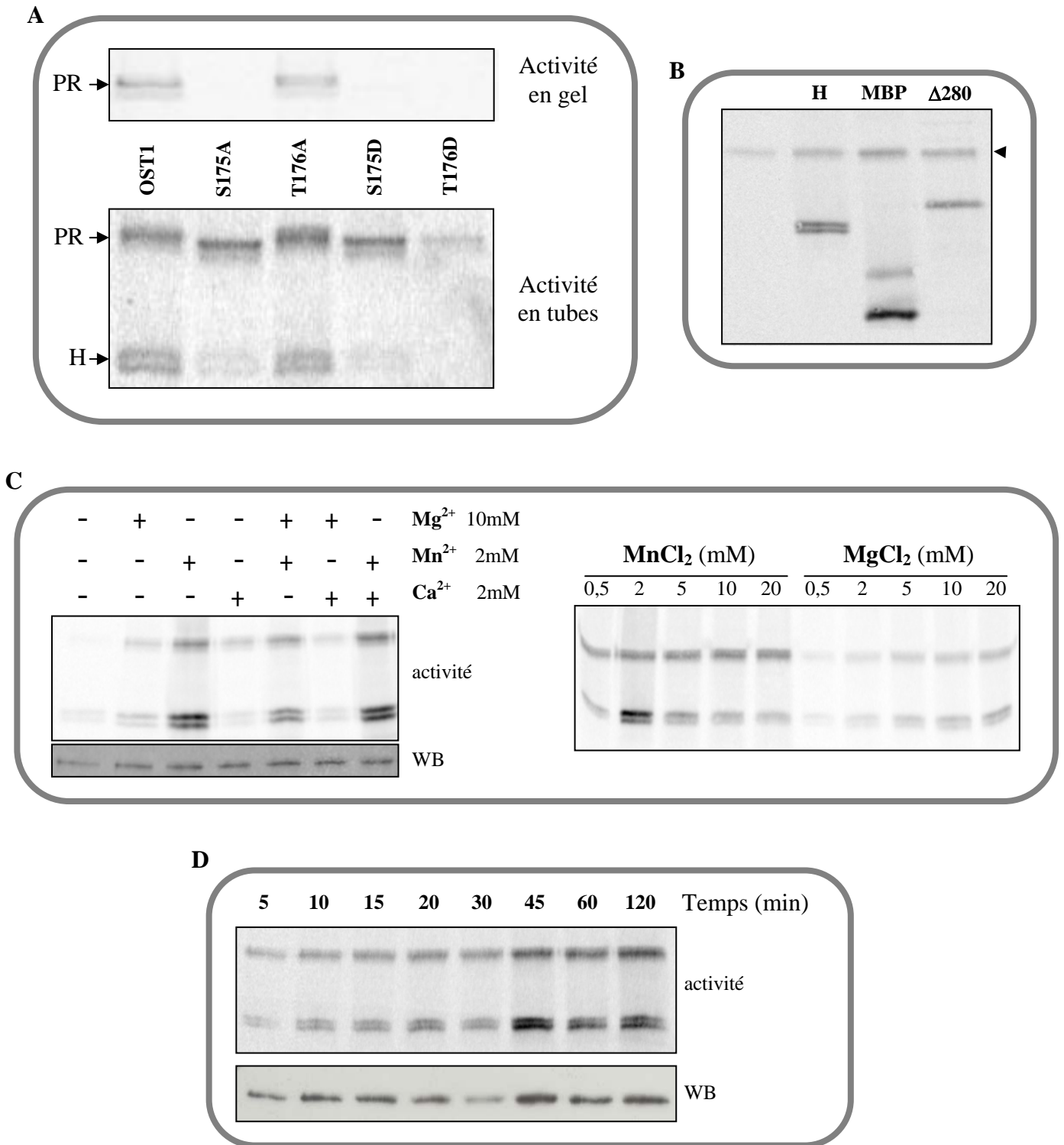


Figure II.4 : Caractérisation et optimisation de l'activité kinase

A. Comparaison entre les tests d'activité en gel et en tubes. PR : protéine recombinante; H : histone. **B.** Caractérisation de l'activité de 10xHis-OST1 sur différents substrats (tous à $8 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$). H : histone, MBP : "myelin basic protein"; $\Delta 280$: domaine catalytique de OST1 étiqueté 10xHis. La flèche indique la bande correspondant à l'autophosphorylation. **C.** Comparaison de l'activité de 10xHis-OST1 sur l'histone en présence de différents cofacteurs. **D.** Cinétique de phosphorylation de l'histone par 10xHis-OST1. WB : Western-blot contre l'étiquette 10xHis.

Les protéines kinases utilisent comme substrat un complexe entre l'ATP et un cation divalent. Afin d'optimiser les tests d'activité *in vitro*, j'ai recherché la combinaison d'ions divalents la plus favorable dans nos conditions à l'activité kinase de la protéine OST1 recombinante. La figure II.4C révèle que le manganèse est un meilleur cofacteur que le magnésium pour l'activité de OST1 dans nos conditions expérimentales et que la concentration de $MnCl_2$ optimale est de 2 mM. Le calcium, à une concentration de 10 mM, n'a aucun effet sur l'activité kinase testée. L'influence de plusieurs concentrations de calcium sera étudiée dans la partie suivante.

Enfin, nous avons suivi la cinétique d'activité *in vitro* de OST1 dans nos conditions afin de déterminer la durée optimale pour les tests d'activité. La quantification des signaux de la figure II.4D montre une saturation de l'activité après 45 minutes. Par la suite, j'ai décidé de réaliser tous mes tests d'activité en 45 minutes.

L'ensemble de ces travaux nous a permis de caractériser l'activité kinase de la protéine recombinante OST1 et de fixer un protocole optimal pour analyser l'effet des mutations ponctuelles et des délétions sur cette activité.

2. Effets de l'ABA, du pH et du calcium sur l'activité de OST1

Le domaine C-terminal de la protéine OST1 est très riche en résidus acides et a une fonction inconnue. Il est possible que ce domaine régule l'activité de la protéine via la liaison de molécules impliquées dans la transduction du signal ABA. Nous avons voulu déterminer si l'ABA lui-même, ou le calcium ou le pH, deux seconds messagers essentiels dans cette voie de signalisation, peuvent réguler directement l'activité kinase de la protéine OST1 *in vitro*.

Les études sur le rôle du calcium en tant que second messenger, aussi bien chez les animaux que chez les végétaux a permis de définir que les pics de calcium cytosolique pouvant atteindre des concentrations maximales proches de $1\mu M$ (Berridge et al., 2000). Cependant, les tests d'activité *in vitro* des CDPK, kinases activées par le calcium, sont classiquement réalisés à des concentrations en $CaCl_2$ de l'ordre de $100\mu M$ (Zhang et al., 2005). J'ai donc choisi d'analyser la réponse de OST1 à des concentrations en $CaCl_2$ autour de cette valeur, ainsi que pour des concentrations beaucoup plus fortes (jusqu'à 100 mM). La figure II.5A révèle une inhibition de l'activité pour des concentrations en $CaCl_2$ supérieures à 1 mM mais aucun effet du calcium sur cette activité pour des concentrations inférieures. Il aurait été intéressant d'étudier l'effet des variations de la concentration en calcium autour de valeurs physiologiques mais cela nécessite un contrôle fin de telles concentrations via l'utilisation d'agents complexants tels que le BAPTA.

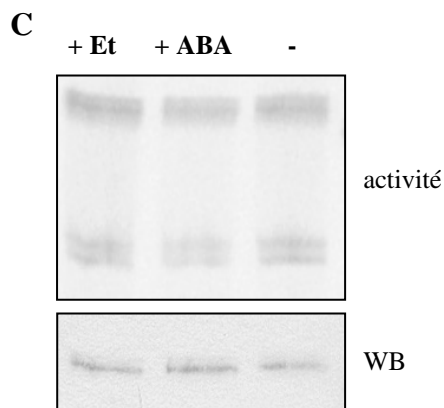
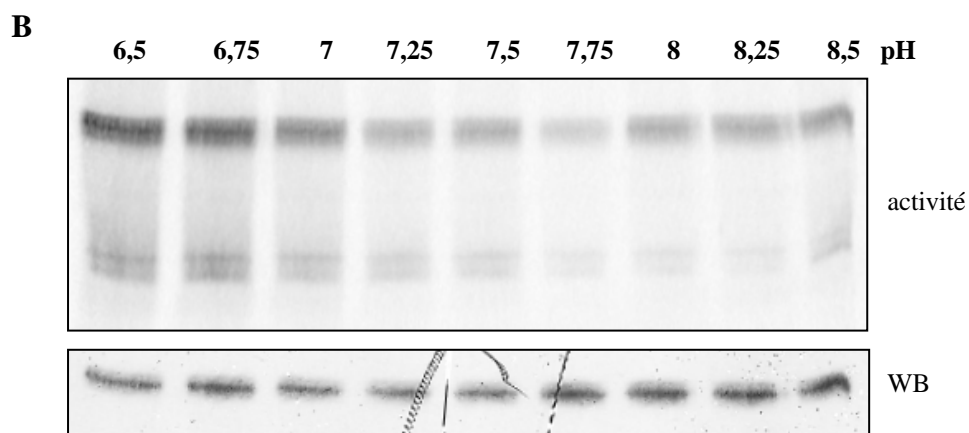
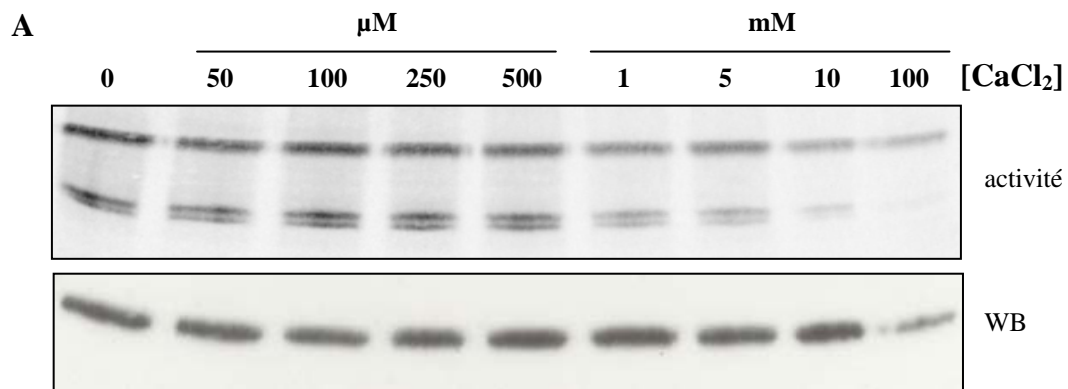


Figure II.5 : Effet du pH, du calcium et de l'ABA sur l'activité de OST1 recombinante

A. Effet de différentes concentrations en calcium sur l'activité *in vitro* de 10xHis-OST1. **B.** Effet du pH sur l'activité *in vitro* de 10xHis-OST1. **C.** Effet de 10 μM d'ABA sur l'activité *in vitro* de 10xHis-OST1. La première piste correspond au témoin éthanol, solvant de l'ABA. WB : western-blot contre l'étiquette 10xHis.

Les travaux sur la régulation du pH cytosolique par l'ABA dans les protoplastes de cellules à aleurone et les cellules de garde décrivent des augmentations de 0,04 à 0,3 unités dans la fourchette de valeurs 7,1 à 7,5 (Irving et al., 1992; van der Veen et al., 1992; Suhita et al., 2004). J'ai étudié l'activité de la kinase recombinante *in vitro* dans un tampon Hepes en fonction d'une gamme de pH variant de 6,5 et 8,5 avec un pas de 0,25. Nous pouvons observer sur la figure II.5B que les variations de pH ne modifient pas significativement l'activité de la protéine recombinante entre 7 et 8, intervalle dans lequel se trouvent les valeurs physiologiques du pH cytosolique. En revanche, on observe une induction de l'activité en milieu acide ($\text{pH} < 7$).

Enfin, la figure II.5C nous montre que l'ABA lui-même, à la concentration de 10 μM , n'a aucun effet sur l'activité *in vitro* de la kinase OST1 recombinante.

CHAPITRE III :

ANALYSE DES DIFFERENCES ENTRE

LES ALLELES DE *OST1*

I. PROBLEMES DE COMPLEMENTATION DU MUTANT *OST1-2*

Dans le but d'étudier l'importance fonctionnelle des différents résidus et domaines identifiés, nous avons réalisé des tests de complémentation d'un mutant *ost1* par les différentes versions mutées ou tronquées. Dans un premier temps, notre choix s'était porté sur l'allèle *ost1-2* qui a, comme je l'ai présenté en introduction, un phénotype plus fort que l'allèle *ost1-1*. En effet, nous souhaitons observer des différences phénotypiques les plus marquées possibles entre le sauvage et le mutant afin de pouvoir distinguer avec un maximum de sensibilité les niveaux de complémentation par les diverses versions. Pour les tests de complémentation, nous avons choisi la technique de thermographie infrarouge (Merlot et al., 2002) qui permet une analyse rapide de nombreuses lignées, contrairement aux mesures de perte d'eau ou aux mesures d'ouverture stomatique, longues et fastidieuses.

Notre premier souci a été de tester la complémentation du mutant *ost1-2* par une construction *PRO_{35S}:3xHA-OST1*. Sur les trois lignées obtenues, une ne présente aucune trace détectable de protéine; les résultats de la figure III.1A sont représentatifs des deux autres lignées. Les images de thermographie infrarouge de plantules entières ayant subi un stress hydrique progressif pendant 4 jours (pas d'arrosage et hygrométrie de 50%) révèlent que ces lignées ont un phénotype intermédiaire entre celui du sauvage et celui du mutant *ost1-2*. Un autre phénotype observable est la réponse rapide des stomates à un stress hydrique rapide et aigu provoqué par le détachement de la feuille de la plantule. Ce phénotype peut être analysé par thermographie infrarouge (Mustilli et al., 2002) ou par des mesures de perte d'eau de feuilles détachées. La figure III.1A montre que les lignées testées présentent aussi un phénotype intermédiaire entre le sauvage et le mutant *ost1-2* par thermographie infrarouge sur feuilles détachées. Seule l'analyse de perte d'eau des lignées montre une complémentation presque totale du mutant *ost1-2* par la construction *PRO_{35S}:3xHA-OST1* (figure III.1B).

Une des hypothèses pour expliquer le défaut de complémentation est l'utilisation du promoteur 35S. Nous avons alors construit un nouveau vecteur permettant d'exprimer la même fusion sous le contrôle du promoteur *OST1*. Ce vecteur, dont la carte est présentée en annexe 2, utilise la technologie Gateway™. Cette technologie a permis d'insérer rapidement chacune des 22 constructions d'intérêt, ADNc mutés ponctuellement ou tronqués de *OST1* (annexe 3), à partir des mêmes vecteurs d'entrée que ceux utilisés pour l'obtention de protéines recombinantes chez *E.coli*. De plus, le marqueur de sélection *PRO_{At2S3}:GFP* (Bensmihen et al., 2004) permet l'expression de la GFP dans les graines transformées et donc

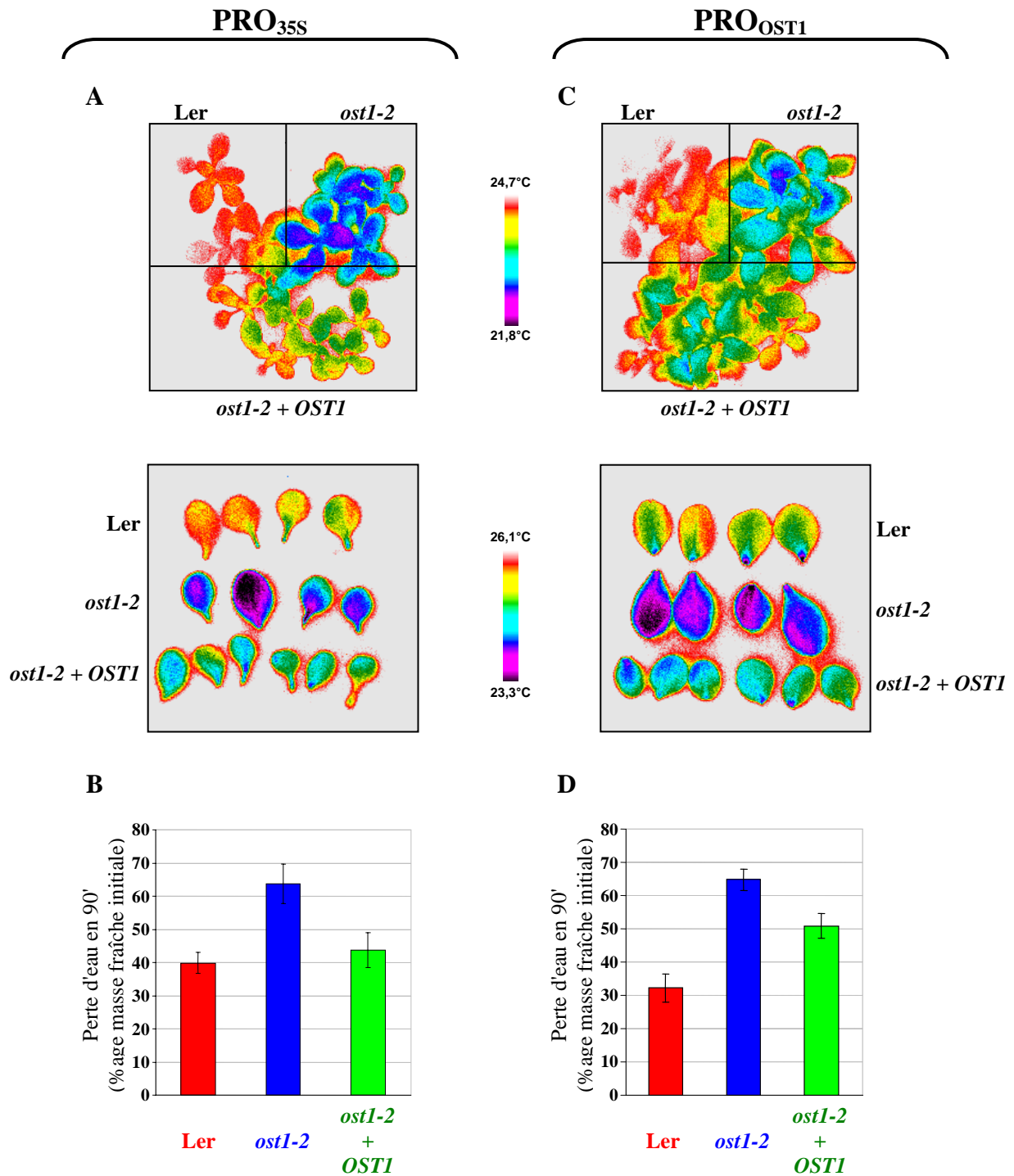


Figure III.1 : Complémentation du mutant *ost1-2* par 3xHA-OST1

Différents phénotypes d'une lignée *PRO_{35S}:3xHA-OST1* (A,B) et d'une lignée *PRO_{OST1}:3xHA-OST1* (C,D). A,C. Thermographie IR sur plantes entières après 4 jours de sécheresse (pas d'arrosage, hygrométrie de 50%) et sur feuilles détachées de plantes cultivées en serre et arrosées régulièrement. B,D. Perte d'eau sur feuilles détachées pendant 90 minutes. Les lignées montrées sur cette figure sont représentatives de l'ensemble des lignées obtenues.

un tri rapide des graines transformées par détection de leur fluorescence. Les figures III.1C et III.1D nous montrent les résultats de complémentation obtenus sur une lignée représentative des quatre lignées testées dans lesquelles nous avons vérifié par western-blot l'expression de la protéine de fusion. Là encore, nous n'observons qu'une complémentation partielle du phénotype du mutant *ost1-2* en thermographie infrarouge sur plantes entières et sur feuilles détachées (figure III.1C). Les expériences de perte d'eau confirment que la complémentation du mutant par la protéine 3xHA-OST1 n'est que partielle (figure III.1D).

Dans un second temps, nous avons remis en question le choix de l'allèle mutant utilisé pour la complémentation. En effet, la mutation *ost1-2* étant une mutation ponctuelle, il était probable que cet allèle ne soit pas un allèle "nul".

II. CARACTERISATION DES DIFFERENTS ALLELES MUTANTS DE *OST1*

La figure III.2A montre les images en thermographie infrarouge de plantes entières après une période de stress hydrique. Ces images confirment que *ost1-1* a un phénotype moins marqué que *ost1-2* et révèlent que l'allèle *srk2e* (Yoshida et al., 2002), "knock-out" testé pour la première fois en thermographie infrarouge, a également un phénotype intermédiaire entre le sauvage et *ost1-2*, similaire à celui de *ost1-1*. Ce résultat est conforté par la photo des plantes ayant subi un stress hydrique, présentée sur la figure III.2B. En effet, nous voyons à ce stade un fort flétrissement des plantes *ost1-2* alors que les plantes *srk2e* restent turgescents. Ces résultats confirment que les plantes *ost1-2* sont plus sensibles au stress hydrique que les plantes *ost1-1* et *srk2e*.

La figure III.2C montre une image de thermographie infrarouge de feuilles détachées des mutants *ost1-2* et *srk2e* et de leur écotype sauvage respectif. Nous remarquons avec surprise que la différence entre *srk2e* et le sauvage Col est similaire à celle entre l'allèle *ost1-2* et l'écotype Ler. De même, les expériences de perte d'eau sur feuilles détachées présentées sur la figure III.2D montrent des phénotypes identiques pour les deux mutants. Les allèles *ost1-2* et *srk2e* présentent des phénotypes identiques sur feuilles détachées alors que le mutant *ost1-2* est moins tolérant à un stress sécheresse que les autres allèles.

Nous avons alors caractérisé chacun des allèles au niveau moléculaire pour savoir avec précision l'effet de chaque mutation sur la quantité de protéine OST1. Les expériences représentées sur la figure III.2E montrent que les allèles *ost1-1* et *srk2e* sont totalement dépourvus de protéine OST1. Au contraire, dans les plantes *ost1-2*, nous pouvons détecter la protéine OST1 en quantité similaire aux plantes sauvages. Cependant, nous avons montré

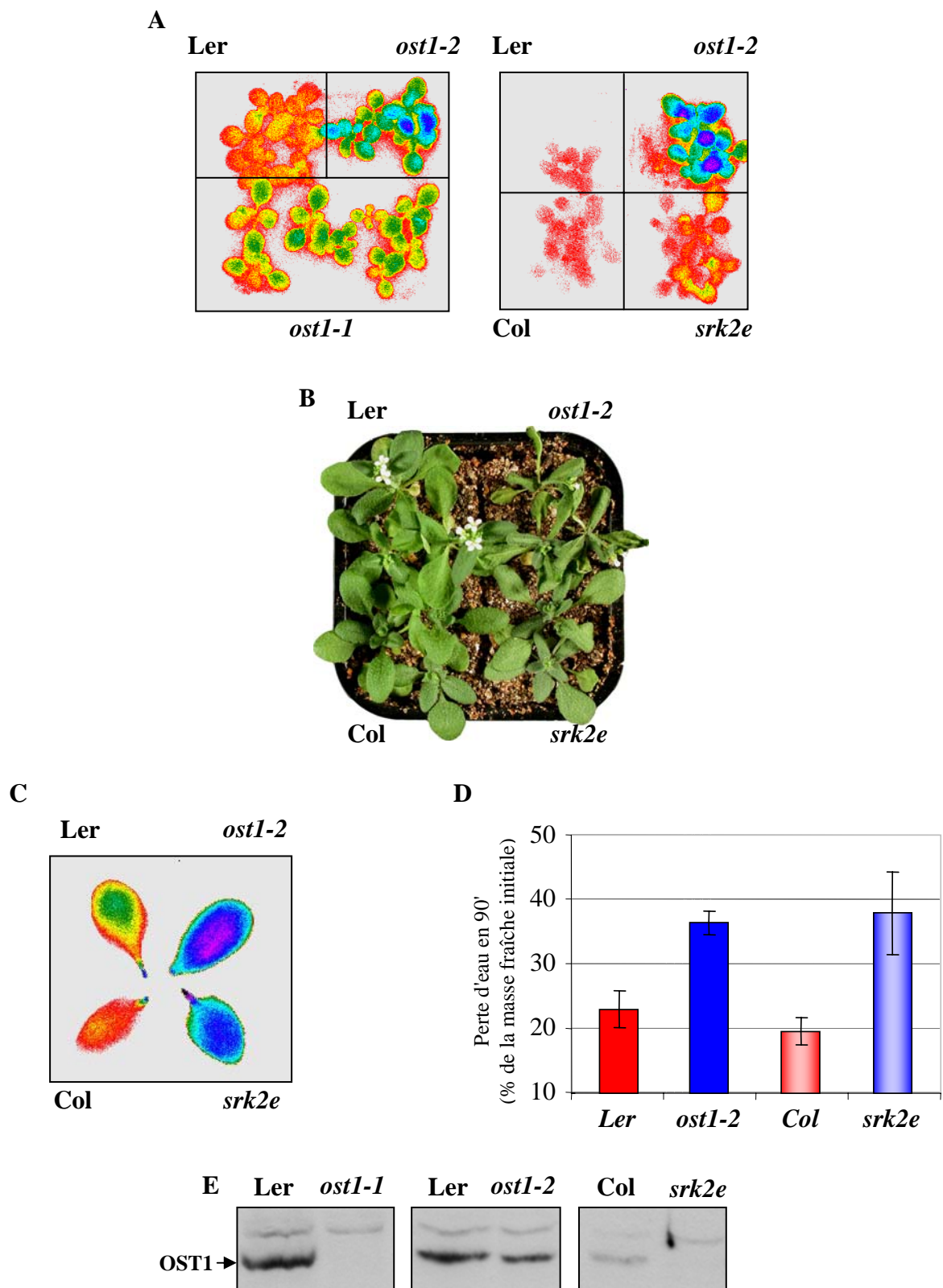


Figure III.2 : Caractérisation phénotypique des différents allèles *ost1-1*, *ost1-2* et *srk2e*

A. Thermographie IR sur plantes en pots après 4 jours de sécheresse (pas d'arrosage, hygrométrie de 50%). **B.** Phénotype de flétrissement des plantes après 5 jours de sécheresse (pas d'arrosage, hygrométrie de 50%). **C.** Thermographie IR sur feuilles détachées. **D.** Perte d'eau en 90 minutes de feuilles détachées (n=6). **E.** Western-blot contre la protéine OST1 sur des extraits totaux de racines. La flèche indique la bande correspondant à la protéine OST1. Ler : génotype sauvage de *ost1-1* et *ost1-2*; Col : génotype sauvage de *srk2e*.

dans le premier chapitre que la protéine codée par l'allèle *ost1-2*, OST1^{G33R}, est totalement inactive.

L'ensemble de ces données nous amène à proposer que les phénotypes forts observés sur plantes entières en réponse à un stress hydrique pour l'allèle *ost1-2* par rapport aux allèles *ost1-1* et *srk2e* sont dûs à la présence d'une protéine OST1 inactive. Cette protéine inactive pourrait entrer en compétition avec la protéine de fusion codée par le transgène et ainsi empêcher la complémentation totale du mutant *ost1-2*. Au contraire, l'absence de protéine OST1 chez les allèles *ost1-1* et *srk2e* entraîne un phénotype moins fort.

III. STRATEGIE D'ETUDE DE LA COMPLEMENTATION DU MUTANT *OST1*

Les difficultés rencontrées lors de la complémentation de *ost1-2*, vraisemblablement liées à la présence d'une protéine OST1 inactive, montrent que cet allèle n'est finalement pas un bon choix pour l'étude fonctionnelle des différents résidus et motifs identifiés. Nous nous sommes alors intéressés à *srk2e*, mutant d'insertion dépourvu de toute protéine OST1. Le phénotype de l'allèle *srk2e* étant aussi fort que celui de *ost1-2* sur feuilles détachées, nous avons choisi d'analyser l'ensemble des lignées par la technique de thermographie infrarouge sur feuilles détachées. Nous avons pour cela généré l'ensemble des lignées exprimant les différentes versions de *OST1* ou d'autres *SnRK2* sous le contrôle du promoteur *OST1* dans le fond mutant *srk2e*. J'ai également cessé la construction de lignées dans le fond mutant *ost1-2*, la plupart étant en génération T1 (Annexe 3). Les résultats décrits dans le premier chapitre valident cette stratégie d'analyse fonctionnelle puisque la complémentation du mutant *srk2e* par la construction *PRO_{OST1}:3xHA-OST1* est totale (figure I.6).

CHAPITRE IV :

EXPLORATION DE QUELQUES

MECANISMES PUTATIFS DE

REGULATION DE LA PROTEINE OST1

I. LA PP2C HABI PARTICIPE-T-ELLE A LA REGULATION DE OST1 ?

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, j'ai montré que la phosphorylation de la protéine OST1 est nécessaire pour son activité *in planta* (figure I.2). De plus, nous avons détaillé dans l'introduction l'implication des protéines PP2C en tant que régulateurs négatifs de la voie de transduction de l'ABA dans les cellules de garde. Des travaux montrent que la mutation *abil-1* affecte l'activation de OST1 en réponse à l'ABA (Mustilli et al., 2002). D'autres PP2C telles que HABI et AtPP2C-HA sont, comme ABI1, des régulateurs négatifs de la voie de transduction de l'ABA dans les cellules de garde (Gosti et al., 1999; Leonhardt et al., 2004; Saez et al., 2004; Kuhn et al., 2006). J'ai eu l'opportunité de collaborer avec l'équipe de Pedro-Luis Rodriguez (IBMCP Valencia) afin de rechercher un effet de HABI sur l'activité de OST1.

1. Analyse par thermographie infrarouge des lignées *hab1-1* et *PRO_{35S}:HABI*

Dans un premier temps, nous avons étudié par thermographie infrarouge le phénotype du mutant nul *hab1-1* dans l'écotype Col et d'une lignée exprimant *HABI* sous le contrôle du promoteur *35S* dans l'écotype Ler. La figure IV.1A montre que le mutant *hab1-1* n'a aucun phénotype en thermographie infrarouge, aussi bien sur plantes entières ayant subi une période de sécheresse que sur feuilles détachées. Ce résultat était attendu puisque ce mutant présente une hypersensibilité à l'ABA lors de la germination mais pas au niveau des cellules de garde. En revanche, la lignée *PRO_{35S}:HABI* présente une insensibilité à l'ABA aussi bien au niveau de la germination que de la régulation de l'ouverture stomatique (Saez et al., 2004). Cependant, nous n'avons pas non plus détecté de phénotype en thermographie infrarouge sur cette lignée dans nos conditions.

2. Activité de OST1 dans les lignées *hab1-1* et *PRO_{35S}:HABI*

Dans un deuxième temps, afin de déterminer si HABI est un régulateur de l'activité de OST1, nous avons réalisé un test d'activité kinase en gel sur des extraits de racines de plantes *hab1-1* et *PRO_{35S}:HABI*. Les résultats présentés figure IV.1B montrent que OST1 est activée par l'ABA de la même manière dans ces lignées que dans le sauvage. L'inactivation et la surexpression de HABI ne semblent donc pas avoir d'effet sur l'activité de la protéine OST1.

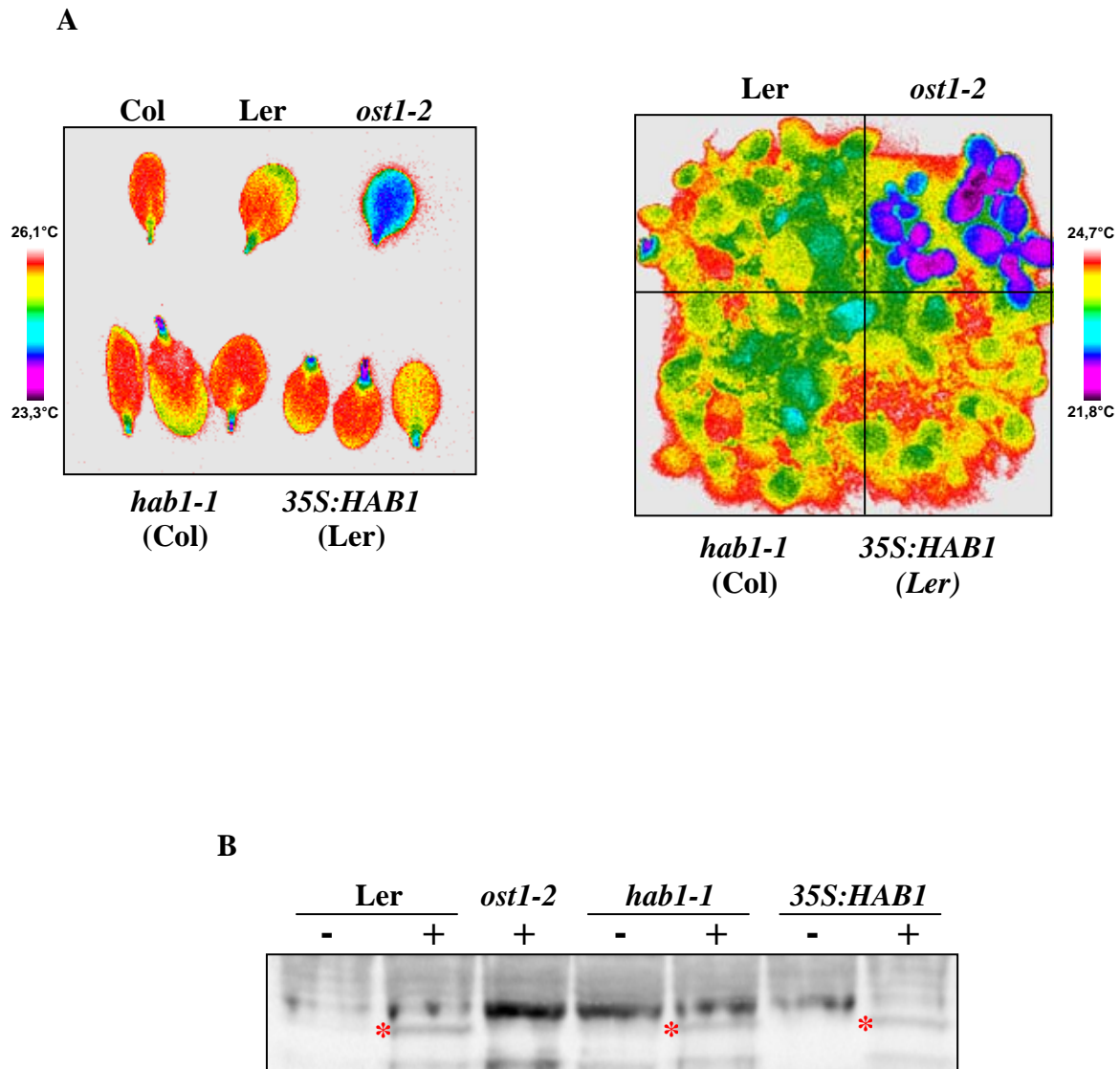


Figure IV.1 : La PP2C HAB1 n'est pas impliquée dans la régulation de OST1

A. Thermographie infrarouge de feuilles détachées (gauche) et de plantes entières ayant subi un stress hydrique pendant 4 jours (pas d'arrosage, hygrométrie de 50% - droite) du mutant *hab1-1* (témoin Col) et du surexpresseur *35S:HAB1* (témoin Ler). **B.** Activité kinase en gel sur les extraits totaux de racines des lignées *hab1-1* (témoin Col) et *35S:HAB1* (témoin Ler). Les étoiles rouges indiquent la bande de 42kDa correspondant à l'activité de OST1. Ce test d'activité sur histone est réalisé sur racines de plantules traitées avec 10 μ M d'ABA (+) ou avec son solvant seul, l'éthanol (-), pendant 3h.

Cependant, ces tests ont été faits sur racines et on ne peut donc pas conclure quant à l'effet de HAB1 sur l'activité de OST1 dans les cellules de garde.

Au vu des premiers résultats négatifs obtenus, nous avons décidé de nous arrêter à ces tests préliminaires et de ne pas poursuivre les travaux sur HAB1 afin de se concentrer sur l'étude des mécanismes intramoléculaires de régulation de l'activité de OST1.

II. ABA ET REGULATION DE LA QUANTITE DE PROTEINE OST1

Plusieurs observations fortuites lors de la caractérisation moléculaire des lignées transgéniques nous ont amené à nous intéresser à la régulation de la quantité de protéine OST1. D'une part, l'ABA induit clairement une augmentation de la quantité de protéine 3xHA-OST1 dans les racines des lignées exprimant cette construction sous le contrôle du promoteur 35S dans le mutant *ost1-2* (figure IV.2A). D'autre part, alors que la protéine de fusion 3xHA-OST1 et ses mutants ponctuels sont difficilement détectables, les protéines de fusion dont le domaine C-terminal a été tronqué sont présentes en quantité importante dans les lignées qui expriment leur ADNc sous le contrôle du promoteur *OST1* (figure IV.2B). Cette figure ne présente que trois exemples de lignées mais elle est représentative de toutes les lignées testées (Annexe 4). L'ensemble de ces résultats suggère une régulation de la quantité de protéine de fusion 3xHA-OST1 dans la plante, dépendante du domaine C-terminal de OST1.

Cette hypothèse d'un deuxième mécanisme de régulation touchant la quantité de protéine OST1 par l'ABA, en plus de l'activation de la kinase, était séduisante et nous avons alors voulu confirmer et caractériser cette régulation. Dans un premier temps, nous avons cherché à caractériser plus précisément le phénomène observé dans les lignées *PRO_{35S}:3xHA-OST1*. La figure IV.2C montre que la quantité de la protéine de fusion 3xHA-OST1 dans les racines commence à augmenter 1h après le transfert sur un milieu contenant de l'ABA. Les données de la littérature indiquent que l'ABA induit l'activité kinase de OST1 en amont de la production de H₂O₂, réponse observable au cours des 15 premières minutes qui suivent le traitement par l'ABA (Mustilli et al., 2002; Suhita et al., 2004). Cette cinétique indique qu'une augmentation lente de la quantité de protéine OST1 suivrait l'induction de son activité en cas de maintien du stress. La figure IV.2D montre que cette réponse est dépendante de la concentration en ABA appliquée et qu'elle a lieu à partir de très faibles concentrations puisqu'on peut déjà voir une augmentation de la quantité de protéine avec un traitement par 1 μM d'ABA.

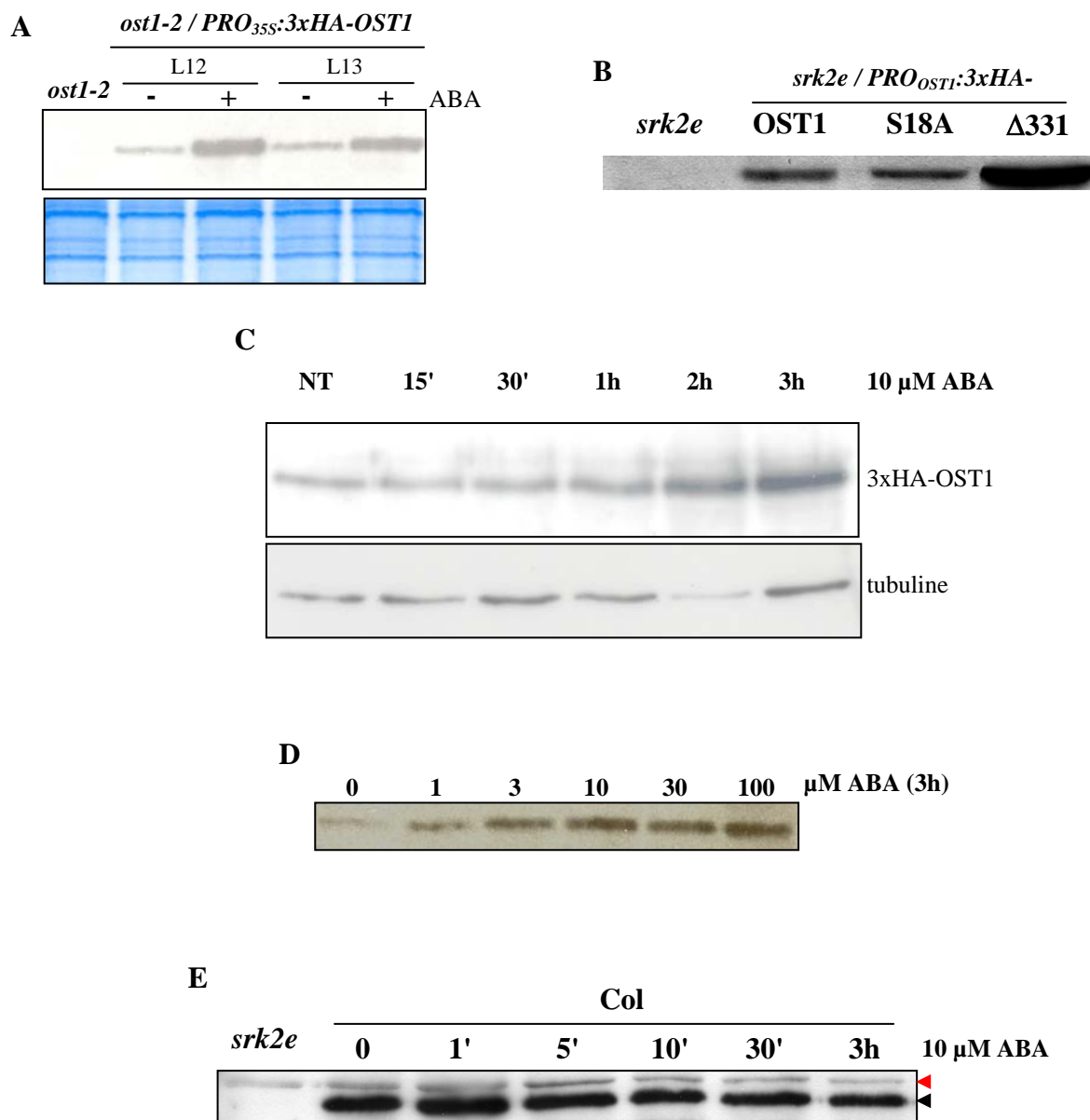


Figure IV.2 : Régulation de la quantité de protéine OST1 par l'ABA

A,B. Western-blot contre l'étiquette 3xHA sur les racines de plantes transgéniques. **A.** Lignées (L12 et L13) *ost1-2/PRO_{35S}:3xHA-OST1* transférées pendant 3h sur un milieu contenant 30 μM ABA (+) ou sur milieu témoin (-). Le panneau du bas révèle la quantité de protéines totales des extraits (coloration Coomassie). **B.** Lignées *srk2e/PRO_{OST1}:3xHA-X*, avec X = OST1, OST1^{S18A} et OST1Δ331. **C.** Cinétique d'augmentation de la quantité de protéine de fusion en réponse à un traitement par 10 μM ABA. Western-blot contre l'étiquette 3xHA et contrôle de la quantité de protéines dans les extraits par western-blot contre la tubuline (panneau du bas). **D.** Augmentation de la quantité de protéine 3xHA-OST1 en réponse à différentes concentrations d'ABA (Western-blot contre l'étiquette 3xHA). **C,D.** Racines Lignée L12 *ost1-2/PRO_{35S}:3xHA-OST1* **E.** Cinétique d'évolution de la quantité de protéine OST1 en réponse à l'ABA dans les cellules de garde du sauvage Col. Western-blot contre la protéine OST1 (flèche noire) et contre la tubuline (flèche rouge) sur la même membrane.

Cependant, ces résultats proviennent de tests d'activité sur des racines de lignées exprimant une construction *3xHA-OST1* sous le contrôle du promoteur 35S. Il paraissait important de vérifier si cette régulation était également présente chez les plantes sauvages. Une première expérience sur racines n'a montré aucune régulation de la protéine OST1 par l'ABA. J'ai alors décidé de me concentrer sur le système cellulaire que j'étudie, la cellule de garde, pour tester une action prolongée de l'ABA. La figure IV.2E présente un western-blot contre la protéine OST1 sur des extraits protéiques de cellules de garde de l'écotype Columbia. Cette figure ne montre pas de variation de la quantité de protéine OST1 en réponse à un traitement des cellules par 10 μ M d'ABA, même lorsque le traitement est prolongé jusqu'à 3 heures. Il ne semble donc pas y avoir de régulation de la quantité de protéine OST1 par l'ABA dans les cellules de garde.

CHAPITRE V :

OST1 ET LES AUTRES SNRK2

Etude de l'expression des *OSKL* par RT-PCR

Les plantes sont cultivées pendant 5 semaines en serre (22°C – 16h d'éclairage) ou pendant 2 semaines *in vitro* (21°C – 16h d'éclairage) en milieu solide ½ MS (Murashige and Skoog Basal Salt Mixture, Sigma) auquel sont ajoutés 5 g.L⁻¹ de saccharose, 0,5 g.L⁻¹ de MES et des vitamines B5.

L'extraction des ARN totaux à partir de 100 mg de tissus est réalisée grâce au kit "RNeasy Mini kit" (Qiagen) en suivant le protocole donné par le fournisseur pour l'extraction d'ARN de plantes. Les ARN sont élués dans un volume final de 50 µL d'eau. 500 ng de l'oligonucléotide poly(dT)-V et 1 µg d'ARN totaux sont dénaturés à 70°C pendant 10 minutes. La réaction de RT est réalisée à 42°C pendant 1h30 en ajoutant à ce mélange 1 µL de Reverse Transcriptase PowerScript™ et 4 µL de tampon 5X (BD Biosciences), 2 µL de DTT 100 mM et 2 µL d'un mélange de dNTP (10 mM chacun). La réaction est arrêtée par chauffage à 70°C pendant 15 minutes et les ADNc ainsi synthétisés sont dilués 10 fois.

La PCR est effectuée dans un volume final de 20 µL contenant 2 µL de ces ADNc, 0,5 µM de chacune des deux amorces spécifiques du gène étudié (Annexe 5), 25 µM de chaque dNTP et 0,5 unité de Taq polymérase (Eurobio) en utilisant le tampon commercial complété avec 1,5 mM de MgCl₂. Le programme PCR commence par 2 minutes de dénaturation à 94°C et s'achève par une étape d'élongation de 5 minutes à 72°C. Entre les deux, les cycles d'amplification sont composés d'une dénaturation (30 sec, 94°C), d'une phase d'hybridation (30 sec) et d'une étape d'élongation (1 min, 72°C). Le nombre total de cycles et la température d'hybridation sont répertoriés pour chacun des gènes étudiés dans l'annexe 5.

Le résultat est analysé par électrophorèse en gel d'agarose 1%.

I. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES DIX *SnRK2* CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA*

Les phénotypes faibles des allèles nuls de *OST1* par rapport à ceux de *ost1-2*, présentés dans le chapitre III, suggèrent une éventuelle redondance entre *OST1* et d'autres *SnRK2* à certains niveaux. De plus, il a été montré que *OSKL2* et *OSKL3* étaient, comme *OST1*, activées par l'ABA (Boudsocq et al., 2004). Afin de mieux comprendre la fonction de la protéine *OST1* et les différences et éventuelles redondances avec d'autres membres de la famille *SnRK2*, il nous a semblé utile d'élargir notre étude aux autres *SnRK2* d'*Arabidopsis*. La première partie concerne l'expression des 10 gènes *SnRK2* et leur régulation transcriptionnelle dans le but de savoir si leur patron d'expression se recoupent et si certains sont régulés par l'ABA. Dans la deuxième partie, nous avons cherché à savoir si *OST1* et les autres *OSKL* étaient fonctionnellement interchangeables.

1. Données d'expression spatiale et temporelle des *SnRK2*

Dans un premier temps, nous avons analysé le profil d'expression par RT-PCR des 10 *SnRK2* dans les différents organes. Pour cela, nous avons choisi des couples d'amorces spécifiques et caractérisé les conditions de RT-PCR optimales pour chacun des gènes (Annexe 5 et encadré). Les résultats des RT-PCR sur les ARN extraits de racines et parties aériennes de plantules cultivées *in vitro* pendant 2 semaines et de feuilles, tiges, fleurs et siliques de plantes cultivées en serre pendant 5 semaines sont présentés dans la table V.1. La plupart des gènes, exceptés *OSKL5* et *OSKL10*, s'expriment de manière constitutive et facilement détectable (25 à 28 cycles de PCR – annexe 5) dans l'ensemble des organes testés. L'expression du gène *OSKL10* est détectable dans l'ensemble des organes à l'exception des siliques mais cette expression est beaucoup plus forte au niveau des racines. Enfin, l'expression de *OSKL5* n'a pu être détectée qu'en réalisant 32 cycles de PCR (Annexe 5), et uniquement dans les racines.

Depuis, de nombreuses données d'expériences de transcriptomique utilisant des puces Affymetrix se sont accumulées et sont regroupées dans la base de données Genevestigator (<https://www.genevestigator.ethz.ch/>) qui permet de compiler et de comparer l'ensemble de ces résultats (2620 puces). Pour aller plus loin dans l'analyse de l'expression des *SnRK2*, j'ai décidé d'interroger cette base de données grâce à l'outil "MetaAnalyser" qui permet de regrouper les patrons d'expression d'un ensemble de gènes et de comparer non pas l'intensité

Table V.1. Profil d'expression des 10 SnRK2

Profils obtenus par RT-PCR.

	<i>In vitro</i> – 2 semaines		Plantes en serre – 5 semaines			
	Racines	Rosettes	Feuilles	Tige	Fleurs	Siliques
<i>OST1</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>OSKL2</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>OSKL3</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>OSKL4</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>OSKL5</i>	+	0	0	0	0	0
<i>OSKL6</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>OSKL7</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>OSKL8</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>OSKL9</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>OSKL10</i>	+++	++	+	+	+	0

+++ : expression forte

++ : expression moyenne

+ : expression très faible

0 : aucune expression détectée

Table V.2. Expression tissulaire des 10 SnRK2 d'après les données de Genevestigator^aCe tableau est extrait de l'analyse sous Genevestigator^a des résultats de puces 22K.

L'échelle de bleu représente une expression croissante (blanc : expression nulle, bleu foncé : expression maximale). Les données représentent l'expression relative dans les différents organes pour un même gène.

	0 callus	1 cell suspension	2 seedling	21 cotyledons	22 hypocotyl	23 radicle	3 inflorescence	31 flower	311 carpel	3111 ovary	3112 stigma	312 petal	313 sepal	314 stamen	3141 pollen	315 pedicel	32 silique	33 seed	34 stem	35 node	36 shoot apex	37 cauline leaf	4 rosette	41 juvenile leaf	42 adult leaf	43 petiole	44 senescent leaf	5 roots	52 lateral root	54 elongation zone	Gène
																															<i>OSKL4</i>
																															<i>OST1</i>
																															<i>OSKL10</i>
																															<i>OSKL5</i>
																															<i>OSKL9</i>
																															<i>OSKL3</i>
																															<i>OSKL8</i>
																															<i>OSKL2</i>
																															<i>OSKL6</i>
																															<i>OSKL7</i>

^a<https://www.genevestigator.ethz.ch/>

de leur expression mais leurs profils d'expression respectifs. Les résultats de cette analyse des profils d'expression dans les différents organes sont répertoriés dans la table V.2. Nous remarquons que la plupart des gènes s'expriment dans de nombreux organes et que le gène *OSKL10* s'expriment très majoritairement dans les racines. Enfin, le gène *OSKL5* semble s'exprimer dans la plupart des organes, avec une expression majoritaire au sein des racines et des étamines. Ces données sont plutôt bien corrélées avec les résultats de nos RT-PCR et c'est probablement le faible niveau d'expression de *OSKL5* qui nous empêche de le détecter dans les autres organes testés. D'autre part, nous pouvons remarquer que le gène *OSKL4* s'exprime préférentiellement dans les feuilles caulinaires ou dans les feuilles de rosette sénescents. Quant aux gènes *OSKL2* et *OSKL3*, codant des protéines dont l'activité est fortement induite par l'ABA (Boudsocq et al., 2004), il est intéressant de remarquer qu'ils s'expriment dans la plupart des organes avec une expression forte au niveau des feuilles de rosette sénescents et surtout au niveau des graines pour le gène *OSKL2*.


La même analyse a été réalisée en fonction des stades de développement et les résultats sont représentés dans la table V.3. Tous les gènes s'expriment durant quasiment toute la vie de la plante. Cependant, ces résultats renforcent le tableau précédent pour suggérer un rôle important de *OSKL2* dans les graines puisqu'on le retrouve exprimé préférentiellement lors de la germination et, à un degré moindre, lors du stade présentant des graines matures. Des SnRK2 spécifiques des graines ont été impliquées dans le contrôle de la germination par l'ABA, comme PKABA1 chez l'orge (Gomez-Cadenas et al., 2001) mais aussi dans le contrôle de certaines bZIP chez le blé, le riz ou Arabidopsis (Johnson et al., 2002; Kobayashi et al., 2005; Furihata et al., 2006). Certaines bZIP sont des régulateurs majeurs de l'accumulation de LEA au cours de la maturation de la graine chez Arabidopsis (Bensmihen et al., 2002; Carles et al., 2002). Toutes ces données de la littérature associées à la caractérisation du profil d'expression d'*OSKL2* suggèrent une fonction de cette SnRK2 dans la maturation de la graine et/ou la germination chez Arabidopsis.

2. Régulation de l'expression des différents SnRK2

Au début de ma thèse, on connaissait plusieurs exemples de *SnRK2* régulés au niveau transcriptionnel par l'ABA, comme *PKABA1* (Anderberg and Walker-Simmons, 1992) ou *VfAAPK* (Li et al., 2000). J'ai alors cherché à savoir si certains gènes de cette famille étaient régulés transcriptionnellement par l'ABA chez Arabidopsis. J'ai réalisé des RT-PCR sur des plantules cultivées *in vitro* pendant 2 semaines puis transférées pendant 3 heures sur un milieu contenant 30 μ M d'ABA ou sur un milieu témoin. Les résultats de l'une des deux

Table V.3. Expression des 10 SnRK2 aux différents stades de développement

Ce tableau est extrait de l'analyse sous Genevestigator^a des résultats de puces 22K. L'échelle de bleu représente une expression croissante (blanc : expression nulle, bleu foncé : expression maximale). Les données représentent l'expression relative aux différents stades de croissance pour un même gène.

									Gène
Dark Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	<i>OSKL4</i>
Dark Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	<i>OSKL2</i>
Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Dark Blue	<i>OSKL6</i>
Light Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	<i>OSKL5</i>
Dark Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	<i>OSKL9</i>
Light Blue	Light Blue	Light Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	<i>OSKL3</i>
Light Blue	Light Blue	Light Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	<i>OSKL8</i>
Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	<i>OSKL7</i>
Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	<i>OST1</i>
Light Blue	Light Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	<i>OSKL10</i>

^a<https://www.genevestigator.ethz.ch/>

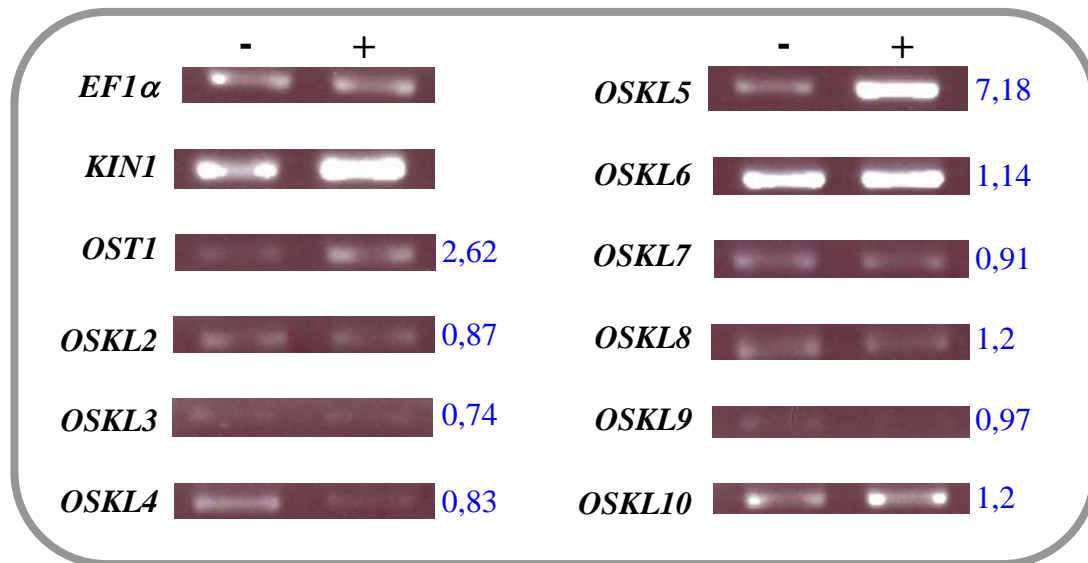


Figure V.1 : Expression des différents *SnRK2* en réponse à l'ABA

Données de RT-PCR sur racines de plantules *in vitro* de 2 semaines transférées pendant 3h sur 10μM ABA (+) ou sur un milieu contenant en même quantité son solvant, l'éthanol (-). *EF1α* est utilisé comme contrôle négatif (expression constitutive) et *KIN1* est utilisé comme contrôle positif (expression induite par l'ABA). Les chiffres en bleu indiquent le facteur d'induction de l'expression du gène en réponse à l'ABA d'après les données de 4 expériences de transcriptomique utilisant des puces à ADN "22K" regroupées dans Genevestigator (<https://www.genevestigator.ethz.ch/>).

répétitions sont représentés sur la figure V.1. Nous voyons que *OST1* semble très légèrement induit en réponse à l'ABA, ce qui est en désaccord avec les données publiées préalablement qui ne montraient aucune régulation transcriptionnelle de *OST1* par l'ABA (Mustilli et al., 2002). *OSKL5* est induit fortement alors que les autres *OSKL* ne paraissent pas régulés transcriptionnellement en réponse à un traitement par l'ABA dans nos conditions.

Là encore, j'ai souhaité conforter ces données en les comparant aux données de transcriptomique de Genevestigator. J'ai utilisé l'outil "Response Viewer" qui permet d'analyser l'expression d'un gène en réponse à différents paramètres dont de nombreux stress biotiques et abiotiques. Les facteurs d'induction des dix gènes *SnRK2* par l'ABA, calculés à partir de 4 expériences indépendantes, sont indiqués sur la figure V.1. Nous remarquons qu'ils sont encore une fois bien corrélés avec nos résultats de RT-PCR. Ainsi, le gène *OST1* semble très légèrement induit transcriptionnellement par l'ABA, ce qui a été retrouvé dans une expérience de transcriptomique sur des cellules de garde, non incorporée dans la base Genevestigator (Leonhardt et al., 2004). D'autre part, le gène *OSKL5* est le seul gène fortement induit en réponse à l'ABA.

J'ai profité des données de Genevestigator pour repérer d'éventuels facteurs qui réguleraient l'expression de certains gènes *SnRK2*. La sénescence induit très fortement l'expression des gènes *OSKL4* (facteur d'induction 12,73) et *OSKL10* (facteur d'induction 11,27), ce qui est en accord, au moins pour *OSKL4*, avec les profils d'expression. Enfin, le gène *OSKL9* est fortement réprimé par la sénescence (facteur d'induction 0,29) et par la lumière (facteur d'induction autour de 0,35).

II. D'AUTRES SNRK2 PEUVENT-ELLES REMPLACER OST1 ?

Des travaux ont montré que les gènes *OST1*, *OSKL2* et *OSKL3* forment la classe III des *SnRK2* d'*Arabidopsis* et sont fortement activés en réponse à l'ABA (Boudsocq et al., 2004). De plus, l'expression de *OSKL5* est induite en réponse à l'ABA et l'activité kinase de la protéine *OSKL5* est faiblement activée par l'ABA. Enfin, les mêmes études ont montré au contraire que l'activité de *OSKL7* n'est pas modifiée en réponse à l'ABA.

Les phénotypes forts des mutants *ost1*, en comparaison avec ceux d'autres mutants de la voie de signalisation de l'ABA, suggèrent qu'il n'y a pas de redondance au niveau des cellules de garde. D'autre part, on ne sait pas si les autres *OSKL* sont exprimés dans les mêmes types cellulaires que *OST1*. Je me suis demandé si les autres *OSKL*, en particulier celles qui répondent à l'ABA, étaient capables de remplacer *OST1* lorsqu'elles sont exprimées dans les

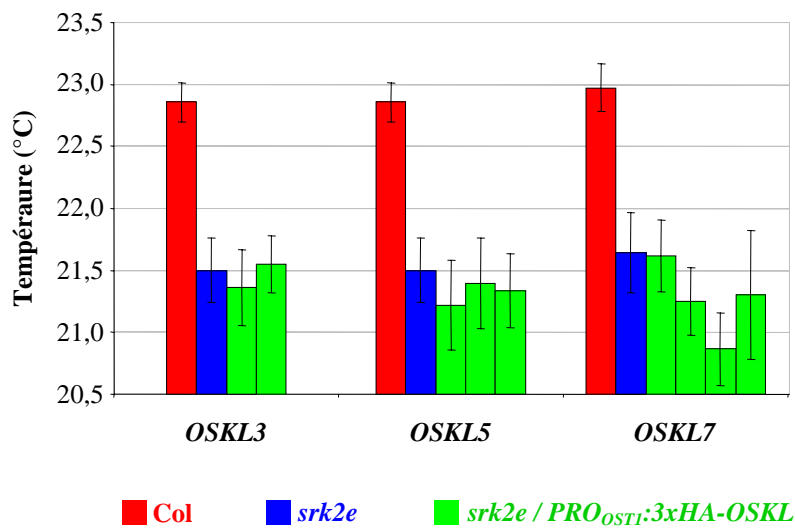


Figure V.2 : Tests de complémentation du mutant *srk2e* par d'autres SnRK2

Cet histogramme représente la quantification d'images de thermographie IR sur feuilles détachées de sauvage, de mutant *srk2e* ou de lignées exprimant des *SnRK2* des trois classes sous le contrôle du promoteur *OST1* dans le fond mutant *srk2e*. *OSKL3* représente la classe III, *OSKL5* représente la classe II et *OSKL7* représente la classe I (Figure 9). Pour les lignées transgéniques, les différentes colonnes correspondent à des lignées indépendantes.

mêmes tissus. Pour répondre à cette question, j'ai étudié la complémentation du mutant *srk2e* par un membre de chaque classe de la famille SnRK2. Pour cela, j'ai introduit dans le fond mutant *srk2e* les constructions *3xHA-OSKL3*, *3xHA-OSKL5* et *3xHA-OSKL7* sous le contrôle du promoteur *OST1*.

Les résultats des tests de complémentation sont présentés sur la figure V.2. Toutes les lignées testées présentent un phénotype mutant. L'expression de *OSKL7*, *OSKL5* ou *OSKL3* dans les cellules de garde ne permet pas de compléter le mutant *srk2e*. Malgré la grande similarité entre les séquences de *OST1* et *OSKL3*, ces protéines ne semblent donc pas fonctionnellement interchangeables. Cependant, je n'ai pas encore réalisé les western-blots sur ces lignées pour m'assurer de la présence des protéines de fusion et il faut donc rester prudent quant aux conclusions de cette expérience.

DISCUSSION GENERALE

L'objectif principal que je m'étais fixé au début de ma thèse était de mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'activité de OST1 en réponse à l'ABA. Mes premiers travaux ont consisté à mettre au point une double stratégie d'étude de l'activité kinase d'une protéine OST1 recombinante et d'analyse fonctionnelle de OST1 et de ses motifs dans le contexte cellule de garde. La levée de ces deux verrous, traitée dans les chapitres II et III de ce manuscrit, m'a permis d'identifier et d'étudier des motifs importants pour l'activité de la protéine OST1 et sa régulation en réponse à l'ABA (table VI.1).

D'une part, j'ai montré que la phosphorylation de OST1 *in planta* est nécessaire à son activité et j'ai caractérisé plusieurs résidus phosphorylables potentiellement impliqués. La sérine 175, au sein de la boucle d'activation de la protéine, est critique pour l'activité kinase de OST1. Par ailleurs, les sérines 7, 18 et 29 ne sont pas requises pour l'activité kinase de OST1 ni pour son activation par l'ABA mais sont nécessaires à la fonction de la protéine OST1 dans les cellules de garde. Enfin, la sérine 43 n'est indispensable ni à l'activité kinase de OST1 ni à sa fonction dans la voie de signalisation dans les cellules de garde mais pourrait jouer un rôle dans la régulation négative de OST1 puisque sa mutation en alanine rend la kinase constitutivement active.

D'autre part, j'ai pu caractériser des motifs importants du domaine C-terminal dont la fonction était inconnue. Tout d'abord, la "boîte SnRK2" (Gln303-Pro318), spécifique des SnRK2 et très conservée chez tous les membres de cette famille, est indispensable à l'activité kinase de la protéine OST1. En effet, la délétion de ce motif rend la kinase totalement inactive. En revanche, la seconde moitié de ce domaine C-terminal (Ala320-Met362) n'est pas indispensable à l'activité kinase de OST1 puisque les protéines recombinantes dépourvues de tout ou partie de cette région sont actives *in vitro*. Ce domaine présente une boîte extrêmement conservée chez les SnRK2 de la classe III, qui sont fortement activées en réponse à l'ABA. Cette "boîte ABA" semble avoir deux fonctions primordiales. En effet, le premier motif (Leu333-Asp348) est nécessaire à l'activation de la kinase en réponse à l'ABA et à sa fonction dans la voie de signalisation dans les cellules de garde. Au contraire, l'extrémité Asp349-Met362 n'est pas nécessaire à la fonction de OST1 dans la cellule de garde mais est probablement impliquée dans un mécanisme de régulation négative de cette fonction puisque sa délétion rend la kinase hyperinductible par l'ABA.

Enfin, la caractérisation des différents allèles de *OST1*, présentée dans le chapitre III, montre des différences phénotypiques entre le mutant codant une protéine inactive (*ost1-2*) et les allèles "nuls" *ost1-1* et *srk2e*. Ces différences suggèrent un double contrôle du flux transpiratoire des plantes par OST1, visible au niveau des feuilles détachées, mais aussi d'un

Table VI.1. *Fonctions proposées pour les différents éléments structuraux identifiés dans OST1*

	N-ter		Dom. catalytique			Boîte "SnRK2"	C-ter	
	S7	S18	S29	S43	S175		Boîte "ABA"	
							L333 - D348	D349 - M362
Activité kinase de OST1					+	+		
Activation par l'ABA dans la plante				-			+	-
Fonction dans la cellule de garde	+	+	+					

autre mécanisme inconnu, visible au niveau de la plante entière. Par ailleurs, l'impossibilité de compléter *srk2e* par d'autres OSKL suggère un mode de régulation unique de OST1 par rapport aux autres membres de la famille. Ces résultats seront interprétés et discutés en nous appuyant sur l'analyse préliminaire de la famille SnRK2 décrite dans le chapitre V de cette thèse.

I. LES MECANISMES DE REGULATION DES SNRK

1. Boucle d'activation et phosphorylation

Dans ce travail, nous avons montré l'importance de la sérine 175 de la boucle d'activation pour l'activité kinase de OST1. Il est probable que la phosphorylation de la kinase sur cette boucle d'activation est indispensable à son activité. Ce mécanisme est assez répandu au sein de la superfamille des "kinases eucaryotes" (Hanks and Hunter, 1995) et semble généralisable à toutes les SnRK puisque des études ont montré que les SnRK1 et les SnRK3 sont également activées par phosphorylation de la boucle d'activation (Hardie et al., 1998; Guo et al., 2001). En revanche, dans ces familles, le résidu phosphorylé est une thréonine qui occupe exactement la même position dans la boucle d'activation que la sérine 175 de OST1. Chez les SnRK2 de riz et d'*Arabidopsis*, cette position est toujours occupée par une sérine, excepté chez OSKL4 qui présente une thréonine (supplemental figure 1). Il est donc probable que les SnRK2 partagent un mécanisme de régulation commun avec les autres SnRK, via la phosphorylation au niveau de la même position dans la boucle d'activation.

Nous avons montré que la mutation de la sérine 175 en aspartate a, dans notre cas, le même effet que sa mutation en alanine et ne mime donc pas une phosphorylation constitutive. La mutation de la thréonine homologue à la sérine S175 de OST1 (T168D) aboutit à une kinase constitutivement active dans le cas de SOS2 (Guo et al., 2001). Le même résultat a été retrouvé avec d'autres membres de la famille SnRK3, PKS6, PKS11 et PKS18 (Gong et al., 2002; Gong et al., 2002; Gong et al., 2002). Les auteurs suggèrent à partir de ce résultat que les protéines SnRK3 pourraient être activées par phosphorylation de ce résidu par une kinase en amont. Cependant, ils n'ont pas testé d'autre substitution de ce résidu et il n'est donc pas possible de déterminer si la mutation introduite mime réellement une phosphorylation constitutive dans le cas des SnRK3.

La position de ces résidus phosphorylés est l'une des seules conservées entre les SnRK2 et les autres SnRK au sein de cette boucle d'activation. La figure VI.1 montre en effet que les

résidus de la boucle d'activation sont pour la plupart strictement identiques chez toutes les SnRK2 mais très peu conservés chez les autres SnRK. Ces différences suggèrent qu'il existe des mécanismes spécifiques de régulation par la boucle d'activation pour chacune des familles SnRK. Cette spécificité de séquence de la boucle d'activation pourrait expliquer que la même mutation du résidu phosphorylé en aspartate a des conséquences différentes chez OST1 et chez les SnRK3. D'autre part, 2 des 6 autres résidus conservés chez l'ensemble des SnRK sont des résidus phosphorylables (sérine et tyrosine respectivement – figure VI.1) et la mutation de ces résidus en aspartate chez les SnRK3 augmente l'activité kinase de ces protéines (Gong et al., 2002; Gong et al., 2002). Ces travaux, ainsi que la conservation de ces résidus, suggèrent leur implication dans la régulation de l'activité kinase des SnRK par la boucle d'activation. Cependant, la phosphorylation de ces deux résidus n'a pas été observée sur la protéine OST1 recombinante active.

2. Des domaines C-terminaux très divergents entre les SnRK.

Les SnRK1 possèdent un domaine C-terminal responsable de l'interaction de la sous-unité catalytique (AKIN α) avec les sous-unités régulatrices (AKIN β , AKIN γ , AKIN $\beta\gamma$) du complexe kinase (Halford et al., 2003). Les SnRK3 possèdent un domaine C-terminal auto-inhibiteur puisque la délétion de ce domaine rend les kinases recombinantes actives (Guo et al., 2001). Ce domaine possède un motif FISL responsable de l'interaction avec les protéines de liaison au calcium de la famille ScaBP, permettant d'activer la kinase. Nos travaux montrent que le domaine C-terminal des SnRK2 n'est pas un domaine auto-inhibiteur puisque la protéine OST1 recombinante entière est active *in vitro* et, au contraire, la délétion du domaine C-terminal abolit totalement l'activité kinase. Ce domaine possède une boîte spécifique indispensable à l'activité de la kinase et très conservée au sein de la famille (figure I.7 et supplemental figure 1). Ceci suggère qu'il existe donc, comme pour les SnRK3, un mécanisme commun de régulation de l'activité des SnRK2. Cependant, nous ne disposons pour l'instant d'aucun indice qui nous permettrait de mieux comprendre la fonction de ce motif régulateur. La seconde partie du domaine C-terminal des SnRK2 semble quant à elle être plus spécifique de la fonction de chacune des kinases : elle n'est pas du tout conservée entre les trois classes des SnRK2, même si elle présente dans tous les cas de nombreux résidus acides (figure I.7 et supplemental figure 1).

DFGLSNIMRDGHFL-K T SCGSPNYA A PE	AKIN10	SnRK1
DFGLSALPQEGVELLR T TCGTPNYVA A PE	SOS2	SnRK3
DFG Y SKSS-LLHSR P K S TVGTPAYIA A PE	AtOSKL7	}
DFG Y SKSS-LLHSM P K S TVGTPAYIA A PE	AtOSKL6	
DFG Y SKSS-ILHSR P K S TVGTPAYIA A PE	AtOSKL8	
DFG Y SKSS-LLHSR P K S TVGTPAYIA A PE	AtOSKL9	
DFG Y SKSS-LLH S K P K S TVGTPAYIA A PE	SAPK6	
DFG Y SKSS-LLH S K P K S TVGTPAYIA A PE	SAPK7	
DFG Y SKSS-VLHSR P K S AVGTPAYIA A PE	SAPK4	
DFG Y SKSS-VLHSN P K S TVGTPAYIA A PE	AtOSKL10	
DFG Y SKSS-LLHSR P K S TVGTPAYIA A PE	SAPK5	
DFG Y SKSA-LLH S K P K S TVGTPAYIA A PE	SAPK3	
DFG Y SKSS-LLH S Q P K S TVGTPAYIA A PE	SAPK2	
DFG Y SKSS-VLH S Q P K S TVGTPAYIA A PE	SAPK1	
DFG Y SKSG-VLH S Q P K T TVGTPAYIA A PE	AtOSKL4	
DFG Y SKSS-VLH S Q P K S TVGTPAYIA A PE	AtOSKL5	
DFG Y SKSS-VLH S Q P K S TVGTPAYVA A PE	SAPK8	
DFG Y SKSS-VLH S Q P K S TVGTPAYIA A PE	SAPK9	
DFG Y SKSS-VLH S Q P K S TVGTPAYIA A PE	SAPK10	
DFG Y SKSS-VLH S Q P K S TVGTPAYIA A PE	AtOSKL2	
DFG Y SKSS-VLH S Q P K S TVGTPAYIA A PE	AtOSKL3	
DFG Y SKSS-VLH S Q P K S TVGTPAYIA A PE	AtOST1	

Figure VI.1 : Boucles d'activation des SnRK

Alignement des séquences des boucles d'activation des SnRK2 de riz et d'Arabidopsis d'AKIN10 (SnRK1 d'Arabidopsis) et de SOS2 (SnRK3 d'Arabidopsis). Les triplets DFG et APE qui marquent les bornes des boucles d'activation sont indiqués en rouge. Le résidu S ou T correspondant à la position de la sérine 175 de OST1 est également indiqué en rouge. Les résidus en gras sont identiques à celui présent dans OST1 à la même position, ou ont les mêmes propriétés physico-chimiques. Les étoiles bleues indiquent les résidus phosphorylables conservés impliqués dans l'activation des SnRK3.

II. REGULATION DE OST1 PAR PHOSPHORYLATION ET DEPHOSPHORYLATION

J'ai démontré au cours de cette étude l'importance de la phosphorylation *in planta* pour l'activité de la protéine OST1. En effet, la déphosphorylation de la protéine OST1 abolit son activation par l'ABA (figure I.2). De plus, j'ai identifié plusieurs sites de phosphorylation importants pour la fonction de la protéine OST1 (table VI.1). En dehors de la sérine 175, présente dans la boucle d'activation et dont nous avons déjà discuté dans le paragraphe précédent, nous avons identifié quatre autres sérines phosphorylées sur la protéine OST1 recombinante active et dont la mutation affecte la fonction ou la régulation de l'activité : les sérines 7 et 18 dans le peptide N-terminal et les sérines 29 et 43 dans le domaine catalytique.

1. Importance des sérines et de leur phosphorylation

Les mutations sur les sérines 7, 18 et 29 n'ont aucun effet sur l'activité de la kinase ni sur son activation en réponse à l'ABA dans la plante mais affectent en revanche sa fonction dans la cellule de garde (figure I.6). Ces résultats sont en accord avec une étude récemment publiée qui a montré que la délétion des 12 premiers résidus du domaine N-terminal de OST1, dans lequel se trouvent la sérine 7, n'affecte pas l'activation de la kinase par l'ABA mais affecte seulement l'intensité de l'activité kinase (Yoshida et al., 2006). Cependant, la présence d'une extension N-terminale de 19 résidus devant le domaine catalytique des SnRK2 est spécifique de la classe III de cette famille qui regroupe les protéines fortement activées par l'ABA (figure 9 et supplemental figure 1). Le domaine N-terminal pourrait donc être nécessaire à la transduction du signal ABA non pas via la régulation de la kinase mais plus probablement via la sélection et le recrutement de substrats spécifiques de cette voie de signalisation, l'interaction avec des partenaires spécifiques pour former un complexe de transduction du signal ou le contrôle de la localisation subcellulaire de la protéine kinase. La même hypothèse peut être formulée pour la sérine 29 qui se trouve au milieu du site de fixation de l'ATP mais dont la mutation n'altère pas la régulation de la kinase OST1 en réponse à l'ABA.

Bien que les sérines étudiées aient été identifiées parce qu'elles étaient phosphorylées au sein de la protéine OST1 recombinante, il n'est pas certain que leur phosphorylation ait lieu *in planta*. En effet, nous avons observé la phosphorylation de résidus de l'étiquette 10xHis N-terminale sur la protéine recombinante, ce qui prouve que les phosphorylations détectées n'ont pas nécessairement une signification fonctionnelle. Ainsi, on pourrait aussi imaginer un rôle structural de ces sérines dans la participation de OST1 à des complexes ou dans sa

localisation cellulaire. En effet, le groupement hydroxyle des sérines est propice à la formation de liaisons hydrogènes participant aux interactions d'une protéine avec ses partenaires. La recherche de sites de phosphorylation par spectrométrie de masse sur des protéines OST1 immunopurifiées à partir de plantes traitées ou non par l'ABA permettrait probablement de répondre à cette question. Une telle approche a été engagée au sein d'un projet impliquant plusieurs équipes de l'ISV. Cependant, ces études nécessitent la purification d'une grande quantité de protéine endogène avec un degré de pureté élevé, ce qui représente une difficulté supérieure par rapport à l'analyse de protéines recombinantes.

La substitution de la sérine 43 en alanine rend OST1 constitutivement activée *in planta* et insensible à l'ABA (figure I.6). Ce résultat suggère que cette sérine serait la cible d'une régulation négative de OST1 en absence d'ABA. Dans ce cas, il semble clair que des évènements de phosphorylation et déphosphorylation affectent ce résidu dans la plante. En absence d'ABA, la sérine 43 serait phosphorylée et réprimerait l'activité kinase de OST1 et l'ABA induirait l'activation de la protéine OST1 via la déphosphorylation de cette sérine 43. Ce modèle est en accord avec la position de la sérine au sein du domaine catalytique. En effet, ce résidu est situé au milieu de la région définissant le petit lobe de fixation de l'ATP et on pourrait imaginer que la présence d'un groupement phosphate encombre ce lobe et entre en compétition pour l'établissement de liaisons hydrogènes entre les groupements phosphates de l'ATP et certains résidus. Cependant, cette hypothèse n'est pas soutenue par les résultats d'activité *in vitro* des protéines recombinantes. En effet, OST1 recombinante phosphorylée sur la sérine 43, OST1^{S43A} et OST1^{S43D} ont une activité kinase équivalente.

2. La régulation de l'état de phosphorylation de OST1

L'hypothèse selon laquelle l'activation de OST1 par l'ABA *in planta* met en jeu la déphosphorylation de la sérine 43 suggère l'implication d'une protéine phosphatase dans l'activation de OST1 en réponse à l'ABA. Il serait intéressant d'étudier dans le cadre d'une telle hypothèse l'activité de OST1 en réponse à l'ABA dans le mutant *rcn1*, affecté dans la sous-unité régulatrice d'une PP2A et présentant des défauts de réponse des stomates à l'ABA (Kwak et al., 2002), ou dans d'autres mutants de protéines phosphatases régulant positivement la transduction du signal ABA dans les cellules de garde. Les PP2C ne sont pas de bonnes candidates pour cette fonction puisque ce sont des régulateurs négatifs des voies de signalisation ABA. Selon le même modèle, il est nécessaire d'envisager des mécanismes de phosphorylation de cette sérine qui permettrait le maintien d'un état inactif en absence du signal ABA via une kinase régulant négativement cette voie de signalisation. La seule kinase

connue à ce jour comme régulateur négatif de la signalisation ABA dans les cellules de garde est PKS3, une des SnRK3. Le mutant *pks3* présente en effet une hypersensibilité de la réponse stomatique à l'ABA, de même que le mutant de la protéine de liaison au calcium associée, *scabp5* (Guo et al., 2002). Il serait intéressant d'étudier l'activité de la protéine OST1 en réponse à l'ABA dans les mutants *pks3* et *scabp5*.

La protéine OST1 recombinante et la protéine OST1 endogène sont capables de s'autophosphoryler *in vitro* (figures I.1 et I.2). L'autophosphorylation pourrait participer au contrôle par OST1 de sa propre activité. Cependant mon travail ne permet pas de savoir si cette autophosphorylation a lieu dans la plante et si elle y a une importance fonctionnelle. Néanmoins, l'activation de la protéine OST1 en réponse à l'ABA est insensible à l'action de la staurosporine, un inhibiteur de certaines protéines kinases dont les SnRK2 (communication personnelle Christiane Laurière). Ce résultat suggère qu'une kinase insensible à la staurosporine est nécessaire à l'activation de OST1 *in planta*. L'autophosphorylation ne serait donc pas le principal mécanisme permettant l'activation de OST1.

Enfin, les PP2C ABI1, ABI2, HAB1 et AtPP2C-HA régulent négativement la transduction du signal ABA, notamment dans les cellules de garde (Gosti et al., 1999; Merlot et al., 2001; Leonhardt et al., 2004; Saez et al., 2004; Kuhn et al., 2006). Par ailleurs, l'activité de la protéine OST1 en réponse à l'ABA est affectée dans le mutant dominant *abi1-1* (Mustilli et al., 2002; Yoshida et al., 2006). De plus, ABI1, au contraire de ABI2, est capable d'interagir avec OST1 en système double-hybride (Yoshida et al., 2006). Toutes ces données suggèrent l'implication d'au moins une PP2C (ABI1) dans la régulation négative de l'activité de la protéine OST1. Les travaux réalisés sur HAB1 au cours de ma thèse n'ont pas fourni d'arguments en faveur de l'implication de HAB1 dans la régulation de OST1. Je n'ai étudié que le mutant "knock-out" *hab1-1* et il aurait été plus judicieux d'analyser l'activité de OST1 dans le mutant dominant *hab1* portant la même substitution (G246D) que l'allèle *abi1-1* (G180D) afin de pouvoir comparer les effets de HAB1 et ABI1 sur l'activité de OST1. Cependant, comme on ne connaît pas le mécanisme qui rend ces allèles dominants, ces résultats ne permettent pas de conclure de manière formelle quant à l'implication des PP2C dans la régulation de OST1.

III. LES FONCTIONS DU DOMAINE C-TERMINAL

Nous avons identifié 2 motifs importants pour la fonction de OST1 dans le domaine C-terminal (figure I.7 et supplemental figure 1). La boîte SnRK2 est nécessaire à l'activité kinase de OST1 et sa forte conservation au sein de la famille indique qu'elle est impliquée dans un mécanisme général d'activation des kinases SnRK2. La boîte ABA, spécifique de la classe III des SnRK2, contient 2 motifs ayant un rôle opposé dans la régulation de OST1 : le motif L333-D348 est nécessaire à l'activation de la kinase par l'ABA alors que la délétion du motif D349-M362 rend la kinase hyperactivée en réponse à l'ABA. Ce dernier résultat est en accord avec les travaux qui montrent l'interaction de ABI1 avec la région du domaine C-terminal comprise entre les résidus Ala320 et Met362 (Yoshida et al., 2006).

1. Un domaine C-terminal très spécifique

Les résultats du chapitre V suggèrent que OSKL3 n'est pas capable de remplacer la protéine OST1 dans la cellule de garde. La séquence de cette protéine est pourtant très similaire à celle de OST1 et OSKL3 est également activée en réponse à l'ABA. On peut alors s'interroger quant à la spécificité de la fonction de OST1. Deux hypothèses sont à prendre en considération : soit OST1 et OSKL3 sont régulées différemment en réponse à l'ABA, soit ces deux SnRK2 ont des spécificités de substrats qui les rend non interchangeables. Il sera dans un premier temps nécessaire de vérifier si la protéine de fusion est bien exprimée dans les cellules de garde. Dans un second temps, la mesure des activités kinases après immunoprécipitation de la protéine de fusion 3xHA-OSKL3 de plantes traitées ou non par l'ABA permettra de savoir si OSKL3 peut être, comme OST1, activée par l'ABA dans les cellules de garde.

L'analyse de l'alignement des séquences de ces deux protéines montre qu'elles ne possèdent que très peu de motifs non conservés. La région la moins conservée entre OST1 et OSKL3 se trouve entre les boîtes "SnRK2" et "ABA" (figure I.7). Nous n'avons pour l'instant trouvé aucun argument permettant de définir une fonction particulière de ce motif. Ce résultat nous permet cependant d'envisager qu'il serait spécifique de la voie de signalisation dans laquelle intervient OST1. Des échanges de motifs entre les protéines OST1 et OSKL3 et des tests de complémentation à l'aide de telles protéines chimères permettraient de tester l'hypothèse selon laquelle ce motif Ala320-Ser332 est impliqué dans la spécificité de fonction de OST1 dans la cellule de garde, par rapport à OSKL3.

2. Domaine C-terminal et quantité de protéine OST1

Dans le chapitre IV, des observations nous ont amené à étudier la quantité de protéine OST1 en réponse à l'ABA. Le fait que l'ABA puisse réguler dans un premier temps, par l'intermédiaire de mécanismes précoces, l'activité de la protéine OST1 puis, de manière plus lente la quantité de la protéine OST1 nous paraissait une hypothèse intéressante. En effet, cette augmentation de la quantité de protéine OST1 en réponse à un stress prolongé pourrait être responsable du maintien d'une répression de l'ouverture stomatique en cas de prolongation du stress subi ou de la "mémorisation" par la plante du stress subi, ce qui lui permettrait de mettre en place des réactions plus rapides et plus intenses en réponse à un nouveau stress.

Les expériences réalisées au cours de cette thèse n'ont pas montré de régulation de la quantité de la protéine OST1 par l'ABA dans les cellules de garde d'une plante sauvage (figure IV.2E). Cependant, les résultats sur les racines des lignées exprimant la construction *3xHA-OST1* sous le contrôle du promoteur *35S* indiquent clairement, de manière reproductible que la quantité de la protéine de fusion est induite en réponse à un traitement d'une durée supérieure à 1 heure par l'ABA. Nous pouvons alors nous demander d'où viennent les différences observées entre ces deux conditions. Nous étudions la quantité nette de protéine OST1 par western-blot sans prendre en compte l'aspect dynamique de sa régulation. Une hypothèse serait donc que la quantité de protéine OST1 reste la même dans un contexte sauvage grâce à un contrôle par l'ABA d'un équilibre entre sa production et sa dégradation. Cet équilibre serait rompu dans le cas où *OST1* serait exprimé sous le contrôle du promoteur *35S*. Nous pourrions tester cette hypothèse en utilisant des inhibiteurs de traduction ou de protéolyse et des mutants affectés dans les processus de dégradation des protéines (sumoïlation, ubiquitination, protéasome).

Nous avons observé que toutes les versions tronquées étaient présentes en quantité supérieure aux versions entières dans les lignées exprimant ces constructions sous le contrôle du promoteur OST1 et en fusion avec l'étiquette 3xHA N-terminale (figure IV.2B). D'une part, la forte accumulation de la protéine OST1 Δ 348 pourrait rendre compte de l'hyperactivation en réponse à l'ABA par le simple fait que plus de protéines sont disponibles pour être activées. D'autre part, ces résultats suggèrent que le motif Asp349-Met362 joue un rôle dans le contrôle négatif de la quantité de protéine OST1 en absence d'ABA. Des travaux récents montrent que ABI1, régulateur négatif de la transduction du signal ABA est capable d'interagir avec le domaine C-terminal de OST1 (Yoshida et al., 2006). Nous proposons l'hypothèse selon laquelle ABI1 interagit avec le motif Asp349-Met362 de ce domaine pour

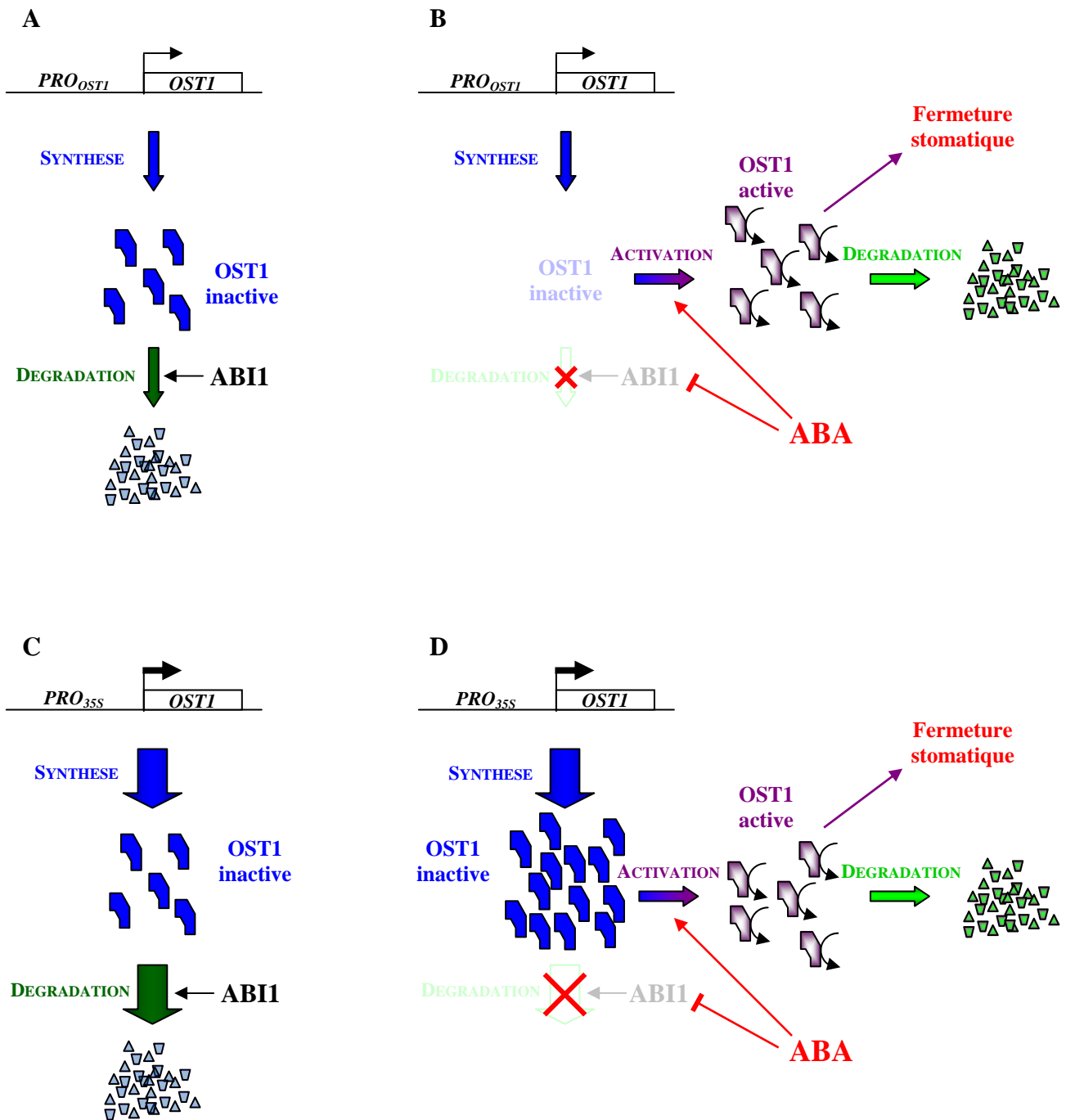


Figure VI.2 : Modèle de régulation de la quantité de protéine OST1 par l'ABA et ABI1

A,B. Contexte sauvage. **C,D.** Expression de 3xHA-OST1 sous le contrôle du promoteur 35S. **A,C.** En absence d'activation par l'ABA, un processus de dégradation contrôlé par ABI1 (vert foncé) équilibre la synthèse de OST1 (bleu). **B,D.** L'ABA (rouge) inhibe la voie de dégradation contrôlée par ABI1 et active OST1. Cette activation entraîne la mise en place d'une seconde voie de dégradation (vert clair). **C.** Dans un contexte sauvage, cette voie de dégradation équilibre la synthèse de OST1. La quantité de protéine reste stable. **D.** Dans les surexprimeurs, la saturation des mécanismes d'activation en réponse à l'ABA provoque une accumulation de protéine inactive. La quantité de protéine OST1 (active et inactive) augmente.

réguler négativement la quantité de protéine OST1 et/ou son activité. Il serait intéressant de comparer la quantité et l'activité des versions OST1 et OST1 Δ 348 dans le mutant *abi1-1* pour tester cette hypothèse.

La figure VI.2 propose un modèle qui intègre les deux hypothèses décrites précédemment : la régulation de la quantité de protéine OST1 par un équilibre dynamique entre voies de synthèse et de dégradation et la fonction de ABI1 dans ce mécanisme de régulation. Selon ce modèle, OST1 pourrait être dégradée par deux voies : une voie, régulée par ABI1 en absence d'ABA, contrôlant le pool de OST1 activable et une seconde voie spécifique de la forme activée, comme cela a été observé chez d'autres kinases (Wilkinson and Nixon, 1998). La saturation des mécanismes d'activation de OST1 par l'ABA permettrait d'expliquer l'augmentation de la quantité de protéine OST1 observée en réponse à l'ABA dans les lignées exprimant la construction *3xHA-OST1* sous le contrôle du promoteur *35S*.

IV. FONCTIONS DE OST1 ET REDONDANCE AVEC LES SnRK2 DANS LA PLANTE

1. OST1 : la seule SnRK2 dans les cellules de garde ?

Les trois membres de la classe III, OST1, OSKL2 et OSKL3 (figure 9) étant activés en réponse à l'ABA, il est raisonnable de se demander si OST1 est le seul membre des SnRK2 à être impliqué dans la transduction du signal ABA dans les cellules de garde. La combinaison de plusieurs résultats permet de se faire un avis tranché sur la question. Tout d'abord, les mutants *ost1* présentent des phénotypes forts d'insensibilité à l'ABA, ce qui suggère qu'il n'y a pas de redondance avec d'autres SnRK2 au sein des cellules de garde. De plus, nos travaux suggèrent que OSKL3, l'une des deux autres SnRK2 de la classe III, est incapable de remplacer la fonction de OST1 dans la cellule de garde. Enfin, le gel d'activité sur extraits protéiques de cellules de garde, présenté sur la figure I.5B, indique que OST1 est probablement la seule SnRK2 activée par l'ABA dans les cellules de garde. En effet, les kinases OST1, OSKL2 et OSKL3 étant fortement similaires, il serait logique qu'elles aient les mêmes propriétés physico-chimiques et que leurs activités soient donc détectables dans les mêmes conditions expérimentales. Toutefois, les résultats présentés montrent qu'il n'y a plus d'activité kinase induite par l'ABA à la taille correspondant aux SnRK2 dans les cellules de garde du mutant *srk2e*.

Toutes ces données nous incitent à penser que OST1 est la seule SnRK2 impliquée dans le contrôle de l'ouverture stomatique en réponse à l'ABA. Il serait intéressant, dans ce cadre,

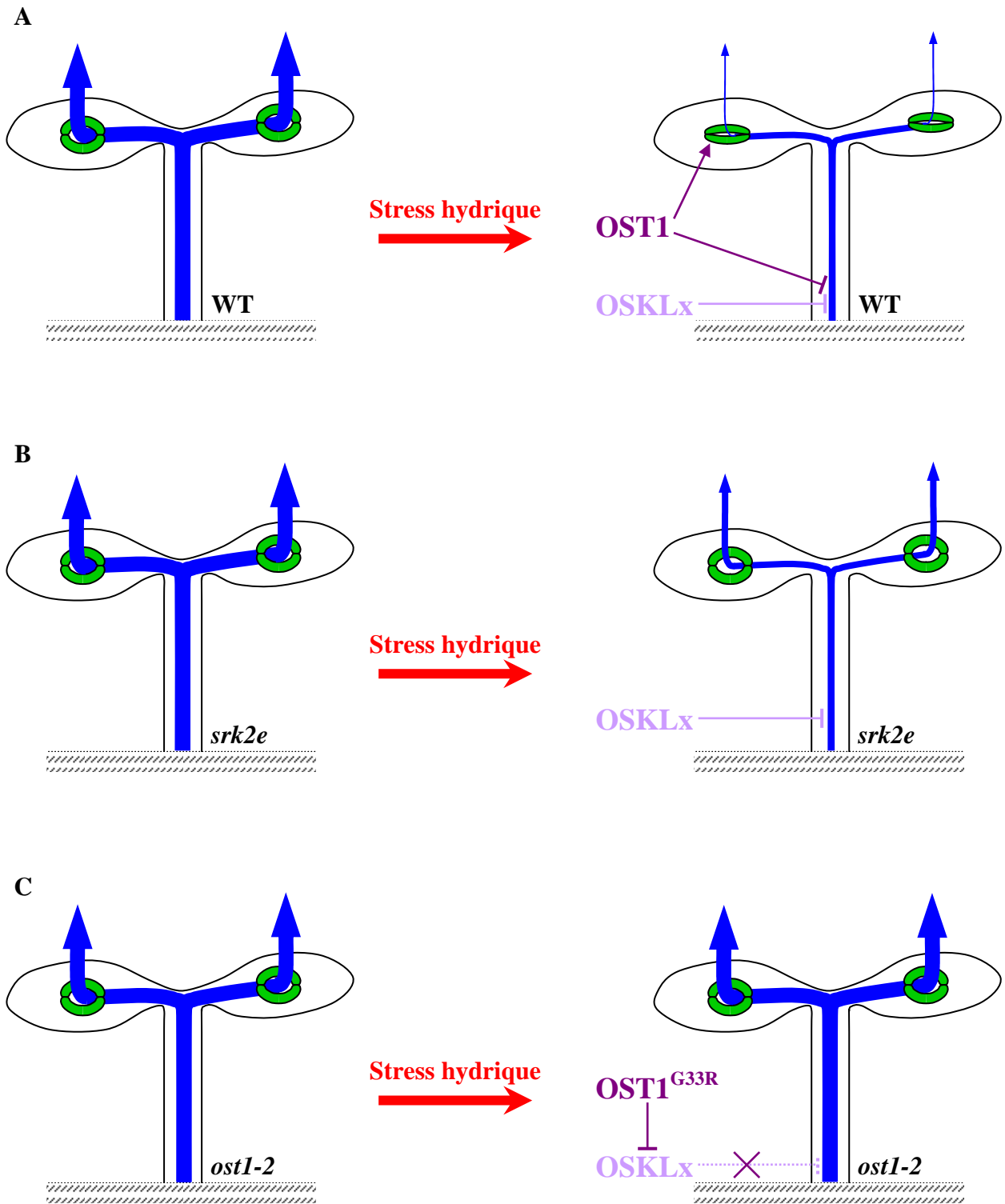


Figure VI.3 : Modèle de contrôle du flux hydrique permettant d'expliquer les phénotypes des différents allèles de OST1 en réponse à un stress hydrique

A. Plante sauvage (WT). **B.** Mutant *srk2e*. **C.** Mutant *ost1-2*.

OSKLx : autre SnRK2 d'Arabidopsis; OST1^{G33R} : protéine OST1 codée par l'allèle *ost1-2*.

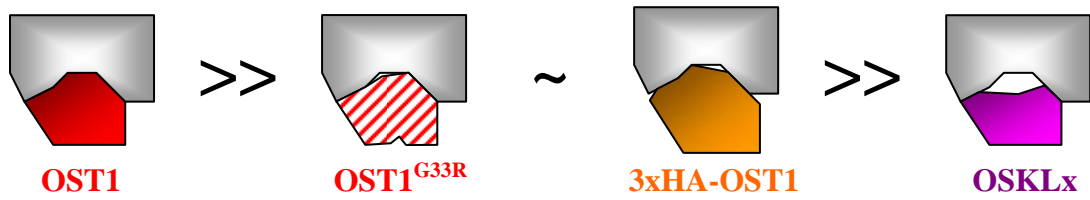
mais aussi pour comprendre la fonction de *OSKL2* et *OSKL3*, de générer des fusions transcriptionnelles entre les promoteurs de ces deux *SnRK2* et le gène rapporteur *uidA* et de réaliser des tests d'activité GUS sur les tissus des plantes exprimant ces constructions. Dans le cas où *OSKL2* et *OSKL3* ne seraient pas exprimés dans les cellules de garde, cela apporterait un argument supplémentaire pour affirmer que OST1 est la seule SnRK2 impliquée dans la réponse à l'ABA dans les cellules de garde. Afin d'appuyer ces résultats, nous pourrions réaliser des western-blots sur des extraits de cellules de garde du sauvage ou de *srk2e* à l'aide de l'anticorps reconnaissant spécifiquement les 10 SnRK2 chez Arabidopsis (Boudsocq et al., 2004). Alternativement, nous pourrions aussi réaliser un test d'activité kinase en réponse à l'ABA sur des protéines immunoprécipitées à partir de cellules de garde du mutant *srk2e* à l'aide du même anticorps.

2. Interaction entre OST1 et d'autres SnRK2 dans les autres tissus

Les phénotypes sur feuilles détachées de l'allèle nul *srk2e* et de l'allèle *ost1-2* sont similaires alors que le phénotype sur plante entière en réponse à la sécheresse est plus fort chez *ost1-2* que chez *srk2e*. Cette différence suggère que les flux d'eau observés par thermographie infrarouge sur plantes entières ne sont pas uniquement contrôlés au niveau des feuilles par l'état d'ouverture des stomates mais également par d'autres mécanismes, probablement au niveau des tissus vasculaires, dans lesquels s'exprime également *OST1*. OST1 régulerait seule les réponses stomatiques à l'ABA mais sa fonction serait redondante avec celle d'autres SnRK2 pour la régulation d'autres mécanismes contrôlant le flux d'eau au sein de la plante. La redondance entre différentes SnRK2 au niveau des tissus vasculaires permettrait aux mutants nuls de conserver une composante de la régulation des flux d'eau par l'ABA alors que dans le mutant *ost1-2*, la compétition entre la protéine inactive OST1^{G33R} et les autres SnRK2, proposée au chapitre III, affecterait également le contrôle racinaire des flux d'eau par l'ABA. Le modèle reposant sur ces hypothèses (figure VI.3) rend compte des différences de phénotypes entre les différents allèles de *OST1*.

Ce modèle semble cependant en contradiction avec le caractère récessif de la mutation *ost1-2* (Mustilli et al., 2002). En effet, dans une plante hétérozygote portant un allèle *ost1-2* et un allèle OST1 sauvage, la protéine OST1^{G33R} entrerait en compétition avec la protéine OST1 et inhiberait sa fonction dans la transduction du signal ABA. Cela semble d'ailleurs être le cas dans les lignées exprimant une construction *3xHA-OST1* dans le mutant homozygote *ost1-2* (Chapitre III). Une plante hétérozygote *ost1-2/OST1* devrait donc présenter un phénotype intermédiaire entre le sauvage et le mutant homozygote *ost1-2*. Il est possible que ce soit le

A



B

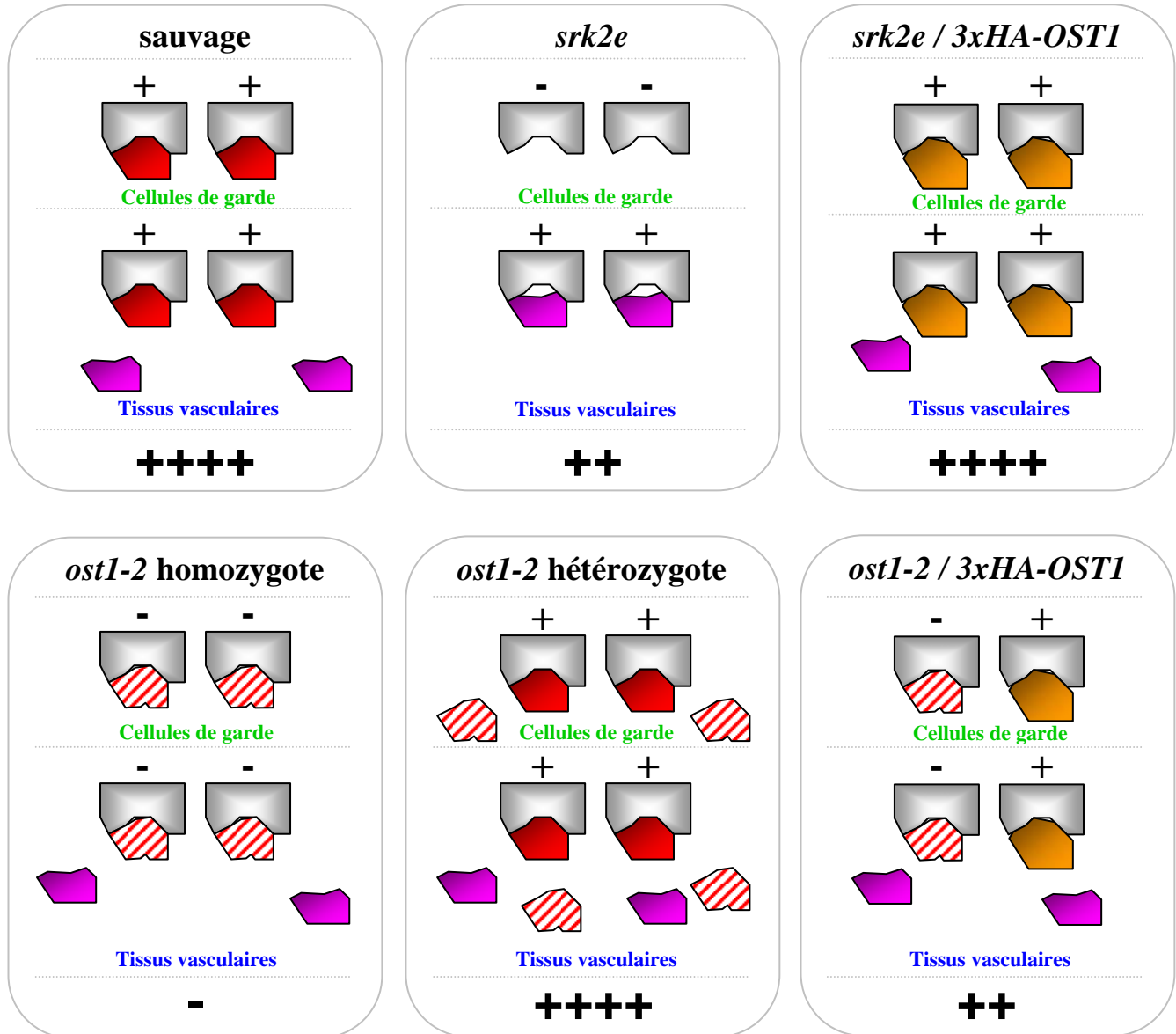


Figure VI.4 : un modèle permettant d'expliquer les phénotypes des différents génotypes

A. Des affinités différentes de OST1, OST1^{G33R}, 3xHA-OST1 et OSKLx pour le complexe de signalisation (gris). **B.** Interactions de OST1, OST1^{G33R}, 3xHA-OST1 et OSKLx avec les complexes de signalisation (gris) dans les cellules de garde ou dans les tissus vasculaires dans chacun des génotypes. Le phénotype observé est la diminution du flux transpiratoire en réponse à l'ABA (- : pas de réponse, ++ : réponse faible, ++++ : réponse forte).

cas et que lors des tests de ségrégation réalisés par thermographie infrarouge, seuls les phénotypes forts, présentant une forte différence de température avec le sauvage aient été pris en compte du fait de la difficulté à distinguer de faibles différences de températures. L'étude de la ségrégation en seconde génération d'un croisement entre *ost1-2* et le sauvage nous permettrait de le vérifier. Une deuxième hypothèse permet cependant de réconcilier la redondance dans les tissus vasculaires, la compétition entre OST1^{G33R} et les OSKL, le caractère récessif du mutant *ost1-2* et le défaut de complémentation des lignées exprimant la fusion 3xHA-OST1 dans le fond mutant *ost1-2*. Elle suppose des affinités différentes de ces protéines pour un partenaire ou un complexe de signalisation dans lequel OST1 serait impliquée, de même qu'une autre SnRK2 (OSKLx) dans les tissus vasculaires. La figure VI.4 propose un modèle dans lequel OST1 a une affinité très forte pour ce partenaire, OSKLx a une affinité très faible pour ce partenaire et OST1^{G33R} et 3xHA-OST1 ont des affinités similaires et intermédiaires entre OST1 et OSKLx, du fait des modifications structurales affectant la kinase. Dans les plantes hétérozygotes pour la mutation *ost1-2*, OST1 interagirait avec le partenaire préférentiellement à OST1^{G33R} du fait de son affinité supérieure, d'où le caractère récessif de cette mutation. Au contraire, dans les lignées 3xHA-OST1, la protéine de fusion active entrerait en compétition avec OST1^{G33R} du fait de leurs affinités similaires pour le partenaire. Un effet dose pourrait alors expliquer que la complémentation du phénotype mutant n'est que partielle dans ces lignées. Ce modèle permettrait enfin d'expliquer que la complémentation du mutant *ost1-2* obtenue en insérant un vecteur contenant l'ADN génomique *PRO_{OST1}:OST1* semble totale (Mustilli et al., 2002).

PERSPECTIVES

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis de caractériser certains mécanismes d'activation de la protéine OST1 dans la voie de signalisation de l'ABA dans la cellule de garde d'*Arabidopsis thaliana*. De plus, comme nous venons de le voir dans la discussion générale, ils soulèvent de nombreuses questions et amènent à formuler plusieurs hypothèses quant à la régulation de la protéine OST1 en réponse à l'ABA.

Si je devais continuer mes travaux sur OST1, je me concentrerais en premier sur la fonction de la boîte ABA en étudiant notamment l'activité des versions OST1 et OST1 Δ 348 en réponse à l'ABA dans les mutants *abi1*. D'autre part, une analyse comparative poussée de OST1 et OSKL3 en testant à court terme l'activation de OSKL3 par l'ABA dans les cellules de garde et en réalisant, à plus long terme, des expériences d'échanges entre les domaines non conservés de ces deux SnRK2 me permettrait de définir des motifs et d'envisager des mécanismes responsables de la spécificité de fonction de OST1 dans la cellule de garde. D'autre part, la sérine 43 semble être la cible d'une kinase réprimant la transduction du signal ABA. L'étude de l'activité *in planta* de la version OST1^{S43A} dans des mutants de protéines kinases ou phosphatases nous permettrait peut-être d'identifier des régulateurs de la protéine OST1 dans les cellules de garde. Enfin, il serait intéressant d'analyser l'effet de la combinaison de la mutation S43A et de la délétion du motif Asp349 – Met362 qui pourrait aboutir à une protéine OST1 constitutivement superactive.

Durant ma thèse, j'ai entrepris une collaboration avec l'équipe de H. Van Thilbeurgh (IBBMC Orsay) en vue de résoudre la structure tridimensionnelle de OST1 par cristallographie aux rayons X. Un premier essai n'a pas abouti à l'obtention de cristaux. Au vu des résultats présentés dans cette thèse et des hypothèses développées, il me paraît aujourd'hui important de poursuivre ces efforts, ce qui aurait été un de mes premiers objectifs si j'étais resté au laboratoire à la fin de ma thèse. En effet, la résolution de la structure tridimensionnelle de la protéine OST1 nous permettrait de mieux comprendre l'impact des sérines sur la fonction de OST1, et notamment celui de la sérine 43 située au milieu de la région de fixation de l'ATP et probablement responsable de la répression de OST1 lorsqu'elle est phosphorylée. De même, la structure nous guiderait probablement dans l'étude de la fonction des motifs identifiés dans le domaine C-terminal, notamment la boîte SnRK2.

Les travaux présentés sur les allèles de *OST1* indiquent que OST1 est impliquée dans deux mécanismes de contrôle des flux d'eau au sein de la plante en réponse à un stress hydrique : la régulation de l'ouverture stomatique et un autre mécanisme au niveau des tissus vasculaires. Comme je l'ai proposé dans la discussion, ces travaux suggèrent que ce second mécanisme est également contrôlé, de manière redondante ou complémentaire par d'autres

SnRK2. Il serait intéressant de collaborer avec une équipe étudiant l'intégration des flux d'eau dans la plante pour approfondir cet aspect.

Des approches visant à identifier des régulateurs ou des substrats de OST1 sont aujourd'hui développées au laboratoire et pourront s'appuyer sur les outils mis en place au cours de ma thèse. Ainsi, l'anticorps polyclonal dirigé contre la protéine OST1, la stratégie développée pour l'obtention de protéines recombinantes actives, l'ensemble des lignées exprimant les différentes versions de OST1 dans le fond mutant *srk2e* et les nombreuses constructions destinées à l'expression en plantes et en bactéries de versions mutées ou tronquées de OST1 faciliteront l'étude des interactions entre OST1 et ses partenaires.

Un aspect important de l'étude de la fonction de OST1 dans les cellules de garde est l'identification de substrats phosphorylés par OST1 dans la voie de signalisation de l'ABA. Cette thématique est développée par Sylvain Merlot au sein du laboratoire principalement via une approche basée sur l'identification de séquences peptidiques préférentiellement phosphorylées par OST1 à partir d'une banque de peptides. Cette première étape sera suivie de l'étude de la capacité de OST1 à phosphoryler les protéines candidates identifiées d'après l'interrogation des bases de données à l'aide des peptides ayant obtenu les meilleurs scores.

Une analyse comparative entre OST1 et des SnRK2 impliquées dans des réponses aux stress osmotiques mais dont l'activité n'est pas induite par l'ABA (classe I) constitue le cœur du projet développé sous la direction de Christiane Laurière. Dans ce cadre, il pourra être intéressant de tester l'effet sur les SnRK2 de classe I des mutations sur les résidus et les domaines importants de OST1 révélés lors de cette thèse.

Les efforts consentis par deux groupes de l'ISV sur l'élucidation des mécanismes d'activation des SnRK2, aidés par les résultats de mon travail de thèse, devraient à terme permettre une meilleure compréhension des rôles de cette famille de kinases spécifique du règne végétal.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Ache P, Becker D, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MR, Hedrich R** (2000) GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K⁺-selective, K⁺-sensing ion channel. *FEBS Lett* **486**: 93-98
- Adams JA** (2003) Activation loop phosphorylation and catalysis in protein kinases: is there functional evidence for the autoinhibitor model? *Biochemistry* **42**: 601-607
- Addicott FT** (1983) Abscisic acid. Praeger Scientific, New York
- Allan AC, Fricker MD, Ward JL, Beale MH, Trewavas AJ** (1994) Two transduction pathways mediate rapid effects of abscisic acid in *Commelina* guard cells. *Plant Cell* **6**: 1319-1328
- Allen GJ, Chu SP, Harrington CL, Schumacher K, Hoffmann T, Tang YY, Grill E, Schroeder JI** (2001) A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* **411**: 1053-1057
- Allen GJ, Kwak JM, Chu SP, Llopis J, Tsien RY, Harper JF, Schroeder JI** (1999) Cameleon calcium indicator reports cytoplasmic calcium dynamics in *Arabidopsis* guard cells. *Plant J* **19**: 735-747
- Allen GJ, Murata Y, Chu SP, Nafisi M, Schroeder JI** (2002) Hypersensitivity of abscisic acid-induced cytosolic calcium increases in the *Arabidopsis* farnesyltransferase mutant *era1-2*. *Plant Cell* **14**: 1649-1662
- Allen GJ, Sanders D** (1995) Calcineurin, a type 2B protein phosphatase, modulates the Ca²⁺-permeable Slow Vacuolar ion channel of stomatal guard cells. *Plant Cell* **7**: 1473-1483
- Allen GJ, Sanders D** (1996) Control of ionic currents in guard cell vacuoles by cytosolic and luminal calcium. *Plant J* **10**: 1055-1069
- Anderberg RJ, Walker-Simmons MK** (1992) Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid-inducible transcript with homology to protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 10183-10187
- Anderson JA, Huprikar SS, Kochian LV, Lucas WJ, Gaber RF** (1992) Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 3736-3740
- Armstrong F, Leung J, Grabov A, Brearley J, Giraudat J, Blatt MR** (1995) Sensitivity to abscisic acid of guard-cell K⁺ channels is suppressed by *abi1-1*, a mutant *Arabidopsis* gene encoding a putative protein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 9520-9524
- Artsaenko O, Peisker M, zur Nieden U, Fiedler U, Weiler EW, Muntz K, Conrad U** (1995) Expression of a single-chain Fv antibody against abscisic acid creates a wilted phenotype in transgenic tobacco. *Plant J* **8**: 745-750
- Assante G, Merlini L, Nasini G** (1977) (+) abscisic acid, a metabolite of the fungus *Cercospora rosicola*. *Experientia* **33**: 1556-1557
- Assmann SM** (1999) The cellular basis of guard cell sensing of rising CO₂. *Plant Cell Environ* **22**: 629-637
- Assmann SM, Snyder JA, Lee YRJ** (2000) ABA-deficient (*aba1*) and ABA-insensitive (*abi1-1*, *abi2-1*) mutants of *Arabidopsis* have a wild-type stomatal response to humidity. *Plant Cell Environ* **23**: 387-395
- Baur B, Fischer K, Winter K, Dietz KJ** (1994) cDNA sequence of a protein kinase from the inducible crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum* L., encoding a SNF-1 homolog. *Plant Physiol* **106**: 1225-1226
- Beaudoin N, Serizet C, Gosti F, Giraudat J** (2000) Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* **12**: 1103-1115
- Becker D, Zeilinger C, Lohse G, Depta H, Hedrich R** (1993) Identification and biochemical characterization of the plasma-membrane H⁺-ATPase in guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* **190**: 44-50

- Bensmihen S, Rippa S, Lambert G, Jublot D, Pautot V, Granier F, Giraudat J, Parcy F** (2002) The homologous ABI5 and EEL transcription factors function antagonistically to fine-tune gene expression during late embryogenesis. *Plant Cell* **14**: 1391-1403
- Bensmihen S, To A, Lambert G, Kroj T, Giraudat J, Parcy F** (2004) Analysis of an activated ABI5 allele using a new selection method for transgenic Arabidopsis seeds. *FEBS Lett* **561**: 127-131
- Berkowitz G, Zhang X, Mercie R, Leng Q, Lawton M** (2000) Co-expression of calcium-dependent protein kinase with the inward rectified guard cell K⁺ channel KAT1 alters current parameters in *Xenopus laevis* oocytes. *Plant Cell Physiol* **41**: 785-790
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD** (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 11-21
- Blatt MR** (1992) K⁺ channels of stomatal guard cells. Characteristics of the inward rectifier and its control by pH. *J Gen Physiol* **99**: 615-644
- Blatt MR, Armstrong F** (1993) K⁺ channels of stomatal guard cells: Abscisic-acid-evoked control of the outward rectifier mediated by cytoplasmic pH. *Planta* **191**: 330-341
- Boudsocq M, Barbier-Brygoo H, Lauriere C** (2004) Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **279**: 41758-41766
- Bowman JL** (1994) *Arabidopsis : an atlas of morphology and development* / John Bowman, editor. Springer-Verlag, New York
- Boyer JS** (1982) Plant productivity and environment: Potential for increasing crop plant productivity, genotypic selection. *Science* **218**: 443-448
- Brahms S, Brahms J** (1980) Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J Mol Biol* **138**: 149-178
- Bright J, Desikan R, Hancock JT, Weir IS, Neill SJ** (2006) ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant J* **45**: 113-122
- Burnett EC, Desikan R, Moser RC, Neill SJ** (2000) ABA activation of an MBP kinase in *Pisum sativum* epidermal peels correlates with stomatal responses to ABA. *J Exp Bot* **51**: 197-205
- Burnette RN, Gunesequera BM, Gillaspay GE** (2003) An *Arabidopsis* inositol 5-phosphatase gain-of-function alters abscisic acid signaling. *Plant Physiol* **132**: 1011-1019
- Carles C, Bies-Etheve N, Aspart L, Leon-Kloosterziel KM, Koornneef M, Echeverria M, Delseny M** (2002) Regulation of *Arabidopsis thaliana* Em genes: role of ABI5. *Plant J* **30**: 373-383
- Cheng SH, Willmann MR, Chen HC, Sheen J** (2002) Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol* **129**: 469-485
- Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, Kim SY** (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem* **275**: 1723-1730
- Clapper DL, Walseth TF, Dargie PJ, Lee HC** (1987) Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol trisphosphate. *J Biol Chem* **262**: 9561-9568
- Cominelli E, Galbiati M, Vavasseur A, Conti L, Sala T, Vuylsteke M, Leonhardt N, Dellaporta SL, Tonelli C** (2005) A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance. *Curr Biol* **15**: 1196-1200
- Cornforth JW, Milborrow BV, Ryback G, Wareing PF** (1965) Chemistry and physiology of "dormins" in sycamore: Identity of sycamore "dormin" with abscisin II. *Nature* **205**: 1269-1270

- Coursol S, Fan LM, Le Stunff H, Spiegel S, Gilroy S, Assmann SM** (2003) Sphingolipid signalling in Arabidopsis guard cells involves heterotrimeric G proteins. *Nature* **423**: 651-654
- Coursol S, Le Stunff H, Lynch DV, Gilroy S, Assmann SM, Spiegel S** (2005) Arabidopsis sphingosine kinase and the effects of phytosphingosine-1-phosphate on stomatal aperture. *Plant Physiol* **137**: 724-737
- Cozzone AJ** (1988) Protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu Rev Microbiol* **42**: 97-125
- Cutler AJ, Krochko JE** (1999) Formation and breakdown of ABA. *Trends Plant Sci* **4**: 472-478
- Cutler S, Ghassemian M, Bonetta D, Cooney S, McCourt P** (1996) A protein farnesyl transferase involved in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Science* **273**: 1239-1241
- Davies JP, Yildiz FH, Grossman AR** (1999) Sac3, an Snf1-like serine/threonine kinase that positively and negatively regulates the responses of Chlamydomonas to sulfur limitation. *Plant Cell* **11**: 1179-1190
- Desikan R, Griffiths R, Hancock J, Neill S** (2002) A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 16314-16318
- DeSilva DLR, Hetherington AM, Mansfield TA** (1985) Synergism between calcium ions and abscisic acid in preventing stomatal opening. *New Phytol* **100**: 473-482
- Ellson CD, Gobert-Gosse S, Anderson KE, Davidson K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Thuring JW, Cooper MA, Lim ZY, Holmes AB, Gaffney PR, Coadwell J, Chilvers ER, Hawkins PT, Stephens LR** (2001) PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40(phox). *Nat Cell Biol* **3**: 679-682
- Eun S-O, Bae S-H, Lee Y** (2001) Cortical actin filaments in guard cells respond differently to abscisic acid in wild-type and *abi1-1* mutant in Arabidopsis. *Planta* **212**: 466-469
- Foster R, Chua NH** (1999) An Arabidopsis mutant with deregulated ABA gene expression: implications for negative regulator function. *Plant J* **17**: 363-372
- Franks PJ, Buckley TN, Shope JC, Mott KA** (2001) Guard cell volume and pressure measured concurrently by confocal microscopy and the cell pressure probe. *Plant Physiol* **125**: 1577-1584
- Franks PJ, Cowan IR, Farquhar GD** (1998) A study of stomatal mechanics using the cell pressure probe. *Plant Cell Environ* **21**: 94-100
- Furihata T, Maruyama K, Fujita Y, Umezawa T, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2006) Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 1988-1993
- Gao XQ, Li CG, Wei PC, Zhang XY, Chen J, Wang XC** (2005) The dynamic changes of tonoplasts in guard cells are important for stomatal movement in *Vicia faba*. *Plant Physiol* **139**: 1207-1216
- Garcia-Mata C, Gay R, Sokolovski S, Hills A, Lamattina L, Blatt MR** (2003) Nitric oxide regulates K⁺ and Cl⁻ channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 11116-11121
- Ghassemian M, Nambara E, Cutler S, Kawaide H, Kamiya Y, McCourt P** (2000) Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* **12**: 1117-1126
- Gilroy S, Fricker MD, Read ND, Trewavas AJ** (1991) Role of calcium in signal transduction of Commelina guard cells. *Plant Cell* **3**: 333-344
- Gilroy S, Read ND, Trewavas AJ** (1990) Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol triphosphate initiates stomatal closure. *Nature* **346**: 769-771
- Goh CH, Kinoshita T, Oku T, Shimazaki K** (1996) Inhibition of blue light-dependent H⁺ pumping by abscisic acid in *Vicia* guard-cell protoplasts. *Plant Physiol* **111**: 433-440

- Gomez-Cadenas A, Verhey SD, Holappa LD, Shen Q, Ho TH, Walker-Simmons MK** (1999) An abscisic acid-induced protein kinase, PKABA1, mediates abscisic acid-suppressed gene expression in barley aleurone layers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 1767-1772
- Gomez-Cadenas A, Zentella R, Walker-Simmons MK, Ho TH** (2001) Gibberellin/abscisic acid antagonism in barley aleurone cells: site of action of the protein kinase PKABA1 in relation to gibberellin signaling molecules. *Plant Cell* **13**: 667-679
- Gomi K, Ogawa D, Katou S, Kamada H, Nakajima N, Saji H, Soyano T, Sasabe M, Machida Y, Mitsuhashi I, Ohashi Y, Seo S** (2005) A mitogen-activated protein kinase NtMPK4 activated by SIPKK is required for jasmonic acid signaling and involved in ozone tolerance via stomatal movement in tobacco. *Plant Cell Physiol* **46**: 1902-1914
- Gong D, Gong Z, Guo Y, Chen X, Zhu JK** (2002) Biochemical and functional characterization of PKS11, a novel Arabidopsis protein kinase. *J Biol Chem* **277**: 28340-28350
- Gong D, Gong Z, Guo Y, Zhu JK** (2002) Expression, activation, and biochemical properties of a novel Arabidopsis protein kinase. *Plant Physiol* **129**: 225-234
- Gong D, Guo Y, Jagendorf AT, Zhu JK** (2002) Biochemical characterization of the Arabidopsis protein kinase SOS2 that functions in salt tolerance. *Plant Physiol* **130**: 256-264
- Gong D, Zhang C, Chen X, Gong Z, Zhu JK** (2002) Constitutive activation and transgenic evaluation of the function of an Arabidopsis PKS protein kinase. *J Biol Chem* **277**: 42088-42096
- Gosti F, Beaudoin N, Serizet C, Webb AA, Vartanian N, Giraudat J** (1999) ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell* **11**: 1897-1910
- Gowing DJG, Davies WJ, Jones HG** (1990) A positive root-sourced signal as an indicator of soil drying in apple, *Malus X domestica* Borkh. *J Exp Bot* **41**: 1535-1540
- Grabov A, Blatt MR** (1997) Parallel control of the inward-rectifier K⁺ channel by cytosolic free Ca⁺ and pH in *Vicia* guard cells. *Planta* **201**: 84-95
- Guo FQ, Okamoto M, Crawford NM** (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* **302**: 100-103
- Guo Y, Halfter U, Ishitani M, Zhu JK** (2001) Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell* **13**: 1383-1400
- Guo Y, Xiong L, Song CP, Gong D, Halfter U, Zhu JK** (2002) A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in Arabidopsis. *Dev Cell* **3**: 233-244
- Halford NG, Hey S, Jhurrea D, Laurie S, McKibbin RS, Paul M, Zhang Y** (2003) Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *J Exp Bot* **54**: 467-475
- Hanks SK, Hunter T** (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J* **9**: 576-596
- Hanks SK, Quinn AM, Hunter T** (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**: 42-52
- Hardie DG** (1999) Plant protein serine/threonine kinases: Classification and Functions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 97-131
- Hardie DG, Carling D, Carlson M** (1998) The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem* **67**: 821-855
- Himmelbach A, Hoffmann T, Leube M, Hohener B, Grill E** (2002) Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in Arabidopsis. *Embo J* **21**: 3029-3038
- Himmelbach A, Iten M, Grill E** (1998) Signalling of abscisic acid to regulate plant growth. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **353**: 1439-1444

- Holappa LD, Walker-Simmons MK** (1995) The wheat abscisic acid-responsive protein kinase mRNA, PKABA1, is up-regulated by dehydration, cold temperature, and osmotic stress. *Plant Physiol* **108**: 1203-1210
- Holappa LD, Walker-Simmons MK** (1997) The wheat protein kinase gene, TaPK3, of the PKABA1 subfamily is differentially regulated in greening wheat seedlings. *Plant Mol Biol* **33**: 935-941
- Holappa LD, Walker-Simmons MK, Ho THD, Reichers DE, Beckles DM, Jones RL** (2005) A *Triticum tauschii* protein kinase related to wheat PKABA1 is associated with ABA signaling and is distributed between the nucleus and cytosol. *J Cereal Sci* **41**: 333-346
- Homann U, Thiel G** (2002) The number of K⁺ channels in the plasma membrane of guard cell protoplasts changes in parallel with the surface area. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 10215-10220
- Hong SW, Jon JH, Kwak JM, Nam HG** (1997) Identification of a receptor-like protein kinase gene rapidly induced by abscisic acid, dehydration, high salt, and cold treatments in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **113**: 1203-1212
- Hornberg C, Weiler EW** (1984) High-affinity binding sites for abscisic acid on the plasmalemma of *Vicia faba* guard cells. *Nature* **310**: 321-324
- Hosy E, Vavasseur A, Mouline K, Dreyer I, Gaymard F, Poree F, Boucherez J, Lebaudy A, Bouchez D, Very AA, Simonneau T, Thibaud JB, Sentenac H** (2003) The *Arabidopsis* outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 5549-5554
- Hotta H, Aoki N, Matsuda T, Adachi T** (1998) Molecular analysis of a novel protein kinase in maturing rice seed. *Gene* **213**: 47-54
- Hrabak EM, Chan CW, Gribskov M, Harper JF, Choi JH, Halford N, Kudla J, Luan S, Nimmo HG, Sussman MR, Thomas M, Walker-Simmons K, Zhu JK, Harmon AC** (2003) The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol* **132**: 666-680
- Hugouvieux V, Kwak JM, Schroeder JI** (2001) An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Cell* **106**: 477-487
- Hugouvieux V, Murata Y, Young JJ, Kwak JM, Mackesy DZ, Schroeder JI** (2002) Localization, ion channel regulation, and genetic interactions during abscisic acid signaling of the nuclear mRNA cap-binding protein, ABH1. *Plant Physiol* **130**: 1276-1287
- Hunt L, Mills LN, Pical C, Leckie CP, Aitken FL, Kopka J, Mueller-Roeber B, McAinsh MR, Hetherington AM, Gray JE** (2003) Phospholipase C is required for the control of stomatal aperture by ABA. *Plant J* **34**: 47-55
- Hurst AC, Meckel T, Tayefeh S, Thiel G, Homann U** (2004) Trafficking of the plant potassium inward rectifier KAT1 in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Plant J* **37**: 391-397
- Hwang JU, Lee Y** (2001) Abscisic acid-induced actin reorganization in guard cells of dayflower is mediated by cytosolic calcium levels and by protein kinase and protein phosphatase activities. *Plant Physiol* **125**: 2120-2128
- Irving HR, Gehring CA, Parish RW** (1992) Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 1790-1794
- Ishitani M, Xiong L, Stevenson B, Zhu JK** (1997) Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis*: interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *Plant Cell* **9**: 1935-1949
- Jacob T, Ritchie S, Assmann SM, Gilroy S** (1999) Abscisic acid signal transduction in guard cells is mediated by phospholipase D activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 12192-12197
- Jahn R, Sudhof TC** (1999) Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem* **68**: 863-911

- Jeannette E, Rona JP, Bardat F, Cornel D, Sotta B, Miginiac E** (1999) Induction of RAB18 gene expression and activation of K⁺ outward rectifying channels depend on an extracellular perception of ABA in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant J* **18**: 13-22
- Johnson CD, Chary SN, Chernoff EA, Zeng Q, Running MP, Crowell DN** (2005) Protein geranylgeranyltransferase I is involved in specific aspects of abscisic acid and auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **139**: 722-733
- Johnson RR, Wagner RL, Verhey SD, Walker-Simmons MK** (2002) The abscisic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific abscisic acid response element-binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences. *Plant Physiol* **130**: 837-846
- Jones AM, Assmann SM** (2004) Plants: the latest model system for G-protein research. *EMBO Rep* **5**: 572-578
- Jung JY, Kim YW, Kwak JM, Hwang JU, Young J, Schroeder JI, Hwang I, Lee Y** (2002) Phosphatidylinositol 3- and 4-phosphate are required for normal stomatal movements. *Plant Cell* **14**: 2399-2412
- Kang JY, Choi HI, Im MY, Kim SY** (2002) *Arabidopsis* basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell* **14**: 343-357
- Keller BU, Hedrich R, Raschke K** (1989) Voltage-dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *Nature* **341**: 450-453
- Kelly SM, Jess TJ, Price NC** (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* **1751**: 119-139
- Kelner A, Pekala I, Kaczanowski S, Muszynska G, Hardie DG, Dobrowolska G** (2004) Biochemical characterization of the tobacco 42-kD protein kinase activated by osmotic stress. *Plant Physiol* **136**: 3255-3265
- Kim KN, Cheong YH, Grant JJ, Pandey GK, Luan S** (2003) CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**: 411-423
- Kinoshita T, Nishimura M, Shimazaki K** (1995) Cytosolic concentration of Ca²⁺ regulates the plasma membrane H⁺-ATPase in guard cells of fava bean. *Plant Cell* **7**: 1333-1342
- Kitagawa Y, Hamamoto H, Oritani T** (1995) Biosynthesis of abscisic acid in the fungus *Cercospora cruenta*: stimulation of biosynthesis by water stress and isolation of a transgenic mutant with reduced biosynthetic capacity. *Plant Cell Physiol* **36**: 557-564
- Klein M, Perfus-Barbeoch L, Frelet A, Gaedeke N, Reinhardt D, Mueller-Roeber B, Martinoia E, Forestier C** (2003) The plant multidrug resistance ABC transporter AtMRP5 is involved in guard cell hormonal signalling and water use. *Plant J* **33**: 119-129
- Kobayashi Y, Murata M, Minami H, Yamamoto S, Kagaya Y, Hobo T, Yamamoto A, Hattori T** (2005) Abscisic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors. *Plant J* **44**: 939-949
- Kobayashi Y, Yamamoto S, Minami H, Kagaya Y, Hattori T** (2004) Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. *Plant Cell* **16**: 1163-1177
- Kohler B, Blatt MR** (2002) Protein phosphorylation activates the guard cell Ca²⁺ channel and is a prerequisite for gating by abscisic acid. *Plant J* **32**: 185-194
- Kolukisaoglu U, Weini S, Blazevic D, Batistic O, Kudla J** (2004) Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant Physiol* **134**: 43-58

- Komatsu S, Li W, Konishi H, Yoshikawa M, Konishi T, Yang G** (2001) Characterization of a Ca^{2+} -dependent protein kinase from rice root: differential response to cold and regulation by abscisic acid. *Biol Pharm Bull* **24**: 1316-1319
- Koornneef M, Jorna ML, Brinkhorst-van der Swan DLC, Karssen CM** (1982) The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theor Appl Genet* **61**: 385-393
- Koornneef M, Reuling G, Karssen CM** (1984) The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* **61**: 377-383
- Krebs EG, Fischer EH** (1956) The phosphorylase *b* to *a* converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* **20**: 150-157
- Kuhn JM, Boisson-Dernier A, Dizon MB, Maktabi MH, Schroeder JI** (2006) The protein phosphatase AtPP2CA negatively regulates abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*, and effects of *abh1* on AtPP2CA mRNA. *Plant Physiol* **140**: 127-139
- Kwak JM, Moon JH, Murata Y, Kuchitsu K, Leonhardt N, DeLong A, Schroeder JI** (2002) Disruption of a guard cell-expressed protein phosphatase 2A regulatory subunit, RCN1, confers abscisic acid insensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: 2849-2861
- Kwak JM, Mori IC, Pei ZM, Leonhardt N, Torres MA, Dangl JL, Bloom RE, Bodde S, Jones JD, Schroeder JI** (2003) NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *Embo J* **22**: 2623-2633
- Lahav M, Abu-Abied M, Belausov E, Schwartz A, Sadot E** (2004) Microtubules of guard cells are light sensitive. *Plant Cell Physiol.* **45**: 573-582
- Lawton MA, Yamamoto RT, Hanks SK, Lamb CJ** (1989) Molecular cloning of plant transcripts encoding protein kinase homologs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 3140-3144
- Leckie CP, McAinsh MR, Allen GJ, Sanders D, Hetherington AM** (1998) Abscisic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15837-15842
- Lee HC, Walseth TF, Bratt GT, Hayes RN, Clapper DL** (1989) Structural determination of a cyclic metabolite of NAD^+ with intracellular Ca^{2+} -mobilizing activity. *J Biol Chem* **264**: 1608-1615
- Lee S, Choi H, Suh S, Doo IS, Oh KY, Choi EJ, Schroeder Taylor AT, Low PS, Lee Y** (1999) Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. *Plant Physiol* **121**: 147-152
- Lee Y, Choi YB, Suh S, Lee J, Assmann SM, Joe CO, Kelleher JF, Crain RC** (1996) Abscisic acid-induced phosphoinositide turnover in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Plant Physiol* **110**: 987-996
- Lemichez E, Wu Y, Sanchez JP, Mettouchi A, Mathur J, Chua NH** (2001) Inactivation of AtRac1 by abscisic acid is essential for stomatal closure. *Genes Dev* **15**: 1808-1816
- Lemtiri-Chlieh F, MacRobbie EA, Brearley CA** (2000) Inositol hexakisphosphate is a physiological signal regulating the K^+ -inward rectifying conductance in guard cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8687-8692
- Leon-Kloosterziel KM, Gil MA, Ruijs GJ, Jacobsen SE, Olszewski NE, Schwartz SH, Zeevaart JA, Koornneef M** (1996) Isolation and characterization of abscisic acid-deficient *Arabidopsis* mutants at two new loci. *Plant J* **10**: 655-661
- Leonhardt N, Kwak JM, Robert N, Waner D, Leonhardt G, Schroeder JI** (2004) Microarray expression analyses of *Arabidopsis* guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *Plant Cell* **16**: 596-615
- Leonhardt N, Vavasseur A, Forestier C** (1999) ATP binding cassette modulators control abscisic acid-regulated slow anion channels in guard cells. *Plant Cell* **11**: 1141-1152

- Leube MP, Grill E, Amrhein N** (1998) ABI1 of Arabidopsis is a protein serine/threonine phosphatase highly regulated by the proton and magnesium ion concentration. *FEBS Lett* **424**: 100-104
- Leung J, Bouvier-Durand M, Morris PC, Guerrier D, Cheddor F, Giraudat J** (1994) Arabidopsis ABA response gene ABI1: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* **264**: 1448-1452
- Leung J, Giraudat J** (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 199-222
- Leung J, Merlot S, Giraudat J** (1997) The Arabidopsis ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell* **9**: 759-771
- Levchenko V, Konrad KR, Dietrich P, Roelfsema MR, Hedrich R** (2005) Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding Ca²⁺ signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 4203-4208
- Leyman B, Geelen D, Quintero FJ, Blatt MR** (1999) A tobacco syntaxin with a role in hormonal control of guard cell ion channels. *Science* **283**: 537-540
- Li J, Assmann SM** (1996) An abscisic acid-activated and calcium-independent protein kinase from guard cells of fava bean. *Plant Cell* **8**: 2359-2368
- Li J, Kinoshita T, Pandey S, Ng CK, Gygi SP, Shimazaki K, Assmann SM** (2002) Modulation of an RNA-binding protein by abscisic-acid-activated protein kinase. *Nature* **418**: 793-797
- Li J, Lee YR, Assmann SM** (1998) Guard cells possess a calcium-dependent protein kinase that phosphorylates the KAT1 potassium channel. *Plant Physiol* **116**: 785-795
- Li J, Wang XQ, Watson MB, Assmann SM** (2000) Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science* **287**: 300-303
- Li W, Luan S, Schreiber SL, Assmann SM** (1994) Evidence for protein phosphatase 1 and 2A regulation of K⁺ channels in two types of leaf cells. *Plant Physiol* **106**: 963-970
- Liang YK, Dubos C, Dodd IC, Holroyd GH, Hetherington AM, Campbell MM** (2005) AtMYB61, an R2R3-MYB transcription factor controlling stomatal aperture in Arabidopsis thaliana. *Curr Biol* **15**: 1201-1206
- Liu J, Ishitani M, Halfter U, Kim CS, Zhu JK** (2000) The Arabidopsis thaliana SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3730-3734
- Lopez-Molina L, Chua NH** (2000) A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* **41**: 541-547
- Lu C, Fedoroff N** (2000) A mutation in the Arabidopsis HYL1 gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin. *Plant Cell* **12**: 2351-2366
- Lu C, Han MH, Guevara-Garcia A, Fedoroff NV** (2002) Mitogen-activated protein kinase signaling in postgermination arrest of development by abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15812-15817
- Luan S, Li W, Rusnak F, Assmann SM, Schreiber SL** (1993) Immunosuppressants implicate protein phosphatase regulation of K⁺ channels in guard cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 2202-2206
- Macknight R, Bancroft I, Page T, Lister C, Schmidt R, Love K, Westphal L, Murphy G, Sherson S, Cobbett C, Dean C** (1997) FCA, a gene controlling flowering time in Arabidopsis, encodes a protein containing RNA-binding domains. *Cell* **89**: 737-745
- MacRobbie EAC** (1983) Effects of light/dark on cation fluxes in guard cells of *Commelina communis* L. *J Exp Bot* **34**: 1695-1710

- Marin E, Nussaume L, Quesada A, Gonneau M, Sotta B, Hugueney P, Frey A, Marion-Poll A** (1996) Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *Embo J* **15**: 2331-2342
- Mata CG, Lamattina L** (2001) Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiol* **126**: 1196-1204
- McAinsh MR, Brownlee C, Hetherington AM** (1990) Abscisic acid-induced elevation of guard cell cytosolic Ca^{2+} precedes stomatal closure. *Nature* **343**: 186-188
- McAinsh MR, Brownlee C, Hetherington AM** (1992) Visualizing changes in cytosolic-free Ca^{2+} during the response of stomatal guard cells to abscisic acid. *Plant Cell* **4**: 1113-1122
- McAinsh MR, Hetherington AM** (1998) Encoding specificity in Ca^{2+} signalling systems. *Trends Plant Sci* **3**: 32-36
- Meinhard M, Grill E** (2001) Hydrogen peroxide is a regulator of ABI1, a protein phosphatase 2C from *Arabidopsis*. *FEBS Lett* **508**: 443-446
- Meinhard M, Rodriguez PL, Grill E** (2002) The sensitivity of ABI2 to hydrogen peroxide links the abscisic acid-response regulator to redox signalling. *Planta* **214**: 775-782
- Merlot S, Gosti F, Guerrier D, Vavasseur A, Giraudat J** (2001) The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *Plant J* **25**: 295-303
- Merlot S, Mustilli AC, Genty B, North H, Lefebvre V, Sotta B, Vavasseur A, Giraudat J** (2002) Use of infrared thermal imaging to isolate *Arabidopsis* mutants defective in stomatal regulation. *Plant J* **30**: 601-609
- Meyer K, Leube MP, Grill E** (1994) A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **264**: 1452-1455
- Mikolajczyk M, Awotunde OS, Muszynska G, Klessig DF, 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
- Mishra G, Zhang W, Deng F, Zhao J, Wang X** (2006) A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in *Arabidopsis*. *Science* **312**: 264-266
- Monks DE, Aghoram K, Courtney PD, DeWald DB, Dewey RE** (2001) Hyperosmotic stress induces the rapid phosphorylation of a soybean phosphatidylinositol transfer protein homolog through activation of the protein kinases SPK1 and SPK2. *Plant Cell* **13**: 1205-1219
- Munnik T** (2001) Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends Plant Sci* **6**: 227-233
- Murata Y, Pei ZM, Mori IC, Schroeder J** (2001) Abscisic acid activation of plasma membrane Ca^{2+} channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. *Plant Cell* **13**: 2513-2523
- Mustilli AC, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F, Giraudat J** (2002) *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* **14**: 3089-3099
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hancock JT** (2002) Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol* **128**: 13-16
- Ng CK, Carr K, McAinsh MR, Powell B, Hetherington AM** (2001) Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* **410**: 596-599
- Ng CKY, McAinsh MR, Gray JE, Hunt L, Leckie CP, Mills L, Hetherington AM** (2001) Calcium-based signalling systems in guard cells. *New Phytol* **151**: 109-120

- Osakabe Y, Maruyama K, Seki M, Satou M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2005) Leucine-rich repeat receptor-like kinase1 is a key membrane-bound regulator of abscisic acid early signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**: 1105-1119
- Pandey S, Assmann SM** (2004) The Arabidopsis putative G protein-coupled receptor GCR1 interacts with the G protein alpha subunit GPA1 and regulates abscisic acid signaling. *Plant Cell* **16**: 1616-1632
- Papp I, Mur LA, Dalmadi A, Dulai S, Konecz C** (2004) A mutation in the Cap Binding Protein 20 gene confers drought tolerance to Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **55**: 679-686
- Park KY, Jung JY, Park J, Hwang JU, Kim YW, Hwang I, Lee Y** (2003) A role for phosphatidylinositol 3-phosphate in abscisic acid-induced reactive oxygen species generation in guard cells. *Plant Physiol* **132**: 92-98
- Park YS, Hong SW, Oh SA, Kwak JM, Lee HH, Nam HG** (1993) Two putative protein kinases from Arabidopsis thaliana contain highly acidic domains. *Plant Mol Biol* **22**: 615-624
- Pedron J, Brault M, Nake C, Miginiac E** (1998) Detection of abscisic-acid-binding proteins in the microsomal protein fraction of Arabidopsis thaliana with abscisic-acid-protein conjugates used as affinity probes. *Eur J Biochem* **252**: 385-390
- Pei ZM, Ghassemian M, Kwak CM, McCourt P, Schroeder JI** (1998) Role of farnesyltransferase in ABA regulation of guard cell anion channels and plant water loss. *Science* **282**: 287-290
- Pei ZM, Kuchitsu K, Ward JM, Schwarz M, Schroeder JI** (1997) Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in Arabidopsis wild-type and abi1 and abi2 mutants. *Plant Cell* **9**: 409-423
- Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI** (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**: 731-734
- Peiter E, Maathuis FJM, Mills LN, Knight H, Pelloux J, Hetherington AM, Sanders D** (2005) The vacuolar Ca²⁺-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature* **434**: 404-408
- Pilot G, Lacombe B, Gaymard F, Cherel I, Boucherez J, Thibaud JB, Sentenac H** (2001) Guard cell inward K⁺ channel activity in Arabidopsis involves expression of the twin channel subunits KAT1 and KAT2. *J Biol Chem* **276**: 3215-3221
- Raschke K** (1979) Movements of stomata. In *Encyclopedia of Plant Physiology*, W Hale, E Feinleib ed. Springer-Verlag, Berlin, pp 384-441
- Raschke K, Shabahang M, Wolf R** (2003) The slow and the quick anion conductance in whole guard cells: their voltage-dependent alternation, and the modulation of their activities by abscisic acid and CO₂. *Planta* **217**: 639-650
- Razem FA, El-Kereamy A, Abrams SR, Hill RD** (2006) The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* **439**: 290-294
- Razem FA, Luo M, Liu JH, Abrams SR, Hill RD** (2004) Purification and characterization of a barley aleurone abscisic acid-binding protein. *J Biol Chem* **279**: 9922-9929
- Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M** (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J Plant Physiol* **161**: 1189-1202
- Rock CD** (2000) Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytol* **148**: 357-396
- Roelfsema MR, Hedrich R** (2005) In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. *New Phytol* **167**: 665-691
- Roelfsema MR, Levchenko V, Hedrich R** (2004) ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels. *Plant J* **37**: 578-588

- Rudd JJ, Franklin-Tong VE** (2001) Unravelling response-specificity in Ca²⁺ signalling pathways in plant cells. *New Phytol* **151**: 7-33
- Rudrabhatla P, Reddy MM, Rajasekharan R** (2006) Genome-wide analysis and experimentation of plant serine/threonine/tyrosine-specific protein kinases. *Plant Mol Biol* **60**: 293-319
- Saez A, Apostolova N, Gonzalez-Guzman M, Gonzalez-Garcia MP, Nicolas C, Lorenzo O, Rodriguez PL** (2004) Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling. *Plant J* **37**: 354-369
- Sanchez JP, Duque P, Chua NH** (2004) ABA activates ADPR cyclase and cADPR induces a subset of ABA-responsive genes in Arabidopsis. *Plant J* **38**: 381-395
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF** (2002) Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* **14 (Suppl)**: S401-417
- Sang Y, Zheng S, Li W, Huang B, Wang X** (2001) Regulation of plant water loss by manipulating the expression of phospholipase D α . *Plant J* **28**: 135-144
- Schmidt C, Schelle I, Liao YJ, Schroeder JI** (1995) Strong regulation of slow anion channels and abscisic acid signaling in guard cells by phosphorylation and dephosphorylation events. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 9535-9539
- Schroeder JI, Hagiwara S** (1989) Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature* **338**: 427-430
- Schroeder JI, Keller BU** (1992) Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 5025-5029
- Schroeder JI, Raschke K, Neher E** (1987) Voltage dependence of K⁺ channels in guard-cell protoplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 4108-4112
- Schultz TF, Quatrano RS** (1997) Evidence for surface perception of abscisic acid by rice suspension cells as assayed by Em gene expression. *Plant Science* **130**: 63-71
- Schwartz A** (1985) Role of Ca²⁺ and EGTA on stomatal movements in *Commelina communis* L. *Plant Physiol* **79**: 1003-1005
- Sentenac H, Bonneaud N, Minet M, Lacroute F, Salmon JM, Gaymard F, Grignon C** (1992) Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science* **256**: 663-665
- Sequencing Project International Rice Genome** (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature* **436**: 793-800
- Shapiro AD, Gerald L** (2005) Nitric oxide signaling in plants. *Vitam Horm* **72**: 339-398
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (1996) Molecular responses to drought and cold stress. *Current Opinion in Biotechnology* **7**: 161-167
- Shiu SH, Bleeker AB** (2001) Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Sci STKE* **2001**: RE22
- Shope JC, DeWald DB, Mott KA** (2003) Changes in surface area of intact guard cells are correlated with membrane internalization. *Plant Physiol* **133**: 1314-1321
- Sokolovski S, Hills A, Gay R, Garcia-Mata C, Lamattina L, Blatt MR** (2005) Protein phosphorylation is a prerequisite for intracellular Ca²⁺ release and ion channel control by nitric oxide and abscisic acid in guard cells. *Plant J* **43**: 520-529
- Song CP, Agarwal M, Ohta M, Guo Y, Halfter U, Wang P, Zhu JK** (2005) Role of an Arabidopsis AP2/EREBP-type transcriptional repressor in abscisic acid and drought stress responses. *Plant Cell* **17**: 2384-2396

- Staxen II, Pical C, Montgomery LT, Gray JE, Hetherington AM, McAinsh MR** (1999) Abscisic acid induces oscillations in guard-cell cytosolic free calcium that involve phosphoinositide-specific phospholipase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 1779-1784
- Steber CM, Cooney SE, McCourt P** (1998) Isolation of the GA-response mutant *sly1* as a suppressor of *ABI1-1* in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **149**: 509-521
- Sugden C, Crawford RM, Halford NG, Hardie DG** (1999) Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5'-AMP. *Plant J* **19**: 433-439
- Suhita D, Raghavendra AS, Kwak JM, Vavasseur A** (2004) Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiol* **134**: 1536-1545
- Szyroki A, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MR, Ache P, Reintanz B, Deeken R, Godde M, Felle H, Steinmeyer R, Palme K, Hedrich R** (2001) *KAT1* is not essential for stomatal opening. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2917-2921
- Tabaeizadeh Z** (1998) Drought-induced responses in plant cells. *Int Rev Cytol* **182**: 193-247
- Talbott LD, Zeiger E** (1996) Central roles for potassium and sucrose in guard-cell osmoregulation. *Plant Physiol* **111**: 1051-1057
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815
- Thiel G, Blatt MR** (1994) Phosphatase antagonist okadaic acid inhibits steady-state K^+ currents in guard cells of *Vicia faba*. *Plant J* **5**: 727-733
- Tietz A, Kasprick W** (1986) Identification of abscisic acid in a green alga. *Biochem Physiol Pflanz* **181**: 269-274
- Torsethaugen G, Pell EJ, Assmann SM** (1999) Ozone inhibits guard cell K^+ channels implicated in stomatal opening. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13577-13582
- van der Veen R, Heimovaara-Dijkstra S, Wang M** (1992) Cytosolic alkalization mediated by abscisic acid is necessary, but not sufficient, for abscisic acid-induced gene expression in barley aleurone protoplasts. *Plant Physiol* **100**: 699-705
- Wang XQ, Ullah H, Jones AM, Assmann SM** (2001) G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science* **292**: 2070-2072
- Ward JM, Schroeder JI** (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
- Wilkinson SE, Nixon JS** (1998) T-cell signal transduction and the role of protein kinase C. *Cell Mol Life Sci* **54**: 1122-1144
- Wille AC, Lucas WJ** (1984) Ultrastructural and histochemical studies on guard cells. *Planta* **160**: 129-142
- Willmer CM, Fricker M** (1996) *Stomata*, Ed 2nd ed. Chapman & Hall, London ; New York
- Wolanin PM, Thomason PA, Stock JB** (2002) Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol* **3**: 3013
- Wu Y, Sanchez JP, Lopez-Molina L, Himmelbach A, Grill E, Chua NH** (2003) The *abi1-1* mutation blocks ABA signaling downstream of cADPR action. *Plant J* **34**: 307-315
- Xie Z, Ruas P, Shen QJ** (2005) Regulatory networks of the phytohormone abscisic acid. *Vitam Horm* **72**: 235-269

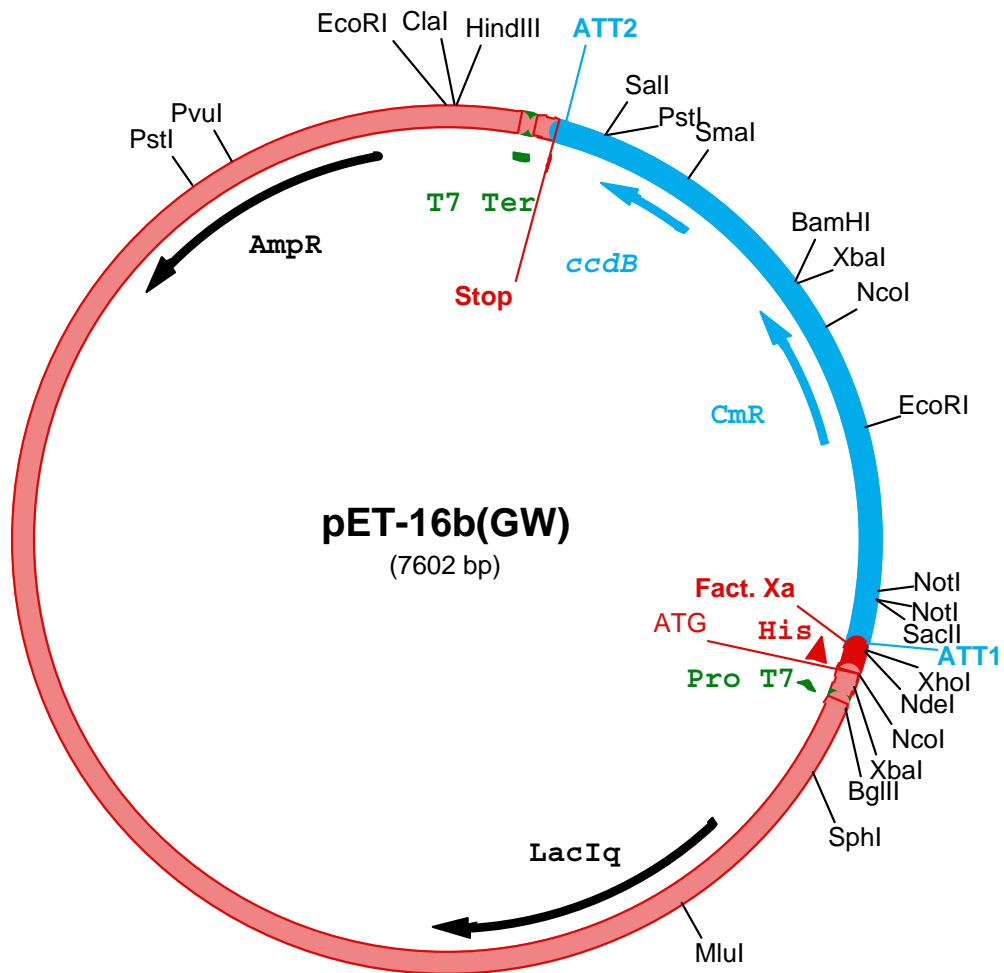
- Xiong L, Gong Z, Rock CD, Subramanian S, Guo Y, Xu W, Galbraith D, Zhu JK** (2001) Modulation of abscisic acid signal transduction and biosynthesis by an Sm-like protein in Arabidopsis. *Dev Cell* **1**: 771-781
- Yan C, Shen H, Li Q, He Z** (2006) A novel ABA-hypersensitive mutant in Arabidopsis defines a genetic locus that confers tolerance to xerothermic stress. *Planta*: doi10.1007/s00425-00006-00272-00426
- Yoon HW, Kim MC, Shin PG, Kim JS, Kim CY, Lee SY, Hwang I, Bahk JD, Hong JC, Han C, Cho MJ** (1997) Differential expression of two functional serine/threonine protein kinases from soybean that have an unusual acidic domain at the carboxy terminus. *Mol Gen Genet* **255**: 359-371
- Yoshida R, Hobo T, Ichimura K, Mizoguchi T, Takahashi F, Aronso J, Ecker JR, Shinozaki K** (2002) ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **43**: 1473-1483
- Yoshida R, Umezawa T, Mizoguchi T, Takahashi S, Takahashi F, Shinozaki K** (2006) The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in Arabidopsis. *J Biol Chem* **281**: 5310-5318
- Yu R, Huang RF, Wang XC, Yuan M** (2001) Microtubule dynamics are involved in stomatal movement of *Vicia faba* L. *Protoplasma* **216**: 113-118
- Zeevaart JAD, Heath TG, Gage DA** (1989) Evidence for a universal pathway of abscisic acid biosynthesis in higher plants from ¹⁸O incorporation patterns. *Plant Physiol* **91**: 1594-1601
- Zeiger E, Hepler PK** (1977) Light and stomatal function: blue light stimulates swelling of guard cell protoplasts. *Science* **196**: 887-889
- Zhang A, Jiang M, Zhang J, Tan M, Hu X** (2006) Mitogen-activated protein kinase is involved in abscisic acid-induced antioxidant defense and acts downstream of Reactive Oxygen Species production in leaves of maize plants. *Plant Physiol* **141**
- Zhang DP, Wu ZY, Li XY, Zhao ZX** (2002) Purification and identification of a 42-kilodalton abscisic acid-specific-binding protein from epidermis of broad bean leaves. *Plant Physiol* **128**: 714-725
- Zhang J, Davies WJ** (1990) Changes in the concentration of ABA in xylem sap as a function of changing soil water status can account for changes in leaf conductance and growth. *Plant Cell Environ* **13**: 277-285
- Zhang M, Liang S, Lu YT** (2005) Cloning and functional characterization of NtCPK4, a new tobacco calcium-dependent protein kinase. *Biochim Biophys Acta* **1729**: 174-185
- Zhang W, Qin C, Zhao J, Wang X** (2004) Phospholipase D α 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9508-9513
- Zhang X, Wang H, Takemiya A, Song CP, Kinoshita T, Shimazaki K** (2004) Inhibition of blue light-dependent H⁺ pumping by abscisic acid through hydrogen peroxide-induced dephosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase in guard cell protoplasts. *Plant Physiol* **136**: 4150-4158
- Zheng ZL, Nafisi M, Tam A, Li H, Crowell DN, Chary SN, Schroeder JI, Shen J, Yang Z** (2002) Plasma membrane-associated ROP10 small GTPase is a specific negative regulator of abscisic acid responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**: 2787-2797
- Zhu J, Gong Z, Zhang C, Song CP, Damsz B, Inan G, Koiwa H, Zhu JK, Hasegawa PM, Bressan RA** (2002) OSM1/SYP61: a syntaxin protein in Arabidopsis controls abscisic acid-mediated and non-abscisic acid-mediated responses to abiotic stress. *Plant Cell* **14**: 3009-3028

ANNEXES

Annexe 1

Carte du vecteur pET16b_(GW)

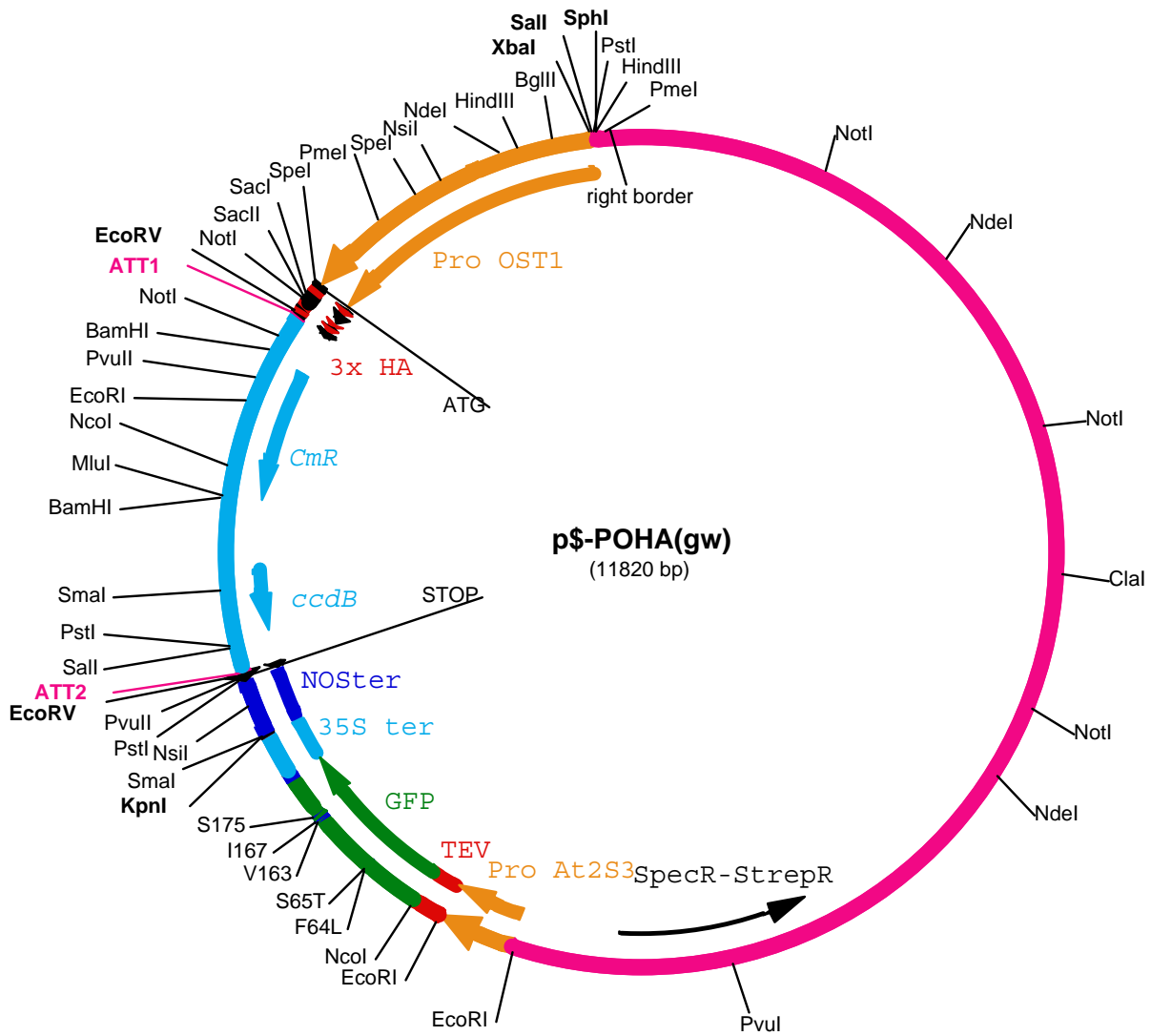
utilisé pour l'expression de protéines recombinantes chez *E.coli*



Annexe 2

Carte du vecteur p\$POHA_(GW)

utilisé pour la génération des lignées transgéniques (promoteur *OST1*)



Annexe 3

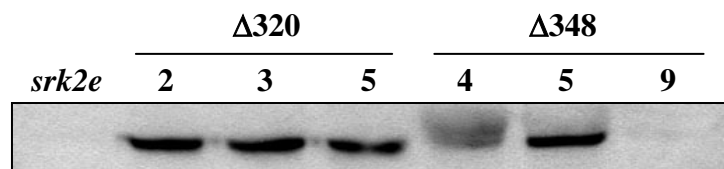
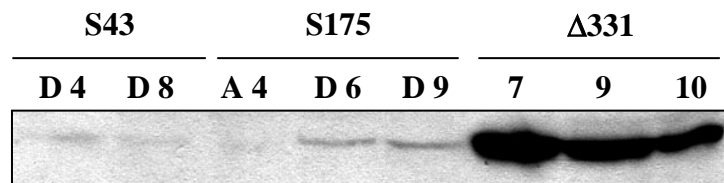
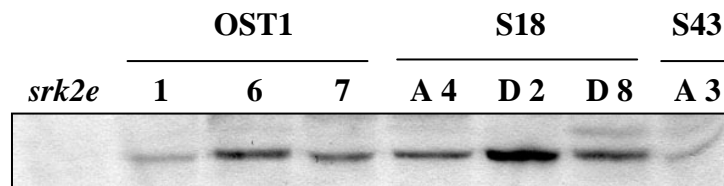
Bilan des lignées indépendantes générées lors de ma thèse

Ce tableau indique le nombre de lignées stables indépendantes générées pour chacune des constructions (différentes versions de OST1, autres SnRK2 ou GUS) dans chacun des fonds génétiques. *T1* indique que ces lignées hétérozygotes n'ont pas été propagées et triées après la génération T1.

promoteur	version	fond génétique			
		Ler	Col	<i>ost1-2</i>	<i>srk2e</i>
35S	OST1		4	3	
	G33R	1			3
	Cter	1			3
OST1	OST1			4	5
	S7A			<i>T1</i>	1
	S7D			<i>T1</i>	3
	S18A			<i>T1</i>	1
	S18D			<i>T1</i>	5
	S29A			<i>T1</i>	4
	S29D			<i>T1</i>	3
	S43A			<i>T1</i>	2
	S43D			<i>T1</i>	3
	S175A			4	4
	S175D			5	5
	T176A			5	5
	T176D			4	4
	Δ 280			4	5
	Δ 302			<i>T1</i>	4
	Δ 320			<i>T1</i>	5
	Δ 331			<i>T1</i>	4
	Δ 348			<i>T1</i>	4
	OSKL3			3	2
	OSKL5			5	3
	OSKL7			4	4
	GUS			3	5
Vecteur vide			3	2	

Annexe 4

Caractérisation moléculaire des lignées *srk2e* / *PRO*_{OST1}:3xHA-X



Détection de la protéine de fusion étiquetée 3xHA grâce à un anticorps monoclonal anti-HA. Les lignées exprimant les mutations ponctuelles sur les sérines 7 et 29 ne sont pas représentées (bandes trop faibles). L'intensité des bandes n'est pas comparable entre les trois panneaux.

Annexe 5

Amorces utilisées pour les RT-PCR sur l'ensemble des *SnRK2* et les contrôles *EF1 α* et *KIN1*

Gène	Amorce	Séquence amorce (5' – 3')	Température d'hybridation	Nombre de cycles
<i>OST1</i>	5_PK11	CTTCCAGCAACTCATTTCAGGAGT	59°C	28
	3_PK10	GCTTCTGCAATGATCTGC		
<i>OSKL2</i>	5_OPK2n	TGACGCCGACTCATCTGGCTATC	59°C	28
	3_OPK2n	TGTCAGTCATGAAATCGTCTAGGCA		
<i>OSKL3</i>	5_OPK3n	TGACGCCTTCCCATTGGCTATT	59°C	25
	3_OPK3n	TATCCGCCATGAAATCATCGAGGC		
<i>OSKL4</i>	5_OKL4	ATAGGTCGCTGATCCATCCCAAT	59°C	28
	3_OKL4	TTCCAATGGCACCATTACTGCTT		
<i>OSKL5</i>	5_OKL5	CCAACGGAGAGTTTTACGCCGTT	55°C	32
	3_OKL5	GCTCCCATCTATTAACCCTAATC		
<i>OSKL6</i>	5_OKL6	ACCAACGCACATCGCCATTGCTAT	55°C	28
	3_OKL6	CGACGCTTTGGAGTGAGAATGTC		
<i>OSKL7</i>	5_OKL7	TCCAACCCATCTTGCCATTGCCAT	59°C	28
	3_OKL7	CAACGGTCTGAAGGGAGAAGGTT		
<i>OSKL8</i>	5_OKL8	ACACACTGCTCGATGGGAGCCCT	59°C	28
	3_OKL8	TCTTCTTCATCAGCTCCTGAGCC		
<i>OSKL9</i>	5_OKL9	CAAGTCATCTCTGCTTCACTCTA	55°C	28
	3_OKL9	ATCATCAAAGCCCTTGACGGCAT		
<i>OSKL10</i>	5_OKL10	CATAGAGCTCTCAACCATCCGAA	55°C	28
	3_OKL10	TTATCTGATCCAAGCGATTGAC		
<i>EF1α</i>	EF1-F	ATGCCCCAGGACATCGTGATTTCA	59°C	22
	EF1-R	TTGGCGGCACCCTTAGCTGGATCA		
<i>KIN1</i>	KIN1-F	ATGTCAGAGACCAACAAGAA	59°C	26
	KIN1-R	GAATATAAGTTTGCTCGTC		

RESUME

La sécheresse est un stress majeur pour les plantes qui ont développé de nombreuses stratégies pour y faire face. La réponse la plus rapide à un stress hydrique est la fermeture des pores stomatiques qui limite les pertes d'eau par évapo-transpiration. La phytohormone acide abscissique (ABA) participe à cette réponse en modifiant la turgescence des cellules de garde. La protéine kinase OST1 d'*Arabidopsis thaliana* contrôle les étapes précoces de la transduction du signal ABA dans ces cellules. Au cours de cette thèse, nous avons cherché à comprendre les mécanismes de régulation de la kinase OST1. Nous avons d'abord montré que la protéine 10xHis-OST1 produite chez *E.coli* est active et s'autophosphoryle. Ceci nous a permis d'identifier des résidus phosphorylés, cibles potentielles de kinases ou phosphatases régulant l'activité de OST1 dans la plante. L'importance de ces résidus a d'abord été étudiée *in vitro* par l'analyse de l'activité de protéines recombinantes mutées sur les résidus phosphorylés. Puis nous avons étudié l'impact de ces mutations dans la plante en réalisant des tests de complémentation du mutant *ost1* et des tests d'activité kinase après immunoprécipitation des différentes versions de la protéine OST1. La même stratégie appliquée à l'étude de versions tronquées de OST1 nous a permis d'analyser son domaine C-terminal. Nous avons ainsi identifié plusieurs éléments structuraux critiques pour l'activité de OST1 et sa fonction dans la plante. Enfin, notre analyse des différents allèles mutants *ost1* suggère que OST1 régule les flux transpiratoires en réponse à un stress hydrique à deux niveaux distincts, dans les cellules de garde et les tissus vasculaires.

ABSTRACT

Drought is a major environmental constraint, and plants have developed several protective strategies to survive this stress. Most plants first respond to drought by closing their stomatal pores to prevent water loss via transpiration. The phytohormone abscisic acid (ABA) mediates reduction of stomatal conductance in response to drought through its action on guard cells. The protein kinase OST1 has been identified as a key early component of ABA signal transduction in *Arabidopsis* guard cells. In this thesis, we investigated the mechanisms of OST1 activation in response to ABA in guard cells. We show that the recombinant fusion protein 10xHis-OST1 produced in *E.coli* is active and autophosphorylates. This allowed the identification of phosphorylated residues representing putative targets of upstream kinases or phosphatases. The importance of these residues was first investigated *in vitro* by studying biochemical activity of recombinant point mutated versions of OST1. The impact of these mutations in plants was then analysed by *OST1* knock-out mutant complementation and OST1 kinase activity measurements after immunoprecipitation. We also studied the C-terminal domain of OST1 applying the same strategy with several truncated versions of OST1 kinase. This work identifies several conserved residues and regulatory features critical for OST1 kinase activity and function in guard cells. Finally, the detailed analysis of several *ost1* alleles leads us to propose a dual function for OST1 in guard cells and vascular tissues, controlling waterloss at both levels under drought conditions.