



HAL
open science

Etude proteomique de la vacuole d'*Arabidopsis thaliana* en vue de l'identification d'acteurs protéiques impliqués dans la détoxification du cadmium

Florent Villiers

► **To cite this version:**

Florent Villiers. Etude proteomique de la vacuole d'*Arabidopsis thaliana* en vue de l'identification d'acteurs protéiques impliqués dans la détoxification du cadmium. Biologie végétale. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT: . tel-00652513

HAL Id: tel-00652513

<https://theses.hal.science/tel-00652513>

Submitted on 15 Dec 2011

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.

THESE

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Biologie

Présentée par

Florent VILLIERS

Le 31 octobre 2008

ETUDE PROTEOMIQUE DES VACUOLES D'*ARABIDOPSIS THALIANA*,
EN VUE DE L'IDENTIFICATION D'ACTEURS PROTEIQUES IMPLIQUES DANS
LA DETOXICATION DU CADMIUM

Composition du jury :

Patrick RAVANEL	<i>Président</i>
Alain PUGIN	<i>Rapporteur</i>
Michel ROSSIGNOL	<i>Rapporteur</i>
Michel JAQUINOD	<i>Invité</i>
Jacques BOURGUIGNON	<i>Directeur de thèse</i>

Co-directrice de thèse :

Véronique HUGOUVIEUX

Thèse préparée au sein du Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale

UMR CNRS 5168 – INRA 1200 – CEA – UJF

CEA – GRENOBLE

à mes parents,

à mon épouse, Clissandre ...

THESE

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Biologie

Présentée par

Florent VILLIERS

Le 31 octobre 2008

ETUDE PROTEOMIQUE DES VACUOLES D'*ARABIDOPSIS THALIANA*,
EN VUE DE L'IDENTIFICATION D'ACTEURS PROTEIQUES IMPLIQUES DANS
LA DETOXICATION DU CADMIUM

Composition du jury :

Patrick RAVANEL	<i>Président</i>
Alain PUGIN	<i>Rapporteur</i>
Michel ROSSIGNOL	<i>Rapporteur</i>
Michel JAQUINOD	<i>Invité</i>
Jacques BOURGUIGNON	<i>Directeur de thèse</i>

Co-directrice de thèse :

Véronique HUGOUVIEUX

Thèse préparée au sein du Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale

UMR CNRS 5168 – INRA 1200 – CEA – UJF

CEA – GRENOBLE

Remerciements

À l'heure de la synthèse du travail que j'ai effectué pendant ma thèse, je souhaite remercier les personnes qui ont contribué à sa réalisation. Ce sont elles qui m'ont formé, qui m'ont conseillé, et qui m'ont soutenue ; qu'elles reçoivent ici le témoignage de ma gratitude et de mon affection.

Je souhaite en premier lieu remercier le Dr Marylin Vantard, qui dirige le laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale qui m'a accueilli pour cette thèse.

Merci infiniment à Jacques Bourguignon pour la grande qualité de son encadrement. Son expertise scientifique, sa grande rigueur, la confiance qu'il a bien voulu m'accorder et ses qualités humaines ont été primordiales à la réalisation de mon travail et au plaisir que j'y ai pris. Merci également à Véronique Hugouvioux. Son savoir-faire scientifique et pédagogique m'a permis d'exploiter les outils de la biologie moléculaire efficacement et de me former à cet aspect de la recherche. La qualité de ses conseils a fait de son encadrement une part essentielle de ma formation. Je suis aussi extrêmement reconnaissant à Michel Jacquinoé pour son implication dans mon projet de thèse. Sa disponibilité et sa grande compétence m'ont permis de me familiariser avec la spectrométrie de masse.

Une part importante des travaux présentés a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire d'Etude de la Dynamique des Protéomes. Je souhaite ici exprimer ma reconnaissance à Jérôme Garin, qui le dirige, et à Sylvie Kieffer-Jacquinoé, Lauriane Kuhn, Maighread Gallagher et Alexandra Kraut, avec qui j'ai été plus particulièrement en interaction.

Merci à tous ceux avec qui j'ai eu la chance de travailler, au laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale ou ailleurs. Merci en particulier à Nathalie Leonhardt, à Agnès Jourdain, à Nolwenn, Oliv', Delph', Emma et Héléne.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance au Pr Alain Pugin, au Dr Michel Rossignol, et au Pr Patrick Ravanel qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail. Je les remercie pour leurs critiques et leurs commentaires.

Enfin mes plus vifs remerciements vont à ma famille. Merci à mes parents, pour leur continuel soutien et leur précieuse aide tout au long de mon cursus, en particulier lors de la rédaction de ce manuscrit. Et puis merci à toi Clissandre pour ta compréhension, pour ta douceur et pour ton appui. Tu m'as accompagné à chaque instant de ma thèse, ce travail est aussi le tien.

Sommaire

SOMMAIRE	2
INDEX DES FIGURES	6
INDEX DES TABLEAUX	9
ABBREVIATIONS	10
INTRODUCTION GENERALE	12
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	14
I - LA VACUOLE VEGETALE.....	14
I.1 - Occurrence des vacuoles dans le vivant.....	14
I.2 - Rôles de la vacuole végétale et transporteurs impliqués dans ses fonctions	16
I.2.1 - Maintien de l'homéostasie cellulaire.....	17
I.2.2 - Implication de la vacuole dans des fonctions métaboliques	25
I.2.3 - Protection cellulaire.....	29
II - LE STRESS CADMIUM CHEZ LES PLANTES	31
II.1 - Entrée du cadmium dans la plante	32
II.2 - Chélation des métaux, et plus particulièrement du cadmium, dans la plante / Répartition tissulaire des ions métalliques.....	33
II.2.1 - Transport par le système vasculaire	33
II.2.2 - Distribution du cadmium dans la plante : cas particulier des trichomes.....	35
II.3 - Mécanismes cellulaires de la détoxification du cadmium	35
II.3.1 - Synthèse des phytochélatines	36
II.3.2 - Compartimentation des métaux lourds dans la vacuole.....	40
III - OBJECTIFS DE LA THESE.....	42
MATERIELS ET METHODES.....	44
I - BIOLOGIE CELLULAIRE	44
I.1 - Matériel Végétal	44
I.1.1 - Cellules en culture liquide d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	44
I.1.2 - Cultures <i>in vitro</i>	44
I.2 - Purification de vacuoles de cellules en culture d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	45
I.2.1 - Préparation de protoplastes	45
I.2.2 - Isolement de vacuoles (méthode adaptée de Fragne <i>et al.</i> , 2002)	45
I.3 - Préparation de fractions enrichies en cytosol.....	46
II - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES.....	47

II.1 - Séparation d'échantillons protéiques par électrophorèse	47
II.1.1 - Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes.....	47
II.1.2 - Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes.....	48
II.1.3 - Coloration des gels	49
II.2 - Western-blot	50
II.2.1 - Transfert des protéines sur membrane.....	50
II.2.2 - Immunorévélation des protéines.....	50
II.3 - Mesure d'activités enzymatiques	50
II.3.1 - Activité de l' α -mannosidase - adapté de Boller & Kende, 1979	50
III - TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.....	51
III.1 - Amplification d'un fragment d'ADN par PCR.....	51
III.2 - Expression de plasmides en système bactérien.....	52
III.2.1 - Construction du plasmide	52
III.2.2 - Transformation de bactéries	54
III.2.3 - Extraction de plasmides.....	54
III.3 - Expression transitoire <i>in vivo</i> de protéines chimères	55
III.3.1 - Expression dans des feuilles de tabac.....	55
III.3.2 - Expression dans des protoplastes	55
IV - EQUIPEMENTS PARTICULIERS	56
IV.1 - Identification de protéines par spectrométrie de masse	56
IV.1.1 - Principe de la spectrométrie de masse.....	56
IV.1.2 - nanoLC ESI-MS/MS	56
IV.2 - Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometer (ICP-MS).....	58
IV.2.1 - Principe	58
IV.2.2 - Préparation des échantillons et dosage du cadmium	59
CHAPITRE I : ANALYSE PROTEIQUE GLOBALE DE LA VACUOLE D'ARABIDOPSIS THALIANA	60
I - MISE EN PLACE D'UNE STRATEGIE D'ETUDE PROTEOMIQUE DE LA VACUOLE D'ARABIDOPSIS THALIANA. ...	60
I.1 - Purification de vacuoles à partir de cellules en culture d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	61
I.1.1 - Mise en place du protocole d'isolement de vacuoles à partir de cellules en culture d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	61
I.1.2 - Evaluation de la qualité des préparations de vacuoles.....	63
I.2 - Identification des protéines majeures de la vacuole.....	64
I.3 - Mise en place d'une stratégie d'étude protéomique de la vacuole d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	66
II - ANALYSE DU PROTEOME MEMBRANAIRE DE LA VACUOLE D'ARABIDOPSIS THALIANA.....	68
II.1 - Analyse de la composition protéique du tonoplaste.....	70
II.1.1 - Les transporteurs	72

II.1.2 -	Autres protéines.....	83
II.2 -	Localisation <i>in vivo</i> de protéines fusionnées à la GFP.....	84
II.2.1 -	Transformation transitoire de cellules de tabac.....	85
II.2.2 -	Transformation transitoire de protoplastes.....	88
II.3 -	Conclusion.....	88
III -	ANALYSE DU PROTEOME SOLUBLE DE LA VACUOLE.....	90
III.1 -	Protéines à activité hydrolytique.....	92
III.1.1 -	Protéases.....	93
III.1.2 -	Glycosidases.....	99
III.1.3 -	Autres hydrolases.....	101
III.2 -	Protection cellulaire et signalisation.....	103
III.2.1 -	Protéines de la réponse aux stress.....	103
III.2.2 -	Composantes de la signalisation cellulaire.....	104
III.3 -	Autres protéines.....	106
III.4 -	Conclusion.....	107
IV -	CONCLUSION GENERALE.....	107
CHAPITRE II :	ASPECTS QUANTITATIFS ET ORGANISATIONELS DU PROTEOME VACUOLAIRE.....	110
I -	CARTOGRAPHIE DU PROTEOME SOLUBLE VACUOLAIRE PAR ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE.....	110
II -	EVALUATION DE LA PROPORTION ET DE L'ORIGINE DES CONTAMINATIONS POTENTIELLES OBSERVEES DANS LA VACUOLE.....	116
II.1 -	Analyse des protéines cytosoliques majeures après séparation par électrophorèse 2D (IEF / SDS- PAGE), et identification par spectrométrie de masse.....	118
II.2 -	Comparaison des protéines majeures du cytosol et de la vacuole.....	122
III -	EVALUATION DE L'ORGANISATION SUPRAMOLECULAIRE DU PROTEOME VACUOLAIRE.....	127
III.1 -	Evolution de la méthode de préparation de vacuoles.....	127
III.2 -	Evaluation de l'organisation supramoléculaire du protéome soluble de la vacuole.....	129
III.3 -	Evaluation de l'organisation supramoléculaire du protéome membranaire de la vacuole.....	133
III.4 -	Conclusion.....	139
CHAPITRE III :	VERS UNE RECHERCHE DE CANDIDATS A LA DETOXICATION METALLIQUE VACUOLAIRE.....	142
I -	RECHERCHE DE PROTEINES VACUOLAIRES A REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE PAR LE CADMIUM.....	143
I.1 -	Création d'une base informatique pour l'exploitation de données d'expression génique et de protéomique.....	143
I.2 -	Analyse croisée des données d'analyses transcriptomiques et protéomiques.....	148
I.2.1 -	Mise en place de l'analyse croisée.....	148
I.2.2 -	Protéines vacuolaires à régulation transcriptionnelle par le cadmium.....	149
I.3 -	Conclusion.....	156

II - IDENTIFICATION D'UN ACTEUR POTENTIEL DE LA REPONSE VACUOLAIRE DE LA PLANTE AU STRESS	
CADMIUM.....	157
II.1 - DWARF1 / DIMINUTO, intervient dans une voie de biosynthèse régulée par le stress cadmium ...	157
II.2 - Modulation du niveau de brassinostéroïdes endogènes et effets sur la réponse au cadmium de plantules d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	161
II.2.1 - Inhibition chimique de la voie de biosynthèse	161
II.2.2 - Ajout d'hormone exogène	163
II.3 - Etude de la réponse au cadmium de mutants affectés dans la synthèse ou la perception des brassinostéroïdes	165
II.3.1 - Réponse du mutant <i>dwf1</i> au stress cadmium	165
II.3.2 - Restauration chez <i>dwf1</i> d'un phénotype de sensibilité au cadmium par ajout d'eBL exogène	166
II.3.3 - Réponse au cadmium d'autres mutants affectés dans la voie de signalisation et de perception des brassinostéroïdes	168
II.4 - Recherche de facteurs de tolérance dépendants des brassinostéroïdes impliqués dans la réponse de la plante au stress métallique	169
II.4.1 - Mesure de la quantité endogène de cadmium.....	169
II.4.2 - Evaluation de l'implication de la voie GSH / PC	171
II.5 - Conclusion et perspectives.....	172
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	178
ANNEXES.....	182
ANNEXE I	183
ANNEXE II.....	196
ANNEXE III.....	200
BIBLIOGRAPHIE	202
RESUME.....	218
ABSTRACT	220

Index des figures

Figure 1 : Structure de l'ATPase vacuolaire de plante.	18
Figure 2 : Principaux flux intra-cellulaires du cadmium, depuis son entrée dans les cellules racinaires jusqu'à sa libération dans le système vasculaire.	34
Figure 3 : Synthèse des phytochélatines et des isophytochélatines..	37
Figure 4 : Régulation de l'expression génique des enzymes impliquées dans l'assimilation du soufre dans les racines de plantules d' <i>Arabidopsis thaliana</i> exposées à un stress cadmium.	39
Figure 5 : Principe de la purification de vacuoles à partir de cellules d' <i>Arabidopsis thaliana</i> en culture liquide	62
Figure 6 : Evaluation de la pureté des préparations de vacuoles purifiées à partir de cellules d' <i>Arabidopsis</i> en culture.	63
Figure 7 : Identification des protéines majeures de nos échantillons vacuolaires.	65
Figure 8 : Stratégie générale d'analyse protéomique de la vacuole d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	67
Figure 9 : Analyse par spectrométrie de masse de la composition protéique de la membrane de vacuoles d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	69
Figure 10 : Types de liaison au tonoplaste de 260 protéines identifiées dans la vacuole et connues pour être associées à la membrane.	70
Figure 11 : Principales catégories fonctionnelles des protéines identifiées à partir de la fraction membranaire des vacuoles.	71
Figure 12 : Contributions de différents travaux de protéomique vacuolaire à l'établissement d'une liste de 123 transporteurs tonoplastiques.	72
Figure 13 : Principales classes de transporteurs identifiées dans le tonoplaste de la vacuole, classées selon l'ontologie du Munich Information for Protein Sequence (MIPS).	73
Figure 14 : Cellules épithéliales de tabac transformées de façon transitoire, <i>via Agrobacterium</i> , avec la construction Nramp3::GFP.	86
Figure 15 : Cellules épithéliales de tabac transformées de façon transitoire.	87
Figure 16 : Protoplastes de cellules en culture d' <i>Arabidopsis thaliana</i> transformées de façon transitoire	89
Figure 17 : Analyse par spectrométrie de masse de la composition protéique de la fraction soluble de vacuoles d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	91
Figure 18 : Catégories fonctionnelles représentées dans le protéome soluble des vacuoles.	92
Figure 19 : Identification d'un motif de type A2 (protéases à acide aspartique 2) chez une protéine identifiée dans la vacuole.	94
Figure 20 : Schéma organisationnel et fonctionnel possible du protéasome et de la subtilase TPPII (tripeptidylpeptidase II) chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	109

Figure 21 : Analyse par électrophorèse bidimensionnelle et par spectrométrie de masse de des protéines majeure de la fraction soluble de vacuoles d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	111
Figure 22 : Répartition des catégories fonctionnelles des protéines identifiées à partir des électrophorèses bidimensionnelles.	113
Figure 23 : Séparation des protéines solubles de la vacuole par électrophorèse bidimensionnelle IEF/SDS-PAGE.	114
Figure 24 : Stratégie d'identification des protéines cytosoliques co-purifiées avec les vacuoles.....	117
Figure 25 : Séparation des protéines de la fraction enrichie en cytosol par électrophorèses bidimensionnelles IEF/SDS-PAGE.	120
Figure 26 : Catégories fonctionnelles représentées dans la fraction enrichie en cytosol.....	122
Figure 27 : Comparaison des cartographies des protéomes de la fraction soluble de la vacuole et de la fraction enrichie en cytosol.	124
Figure 28 : Méthodes d'isolement des vacuoles, à partir du lysat protoplastique, utilisées lors de ce travail.	128
Figure 29 : Stratégie d'analyse de l'organisation supramoléculaire du protéome de la vacuole d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	129
Figure 30 : Mise en évidence des complexes majeurs du protéome soluble par BN-PAGE et BN / SDS-PAGE.....	131
Figure 31 : Premières électrophorèses de type BN / SDS-PAGE, réalisés à partir de 150 µg ds protéines tonoplastiques.	134
Figure 32 : Electrophorèse bidimensionnelle de type BN / SDS-PAGE réalisées avec des échantillons membranaires de vacuoles.	136
Figure 33 : Séparation des protéines vacuolaires par BN / SDS-PAGE.....	137
Figure 34 : Séparation des protéines vacuolaires par BN-PAGE.	138
Figure 35 : Structure générale de la base de données ArHeS et de son interface d'exploitation.....	144
Figure 36 : Script PHP d'insertion des valeurs contenues dans le fichier « nom_de_fichier » dans la base de données « nom_de_la_base_de_données ».	145
Figure 37 : Captures d'écran des interfaces d'interrogation des tables proteomics et microarray d'ArHeS.	146
Figure 38 : Captures d'écran de l'interface de présentation des résultats d'ArHeS.	147
Figure 39 : Capture d'écran de l'interface du module de détection de N° AGI de ArHeS.....	148
Figure 40 : Capture d'écran de l'interface du module croisement de requêtes de ArHeS.....	150
Figure 41 : Structure des brassinostéroïdes.	158
Figure 42 : Régulation transcriptionnelle de la voie de biosynthèse des stérols / brassinostéroïdes lors d'un stress cadmium, dans des racines de plantules d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	160
Figure 43 : Effet du brassinazole (Brz) sur la croissance racinaire de plantules exposées au cadmium (Cd).	162
Figure 44 : Effet de l'épibrassinolide (eBL) sur des plantules exposées au cadmium.....	164

Figure 45 : Caractérisation du mutant N506932 du Salk Institute.....	166
Figure 46 : Effet de l'épibrassinolide (eBL) sur des plantules N507932 (dwf1) exposées au cadmium.	167
Figure 47 : Evaluation de la sensibilité au cadmium de plantules sauvages (WT) et mutées (dwf4, bri1).....	168
Figure 48 : Quantité de cadmium mesurée dans les feuilles et les racines de plantules.	170
Figure 49 : Effet du Brz sur les quantités de glutathion (GSH) et de phytochélatines (PC) mesurées dans les feuilles et les racines de plantules exposées au Cd.	172

Index des tableaux

Tableau I : Clones « entré » obtenus via l'ABRC et contenant les cDNA des protéines dont la localisation est à confirmer.....	53
Tableau II : Sous unités-de l'ATPase vacuolaire.	74
Tableau III : Transporteurs ABC identifiés dans la fraction membranaire de la vacuole.....	76
Tableau IV : Tonoplast Intrinsic Proteins (TIP) identifiées par nos travaux.	77
Tableau V : Expression génique des 10 isoformes de TIP d' <i>Arabidopsis thaliana</i> en fonction du tissu considéré.	78
Tableau VI : Transporteurs identifiés dans la vacuole par nos travaux.	80
Tableau VII : Protéines à domaine SPFH identifiées dans la vacuole.....	83
Tableau VIII : Protéases et protéines régulatrices d'activité protéasique identifiées dans la fraction soluble de la vacuole.	98
Tableau IX : Glycosyl hydrolases identifiées dans la fraction soluble de la vacuole.	100
Tableau X : Spots majeurs (20 plus intenses) des cartographies réalisées par IEF / SDS-PAGE sur les protéines solubles de la vacuole (Figure 23).	115
Tableau XI : Groupes de spots majeurs de la fraction enrichie en cytosol de cellules en culture d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	121
Tableau XII : Sélection de 52 protéines vacuolaires codées par des gènes dont le niveau d'accumulation de transcrits est régulé lors d'un stress cadmium.....	151
Tableau XIII : Analyse de l'expression de gènes appartenant à la voie de biosynthèse des brassinostéroïdes lors de l'exposition à différentes conditions.	174
Tableau XIV : Sélection de gènes régulés de façon similaire (inhibition ou induction) par le cadmium et le brassinazole, et de façon opposée par l'épibrassinolide.	175

Abréviations

AAAP	Amino Acid / Auxin Permease
ABC	ATP Binding Cassette
APC	Amino acid – Polyamine - organoCation
ArHeS	Arabidopsis Heavy metal Stress. Base de données MySQL de résultats d'analyses protéomiques et transcriptomiques et interface d'exploitation de la base
BN	Blue Native
CAX	CAtion Exchanger
CCD1	Carotenoid Cleavage enzyme D1
CDF	Cation Diffusion Facilitator
CHAPS	3-[(3-CHolAmidopropyl)dimethylammonio]-1-PropaneSulfonate
CLC	Chloride chanel
COPT	Copper Transporter
CPA	monovalent Cation / Proton Antiporter
CTR2	Copper Transporter
DMT	Drug / Metabolite Transporter
DTT	1,4-DiThioTréitol
EDTA	acide Ethylène-Diamine-TétraAcétique
ENT	Equilibrative Nucleoside Transporter
GFP	Green Fluorescent Protein
H ⁺ -PPase	PyroPhosphatase
HEPES	Acide (4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic
HTML	HyperText Markup Language (<i>langage de programmation informatique</i>)
IEF	Isoelectrofocalisation
KUP	K ⁺ Uptake Permease
LB	Luria Bertani
LCT	Low affinity Cation Transporter
MATE	Multidrug And Toxin Extrusion
MC	Mitochondrial Carrier
MDR	MultiDrug Resistance protein
MES	2-(N-Morpholino)EthaneSulfonic acid
MFS	Major Facilitator Superfamily

MOP	Multidrug / Oligosaccharidyl-lipid / Polysaccharide
MPP	Mitochondrial and Plastid Porin
MPT	Mitochondrial Protein Translocase
MRP	Multidrug Resistance – associated Protein
MS	Murashig et Skoog
NAP	Non-intrinsic ABC Protein
Nramp	Natural resistance – associated macrophage protein
OPT	OligoPeptide Transporters
P-ATPase	ATPase de type P (plasmalemmique)
PHP	Hypertext PreProcessing (<i>langage de programmation informatique</i>)
PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
PCD	Programmed Cell Death
PDR	Pleiotropic Drug Resistance
POT	Proton-dependent Oligopeptide Transporters
RND	Resistance / Nodulation / Division
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SGBDR	Système de Gestion de Bases de Données Relationnelles
SPFH	Stomatin Prohibitin Flotilin Hbc
SQL	Structured Query Language (<i>Langage d'administration et de requêtes</i>)
TAP	Transporter associated with Antigen Processing
TCA	acide TriChloroAcétique
TGS	Tris Glycine SDS
TIP	Tonoplast Intrinsic Protein
TMD	TransMembrane Domain
TOM	Translocase of the Outer membrane of the Mitochondria
UNC	Unclassified
V-ATPase	ATPase de type V (vacuolaire)
VIC	Voltage-gated Ion Chanel
YSL	Yellow Stripe Like
ZIP	Zinc / Iron Permease

Introduction générale

Alors que les activités industrielles et urbaines sont génératrices d'un grand nombre de polluants, les inquiétudes de la société face à l'altération de la qualité de l'environnement évoluent et tendent à croître depuis plusieurs années. Ces préoccupations motivent le besoin de mieux connaître les effets toxiques de ces polluants afin de les contrôler et d'en limiter la nocivité. Le cadmium (Cd) est un métal lourd, découvert en 1808 par Magnus Martin af Pontin, qui est de plus en plus présent dans l'industrie moderne. Il entre notamment dans la composition de colorants rouges (Cd(S, Se)) et jaunes (CdS) utilisés en chimie des polymères, il est utilisé pour galvanisation de matériaux, il est présent dans les fluides caloporteurs des centrales nucléaires pour la capture des neutrons, ou encore dans les piles et batteries. En 1996, sa consommation annuelle par les industries de l'Union Européenne (UE) atteignait 5 329 tonnes. En parallèle, les émissions dans le milieu naturel (d'origine anthropique ou non) représentaient plus de 15 % de cette valeur, avec un total cumulé supérieur à 837 tonnes annuelles pour l'UE.

Le cadmium n'a aucune fonction physiologique connue. Il est au contraire un toxique important, et son accumulation dans l'organisme provoque des troubles physiologiques graves. Chez les mammifères, il touche principalement les reins (où il se fixe à hauteur de 30 à 40 %) et les os. Il peut alors entraîner l'apparition de cancers, d'une déficience rénale, d'ostéoporose, et de diverses autres affections des poumons, des nerfs ou des articulations notamment. Entre 1912 et 1946, l'intoxication d'une partie de la population japonaise par de fortes concentrations de cadmium suite à la contamination de la rivière Jinzū par une exploitation minière a provoqué l'apparition d'une maladie des reins et des os appelée maladie d'*itai-itai*. Contaminée par plusieurs métaux lourds (plomb, mercure, cadmium), cette rivière irriguait les exploitations de riz, qui ont concentrés le cadmium et qui ont ensuite été consommés par la population locale. Cette assimilation du cadmium *via* la chaîne alimentaire est la première source d'exposition au toxique, et l'accumulation des ions dans les feuilles consommées (salade, choux, tabac ...) est connue pour être la principale origine de contamination par le cadmium chez les hommes, avec une ingestion moyenne de 12 mg par an et par personne. L'épandage d'engrais azoté est la première cause de contamination des sols (263 tonnes de cadmium par an pour l'UE), et les plantes, cultivées ou sauvages, sont constamment soumises à la toxicité de ce métal. Afin de s'en protéger, elles ont développé des mécanismes de résistance aux métaux lourds, certaines espèces croissant sur des sols très contaminés (exploitation minière notamment) présentant même une tolérance particulièrement importante à ces toxiques (*Arabidopsis halleri*, *Thlaspi caerulescens* ...).

L'équipe « Stress Environnementaux et Métaux Lourds » du Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale (UMR 5168 CNRS INRA UJF CEA, à Grenoble) étudie les processus mis en

place par la plante lors d'une exposition aux métaux lourds et aux radionucléides. Ceux-ci peuvent notamment aboutir à la compartimentation des métaux lourds, dont la vacuole est un site privilégié (Clemens, 2006). Cet organite est en effet connu pour être essentiel à l'homéostasie de la quasi-totalité des éléments cellulaires : eau, ions inorganiques ou métabolites (protéines et acides organiques notamment). Il est aussi impliqué dans les processus de dégradation et de recyclage, et contient à cet effet une grande variété d'hydrolases. Toutefois si ces activités de stockage et de dégradation sont prépondérantes dans la vacuole, l'ensemble des fonctions qui lui sont associées ne s'arrête pas à ces seuls aspects. Elle est également connue pour être le lieu de certains processus anaboliques, ou pour son rôle dans la protection cellulaire contre certains pathogènes. L'accumulation du cadmium dans cet organite au cours d'un stress a été démontrée (Vogeli-Lange & Wagner, 1990), et est décrite pour être primordiale dans la tolérance de la plante au métal, sur la base de résultats obtenus à partir d'expériences réalisées en système levure (Ortiz *et al.*, 1992). Or chez les plantes, les mécanismes à l'origine de la séquestration vacuolaire des métaux lourds ne sont pas connus, de même que les processus permettant leur stabilisation, dans des sels ou des complexes d'acides organiques par exemple (Krotz *et al.*, 1989). L'identification des protéines impliquées dans ces processus, et en particulier les composantes de la signalisation aboutissant à l'établissement de la réponse et les transporteurs conduisant à la translocation des ions, permettrait de mieux comprendre le rôle prépondérant de la vacuole dans la protection cellulaire contre les métaux lourds. Les études envisagées nécessitent toutefois de réaliser une analyse approfondie de la vacuole végétale, spécialement d'un point de vue protéique. Le protéome de cet organite est en effet peu connu, et aucune analyse par spectrométrie de masse n'avait été réalisée lors de la mise en place de ce projet. Le laboratoire bénéficie d'une expérience importante dans l'analyse de protéomes sub-cellulaires (Ferro *et al.*, 2002 ; Ferro *et al.*, 2003 ; Bardel *et al.*, 2002 ; Brugiere *et al.*, 2004) et dans l'utilisation de la spectrométrie de masse pour l'identification de protéines et la caractérisation de leur structure primaire (Bourguignon *et al.*, 1993; Bourguignon *et al.*, 1996), pour analyser les modifications post-traductionnelles et caractériser de nouvelles voies métaboliques (Macherel *et al.*, 1996; Gueguen *et al.*, 2000). Plus récemment, l'équipe a pu mettre en place une étude de la réponse de la plante au cadmium à travers des approches globales d'analyses transcriptomique (Herbette *et al.*, 2006), protéomique (Sarry *et al.*, 2006) et métabolomique (Ducruix *et al.*, 2006). Dans un contexte où de nombreux travaux visant à mieux comprendre le rôle de la vacuole dans la tolérance aux métaux lourds n'ont pas permis d'identifier les transporteurs principaux impliqués, l'utilisation de telles approches pourrait aboutir à la mise en évidence de mécanismes essentiels aux fonctions étudiées.

La synthèse bibliographique présentée décrit brièvement l'état de l'art en matière de fonctions vacuolaires dans une première partie, et de réponse végétale au stress métallique dans une seconde partie. Ces connaissances ont déterminées la méthodologie mise en place et les objectifs que nous avons pu nous fixer, présentés dans un dernier paragraphe.

Synthèse bibliographique

Synthèse bibliographique

I - La vacuole végétale

Les vacuoles sont des organites intracellulaires communs à un grand nombre d'organismes vivants. Décrites pour la première fois en 1776 par Spallanzani, leur fonction supposée a évolué au fil de l'acquisition de nouvelles connaissances mais les acteurs métaboliques de ces différentes fonctions restent très mal connus. Délimitées par une simple membrane, elles sont présentes chez la majorité des cellules eucaryotes, et sont impliquées dans un grand nombre de processus essentiels. Elles peuvent ainsi participer au maintien de l'homéostasie de l'eau, et donc à la régulation de la turgescence cellulaire, au contrôle de la concentration cytosolique des composés organiques et inorganiques, aux processus de dégradation et de recyclage des éléments cellulaires ou encore à la protection cellulaire contre divers stress biotiques et abiotiques. Souvent comparées aux lysosomes des mammifères, elles se distinguent de ces derniers par la place qu'elles tiennent dans des processus autres qu'hydrolytiques (stockage ou synthèse par exemple). Il existe d'ailleurs chez certaines plantes des structures plus proches des lysosomes de mammifère (également appelée lysosomes) qui n'ont toutefois qu'un rôle de stockage d'enzymes hydrolytiques (De, 2001).

Ce chapitre a pour but de présenter les fonctions assurées par les vacuoles, en insistant particulièrement sur les vacuoles végétales. Il détaille également en partie les protéines assurant ces fonctions, et notamment les transporteurs du tonoplaste.

I.1 - Occurrence des vacuoles dans le vivant

Les vacuoles sont présentes uniquement chez les eucaryotes. Les seules structures procaryotes sujettes à comparaison sont en effet des « vacuoles de gaz » identifiées chez certaines bactéries (cyanobactéries pour la plupart), et qui permettraient à celles-ci de flotter. Dépourvues de toute activité métabolique, elles ne sont pas assimilées aux vacuoles telles que celles observées chez la cellule végétale.

Les algues, unicellulaires ou pluricellulaires, font partie des organismes les plus ancestraux chez lesquels on observe des vacuoles (exception faite du cas particulier des cyanobactéries, parfois

classées parmi les algues, discuté précédemment). D'une manière générale, ces vacuoles sont très diverses en termes de forme, de structure, ou de fonctions, et sont présentes en un ou plusieurs exemplaires, bien que certaines cellules plus spécialisées (spores ou zygotes par exemple) puissent en être dépourvues. Elles sont également hétérogènes en termes de taille, et peuvent aussi bien correspondre à plus de 90 % du volume cellulaire qu'être difficilement détectables sous un microscope. Certaines algues présentent également un type particulier de vacuoles, appelées vacuoles contractiles. Ces dernières, transitoires, ne font généralement pas plus de 10 µm de diamètre, et sont spécialisées dans le maintien de l'homéostasie cellulaire de l'eau. Lorsque l'influx d'eau dans la cellule menace d'induire la lyse de la membrane, ce type de structure apparaît en plusieurs endroits, et fusionne en une large vacuole contenant l'excédant d'eau cellulaire (phase diastolique). La vacuole contractile fusionne alors à la membrane plasmique (phase systolique) pour libérer son contenu, et le processus est réitéré afin de créer un flux d'eau sortant constant. Ce mécanisme est majoritairement observé chez les algues dépourvues de paroi, donc plus sensibles à la pression osmotique, et pour les espèces évoluant en eau douce.

Ces vacuoles contractiles sont aussi observées chez les zoospores biflagellés des oomycètes, un clade de champignons aquatiques. Comme les algues, les champignons présentent une variété importante de vacuoles (formes et tailles diverses), retrouvées dans tous les types cellulaires de ce taxon (De, 2001). Au sein de ce règne, les levures (*Ascomycètes* et *Basidiomycètes*) contiennent également des vacuoles. Présentes en un ou plusieurs exemplaires et de taille variable, leur fonction est relativement comparable à celle des vacuoles des plantes supérieures et, à ce titre, les levures sont souvent utilisées dans l'étude des fonctions des vacuoles végétales (Schneider *et al.*, 2008 ; Kawachi *et al.*, 2008). Elles se distinguent néanmoins par leur propriété unique de ségrégation lors de la division cellulaire (Conradt *et al.*, 1992), permettant à la vacuole de la cellule mère de se répartir dans les deux cellules filles.

Chez les bryophytes (mousses) et ptéridophytes (fougères), la vacuole est ubiquitaire, à l'exception d'un seul type cellulaire, les anthérozoïdes (gamètes mâles). A l'inverse, toutes les cellules des gymnospermes présentent une ou plusieurs vacuole(s), et en particulier les gamètes. La vacuole participe en effet à l'élargissement des ovules pour l'ensemble des gymnospermes (excepté le genre *Welwitschia*), associé à une division importante des noyaux dans le cytoplasme (jusqu'à 256 noyaux dans un ovule). Présente également dans les pollens (excepté encore pour le genre *Welwitschia*), elle permet une meilleure diffusion anémochore des gamètes.

La distribution des vacuoles chez les angiospermes est, là aussi, quasiment ubiquitaire. De façon générale, la plupart des cellules différenciées présentent une large vacuole centrale, qui remplit l'ensemble des fonctions métaboliques propres à cet organite. Il existe cependant quelques exemples pour lesquels on retrouve plusieurs types de vacuoles, plus spécialisées dans des fonctions particulières et éventuellement associées à une vacuole multifonctionnelle. C'est par exemple le cas des cellules d'aleurone des graines d'orge (Bethke *et al.*, 1996), qui accumulent des quantités

importantes de protéines dans des vacuoles de stockage (*Protein Storage Vacuole*, PSV), et les protéases chargées de leur dégradation dans d'autres vacuoles (*Lytic Vacuole*, LV). La coexistence de ces deux types de vacuoles, avérée chez certaines cellules et pour lesquelles des marqueurs tonoplastiques spécifiques ont été identifiés (Jauh *et al.*, 1999), reste indéterminée pour d'autres types cellulaires (Olbrich *et al.*, 2007 ; Hunter *et al.*, 2007 ; Rogers, 2008). Pour d'autres cellules, la modulation de la turgescence cellulaire *via* l'homéostasie hydrique de la vacuole permet d'exercer un effort mécanique (Lobes des pièges à insectes du genre *Dionaea* ; Cellules de garde, Ward *et al.*, 1995).

I.2 - Rôles de la vacuole végétale et transporteurs impliqués dans ses fonctions

La vacuole végétale a souvent été assimilée à un organe uniquement dédié au stockage de divers composés potentiellement gênant pour la cellule, et ses activités lytiques en font fréquemment un objet de comparaison avec les lysosomes des cellules animales. Si ces deux fonctions, stockage et dégradation, sont effectivement représentées dans la vacuole, l'ensemble des processus impliquant cet organe dépasse de loin ces seuls aspects. Outre le maintien de l'homéostasie cellulaire d'un grand nombre d'ions et de toxiques ou métabolites essentiels *via* leur rétention et éventuellement leur libération dans le cytosol, la vacuole est aussi impliquée dans le *turnover* de nombreux éléments cellulaires (des protéines jusqu'aux organites) ainsi que dans des voies de biosynthèse spécifiques. Ces fonctions très diverses nécessitent la présence sur la membrane vacuolaire (tonoplaste) de transporteurs permettant la translocation des ions et des métabolites vers ou depuis la vacuole, et dont la spécificité, l'efficacité, et la capacité à être régulés sont très variables. Deux types de transport permettent d'assurer les flux métaboliques et ioniques à travers le tonoplaste : le transport passif, indépendant de toute forme d'énergie autre que le gradient électro-chimique de l'élément transporté, et le transport actif, qui nécessite une dépense d'énergie pour que le soluté suive un trajet thermodynamiquement défavorable. Concernant cette dernière famille, l'énergie peut être, dans le cas de la vacuole, sous forme d'ATP ou de PPi, qu'elle soit utilisée de façon directe, *via* leur hydrolyse, ou indirecte *via* le gradient électrochimique qu'ils sont capables de générer. Les fonctions vacuolaires dépendantes de ces transporteurs peuvent être réparties en trois grands groupes : (i) Le maintien de l'homéostasie cellulaire de nombreux éléments essentiels, (ii) la régulation de plusieurs fonctions métaboliques (anaboliques et cataboliques) dont elle est le site privilégié ou exclusif, et enfin (iii) la protection cellulaire contre divers stress biotiques ou abiotiques.

I.2.1 - Maintien de l'homéostasie cellulaire

La vacuole végétale peut, dans certaines conditions, représenter jusqu'à 90 % du volume cellulaire total, le volume cytosolique correspondant alors à moins du dixième de celui de la vacuole. Cette particularité fait de la vacuole un organite adapté au maintien d'une certaine « inertie » ionique et métabolique dans le cytosol, dans la mesure où un faible flux moléculaire entre ces deux compartiments permettra un ajustement précis de la concentration du cytosol sans influencer de façon prononcée sur l'osmoticum de la vacuole. Celle-ci est à ce titre un lieu privilégié de stockage d'ions inorganiques (H^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- , K^+ , NO_3^- , Pi ...) et de molécules plus complexes (carbohydrates, acides aminés, protéines ...), et assure le stockage ou l'export de ces éléments en fonction de leur concentration cytosolique et des besoins de la cellule.

I.2.1.1 - Homéostasie des micro-éléments essentiels

a) *Régulation du pH par la vacuole*

Parmi les ions transportés de façon active dans la vacuole, les protons (H^+) constituent un cas particulier puisqu'ils sont à l'origine de la mise en place d'un gradient de pH de part et d'autre du tonoplaste. Ce gradient contribue non seulement à réguler le pH cytosolique, mais également à maintenir un environnement propre à la vacuole. Le pH vacuolaire (pH_v) est généralement compris entre 5,5 et 6,5, mais peut en quelques occasions descendre jusqu'à 2,5 (Muller *et al.*, 1996). La valeur du pH_v est le plus souvent régulée par les flux de protons au travers du tonoplaste, bien que la présence d'acides organiques dans la vacuole (malate, citrate) puisse en quelques occasions influencer de manière prononcée sur le pH_v .

La balance entre l'entrée et la sortie des H^+ est assurée par plusieurs protéines. Deux transporteurs sont en charge de l'influx des protons : une ATPase vacuolaire (V-ATPase), qui hydrolyse l'ATP comme source d'énergie, et une pyrophosphatase (V-PPase) qui consomme du pyrophosphate. Les contributions relatives de ces deux enzymes dans l'établissement du gradient ne sont pas connues, mais la densité de la PPase à la surface du tonoplaste est décrite pour être supérieure à celle de la V-ATPase (Maeshima, 2001), ces deux pompes constituant, avec les TIP (*Tonoplast Intrinsic Protein*), les principales protéines de la membrane vacuolaire.

L'ATPase vacuolaire est un complexe de 400 à 750 kDa, composé de 2 domaines : le domaine catalytique V_1 , soluble et responsable de l'hydrolyse de l'ATP, et le domaine V_0 membranaire, qui permet la translocation des protons (Sze *et al.*, 2002, Figure 1). Chacun de ces domaines est un complexe macromoléculaire de 5 protéines pour V_0 et de 8 protéines pour V_1 . Chacune de ces protéines est représentée par 1 à 5 isoformes (Sze *et al.*, 2002, Figure 1). Son

fonctionnement est comparable à celui de l'ATPase de type F, localisée notamment à la membrane interne des mitochondries et des chloroplastes, mais selon un principe inverse, l'ATP étant consommé pour générer le gradient. L'énergie chimique résultant de l'hydrolyse de l'ATP est convertie en énergie mécanique, matérialisée par la rotation de la sous-unité V_1 par rapport à la sous-unité V_0 (Imamura *et al.*, 2003). Ce changement de conformation force alors le passage au travers de la membrane, contre leur gradient de concentration, de 2 H^+ par molécule d'ATP hydrolysée (Kawasaki-Nishi *et al.*, 2003).

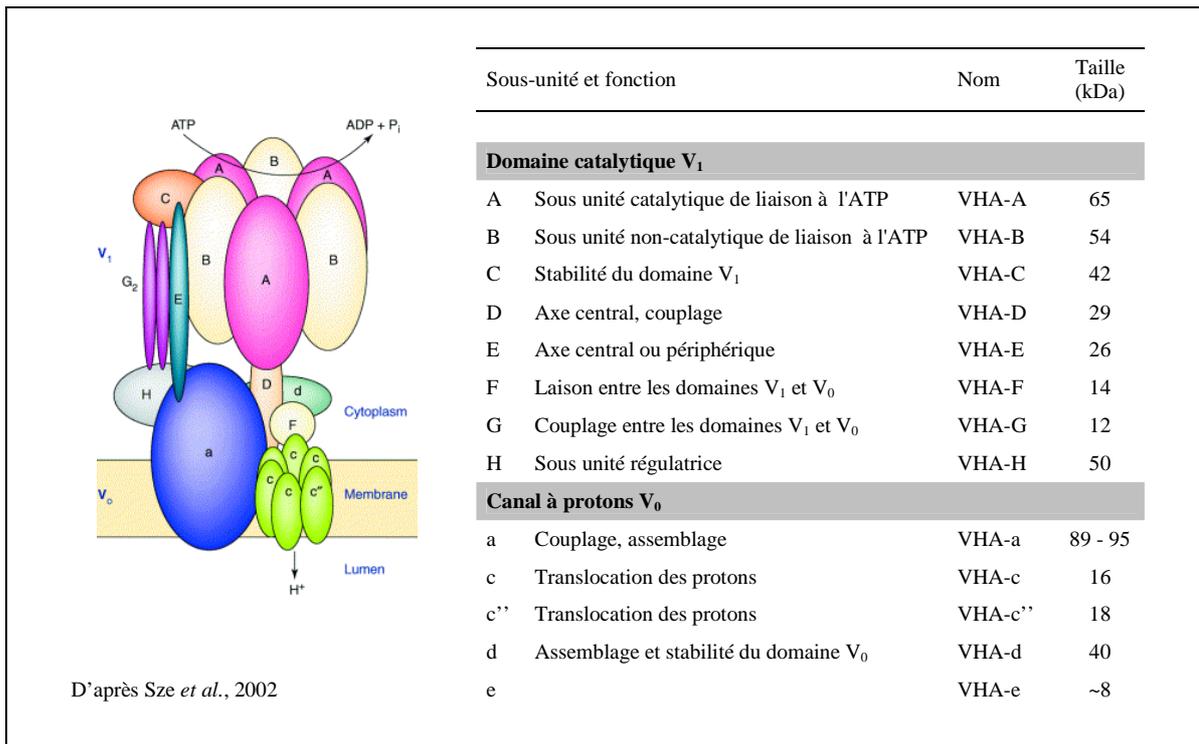


Figure 1 : Structure de l'ATPase vacuolaire de plante. Le domaine soluble V_1 hydrolyse l'ATP, ce qui permet le passage de protons à travers le domaine V_0 , membranaire. La nomenclature des sous-unités protéiques composant chacun des domaines est indiquée (d'après Sze *et al.*, 2002), ainsi que leur fonction et leur taille.

Le second transporteur de protons participant à l'établissement du gradient est la pyrophosphatase, une protéine très majoritaire de la vacuole qui peut représenter de 1 à 10 % du protéome tonoplastique (Rea *et al.*, 1992). Clonée en 1992 (Sarafian *et al.*, 1992), cette enzyme n'est toutefois pas pleinement caractérisée aujourd'hui et son substrat exact, $MgPPi$ ou Mg_2PPi , n'a pas été identifié depuis que son activité strictement magnésium-dépendante a été mise en évidence (Walker & Leigh, 1981). Cette pompe est inhibée de façon réversible par le calcium (Ca^{2+}), probablement *via* la formation de $CaPPi$, un inhibiteur compétitif potentiel. Le potassium est également régulateur (activateur) de l'activité pyrophosphatase (Walker & Leigh, 1981 ; Davies *et*

al., 1991), certains travaux suggérant même que le potassium lui-même pourrait être transporté en même temps que les protons par la V-PPase (Davies *et al.*, 1992).

L'instauration d'un tel pH dans la vacuole est essentielle au fonctionnement de cet organelle, en particulier pour deux raisons : Il caractérise un environnement particulier pour un grand nombre d'enzymes vacuolaires, dont l'activité peut être fortement réduite, voire inhibée, dans un milieu plus alcalin (Mayne & Kende, 1986 ; Canut *et al.*, 1987), de plus la pression électro-chimique engendrée par le gradient de protons (aussi appelée Force Proton-Motrice ou FPM) permet d'activer un certain nombre de transporteurs secondaires, symports ou uniports selon qu'ils transportent dans le même sens ou dans des sens opposés les protons et les solutés. Ces deux types de protéines sont d'ailleurs les seules responsables de l'efflux de H^+ à travers le tonoplaste, et plusieurs d'entre elles ont été mises en évidence dans la vacuole : des symports NO_3^- / H^+ (Blumwald & Poole, 1985a), SO_4^{2-} / H^+ (Hüve *et al.*, 1995), glucose / H^+ (Neuhaus, 2007), ou encore lactose / H^+ (De, 2001), et des antiports Na^+ / H^+ (Apse & Blumwald, 2007), Ca^{2+} / H^+ (Sze *et al.*, 2000), NO_3^- / H^+ (De Angeli *et al.*, 2006) ou saccharose / H^+ (Briskin *et al.*, 1985) par exemple.

b) Stockage d'ions inorganiques

Le stockage de divers ions dans la vacuole peut avoir plusieurs implications : la régulation de la concentration ionique cytosolique pour ajuster leur disponibilité pour les activités métaboliques ou pour contrebalancer un influx particulièrement important dans le cytosol, la régulation de la signalisation induite par certains de ces ions (Ca^{2+} par exemple), ou encore la régulation de la turgescence de la vacuole, en particulier dans les cellules de garde des stomates (Ward *et al.*, 1995).

Flowers proposait dès 1975 que, chez les espèces tolérantes au stress salin, l'excédant cytosolique d'ions pouvait être accumulé dans la vacuole. Quelques années plus tard, il confirmait son hypothèse grâce à l'analyse par microscopie-X des concentrations intracellulaires de Na^+ , Cl^- et K^+ de coupes de *Suaeda maritima*, une chénopodiacée halophyte (Hajibagheri & Flowers, 1989) : alors que les concentrations cytosoliques étaient de 118 et 90 mM pour les ions Na^+ et Cl^- , les concentrations vacuolaires atteignaient respectivement 423 et 445 mM, démontrant la capacité de la cellule à concentrer dans la vacuole les ions excédentaires. Des travaux similaires, conduits sur des tabacs habitués au stress salin, ont également abouti à l'observation de concentrations vacuolaires de 780 et 624 mM pour les ions Na^+ et Cl^- contre des concentrations cytosoliques de 96 mM pour les deux (Binzel *et al.*, 1988).

L'observation de la disparition d'un gradient de protons préétabli dans des vésicules de tonoplaste lors de leur incubation dans une solution de Na^+ (Blumwald & Poole, 1985b ; Garbarino

& Dupont, 1989) a suggéré pour la première fois l'existence d'un antiport Na^+ / H^+ , probablement impliqué dans la détoxification cytosolique du Na^+ . Une telle activité a ensuite pu être confirmée chez l'espèce halophyte *Plantago maritima*, alors qu'elle est absente chez *Plantago media*, sensible au NaCl (Staal *et al.*, 1991), ce qui confirme que la résistance au sel de certaines espèces exploite ce type de transporteur (Fukuda *et al.*, 1998).

La concentration intra-vacuolaire en Cl^- est également impliquée dans la régulation de l'activité de transporteurs d'anions, et en particulier le transport de phosphates et de nitrates (Plant *et al.*, 1994), la vacuole étant d'ailleurs décrite pour être un site majeur de stockage du nitrate (Granstedt & Huffaker, 1982). Les travaux de Plant *et al.* (1994) ont mis en évidence l'existence d'un transporteur de type uniport permettant l'influx de nitrate dans la vacuole (grâce au potentiel électrochimique existant de part et d'autre du tonoplaste), l'efflux de NO_3^- étant régulé par un symport $\text{NO}_3^- / \text{H}^+$ (Blumwald & Poole, 1985b).

Si chez les plantes le phosphate semble majoritairement vacuolaire (jusqu'à 95 %), des travaux conduits sur la levure évoquent sa présence dans la vacuole dans des proportions variables (entre 15 % (Kulaev *et al.*, 1999) et 100 % (Urech *et al.*, 1978) du pool cellulaire). De façon surprenante, pourtant, aucun transporteur tonoplastique n'a clairement été identifié à ce jour. Le stockage vacuolaire du phosphate semble cependant primordial pour la croissance cellulaire en carence de phosphate (Westenberg *et al.*, 1989), ce qui suggère que la vacuole est le site privilégié, sinon exclusif, de maintien de l'homéostasie cellulaire du phosphate.

Le soufre est un élément essentiel de la vie cellulaire et il est principalement assimilé sous forme de sulfate au niveau des racines. Lorsqu'il est en excès dans le milieu, et notamment dans le sol, sa concentration cytosolique peut être régulée de plusieurs façons par la vacuole. La présence sur le tonoplaste d'ATPases permettant le transport du soufre vers la vacuole (Kaiser *et al.*, 1989) permet notamment d'augmenter la concentration vacuolaire de soufre d'un facteur 10 dans les cellules de mésophile d'orge cultivées sur un milieu riche en soufre. Une telle accumulation a pu aussi être observée sur des vacuoles isolées (Kaiser *et al.*, 1989), maintenues dans un milieu concentré en soufre (SO_4^{2-}). Chez les conifères, un symport du sulfate avec le Ca^{2+} , le K^+ ou le Mg^{2+} a pu être mis en évidence (Hüve *et al.*, 1995). De façon très intéressante, l'augmentation de la concentration de soufre dans la vacuole conduit aussi à un rétrocontrôle de l'assimilation du soufre à travers la membrane plasmique (Cram, 1983), observé chez la lentille d'eau (*Lemna minor*) ou la carotte (*Daucus carota*). Cette régulation passe par l'augmentation de l'activité de pompes d'efflux plasmalemmique, jusqu'à atteindre un équilibre entre influx et efflux du sulfate au niveau de la membrane cellulaire, qui stabilise alors la concentration cytosolique (Rennenberg, 1984).

Le sulfate vacuolaire peut ensuite être libéré vers le cytosol en fonction des besoins de la cellule. Chez *Arabidopsis*, deux transporteurs, de type SULTR4, sont responsables de l'efflux de sulfate. Observés à la vacuole grâce à des expériences de fusion traductionnelle avec la GFP

(Kataoka *et al.*, 2004), SULTR4;1 et SULTR4;2 ont été clairement mis en évidence pour leur rôle essentiel dans l'homéostasie du soufre.

Une autre source importante de soufre dans la cellule est due à l'absorption par les feuilles de dioxyde de soufre (SO₂) gazeux, généralement présent à hauteur de 1 à 5 µg / m³ dans l'atmosphère. L'hydratation du SO₂ dans le cytosol conduit à la formation de HSO₃⁻, SO₃²⁻ et H⁺, nocifs pour les fonctions métaboliques. La vacuole permet de stocker le dioxyde de soufre excédentaire, pour des plantes soumises à des concentrations atmosphériques allant jusqu'à 140 µg / m³ (Kaiser *et al.*, 1989). Le devenir du soufre provenant du SO₂ atmosphérique est ensuite incertain, mais il semble qu'il soit majoritairement réduit en sulfate, qui est alors stocké dans la vacuole. Ce dernier est utilisé dans le chloroplaste, comme précurseur dans la synthèse de la cystéine et il a été proposé que cet acide aminé, ainsi que la méthionine, constituent deux formes de stockage du soufre (De, 2001).

Le calcium est un composant essentiel du réseau de signalisation cellulaire. Sa concentration libre cytosolique est maintenue à un très faible niveau en absence de signal, inférieure au micromolaire (100 à 350 nM ; Felle, 1989), alors qu'il peut représenter jusqu'à 5 % de la masse sèche d'une plante (Broadley *et al.*, 2003), sa concentration vacuolaire étant de l'ordre du millimolaire (1,5 à 2,3 mM ; Felle, 1988). L'accumulation de ces ions dans la vacuole nécessite un transport actif, assuré par 2 types de transporteurs : des ATPase de type P (Sze *et al.*, 2000), et des antiports Ca²⁺ / H⁺, appartenant à la famille CaX (*Cation eXchanger*, Shigaki & Hirschi, 2006). Si les ATPases présentent une plus haute affinité pour le calcium (K_m = 0,2 à 1 µM) que les CaX (K_m ~ 10 µM), leur *turnover* est décrit pour être plus lent, ce qui suggère des rôles différents pour ces deux transporteurs dans le maintien et le rétablissement des concentrations calciques cytosoliques. A l'inverse de l'influx vers la vacuole, la libération du calcium ne nécessite pas d'énergie, et passe par au moins 4 transporteurs : deux canaux voltage-dépendants (VVCa et SV), et deux canaux de type « *ligand-gated* » (Sanders *et al.*, 2002).

De façon surprenante, les canaux de type VVCa (*Vacuolar Voltage-gated Ca²⁺*) s'ouvrent pour des potentiels de membrane positifs côté cytosol, et notamment pour des potentiels compris entre + 25 et + 40 mV (Johannes *et al.*, 1992). Ces valeurs sont en dessous des potentiels de membrane mesurés entre le tonoplaste et le cytosol, autour de + 50 mV côté cytosol (Sze, 1985), et compte tenu de la différence de concentration en ions Ca²⁺ entre ces deux compartiments, ce type de régulation semble peu compatible avec le maintien de l'homéostasie calcique cytosolique. L'ouverture de ce transporteur est également activée par le calcium, mais aussi inhibée par les protons vacuolaires, susceptibles alors de contrôler la fermeture du canal en conditions normales, mais non lors de la libération de Ca²⁺ dans le cytosol, ce qui pourrait l'impliquer dans l'amplification d'un signal calcique existant, la libération de Ca²⁺ faisant basculer le canal vers une conformation ouverte.

Les canaux de type SV (*Slow-activating Vacuolar*) sont parmi les canaux ioniques les plus connus de la vacuole, en particulier grâce à l'identification d'un membre de cette famille : TPC1 (*Two Pore Chanel 1*, Furuichi *et al.*, 2001). Ce transporteur est lui aussi activé par le calcium, mais également par le magnésium (Pei *et al.*, 1999), ce qui suppose la présence de deux sites de liaison aux métaux : l'un, catalytique, spécifique du calcium et l'autre, activateur, acceptant le calcium ou le magnésium avec des affinités comparables (de l'ordre du millimolaire, Pei *et al.*, 1999). A l'inverse, certains métaux lourds (Zn^{2+} , Ni^{2+}) présentent une activité inhibitrice (Carpaneto, 2003). Ce transporteur est décrit pour être le canal le plus abondant du tonoplaste, avec une densité de l'ordre de 1 protéine / μm^2 , et la perte d'efflux calcique vacuolaire de type SV (réponse lente) chez les mutants *tpc1* (Peiter *et al.*, 2005) suggère qu'il est le seul de ce type localisé au tonoplaste.

On peut noter que plusieurs études conduites sur les cellules de gardes, dont l'ouverture et la fermeture des stomates font intervenir le Ca^{2+} comme messager secondaire, montrent une implication de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3 , DeWald *et al.*, 2001) et du cADP Ribose (cADPR, Grabov & Blatt, 1999) dans la libération de calcium vers le cytosol. La caractérisation moléculaire de tels transporteurs n'a toutefois pas encore été réalisée, et leur localisation tonoplastique n'est pas totalement avérée. Le calcium libéré pourrait en effet avoir pour origine le réticulum endoplasmique (Martinec *et al.*, 2000 ; Navazio *et al.*, 2001), des expériences de patch-clamp réalisées sur vacuoles isolées n'ayant pas permis de confirmer leur présence (Pottosin & Schonknecht, 2007).

c) *Stockage de l'eau*

La vacuole est le lieu principal de stockage de l'eau dans la cellule végétale, et participe à ce titre au maintien de la turgescence cellulaire. Les aquaporines vacuolaires (TIP, *Tonoplast Intrinsic Protein*) assurent toutefois un transport passif des molécules, et c'est grâce à l'instauration d'un gradient de solutés de part et d'autre de la membrane vacuolaire que l'eau y est accumulée. Les cellules de garde sont, en particulier, soumises à de fréquents changements de leur pression osmotique, qui permettent l'ouverture et la fermeture des stomates. Si plusieurs mécanismes participent à ce processus, c'est principalement l'accumulation et le re-largage de solutés dans la cellule qui induisent l'accumulation et le re-largage de l'eau, permettant respectivement l'ouverture et la fermeture du stomate (Schroeder *et al.*, 2001). La concentration cytosolique en calcium est déterminante dans la transmission du signal, et c'est principalement la concentration cellulaire en potassium (K^+), qui permet de modifier la pression osmotique, et donc la turgescence des cellules de garde. Il est toutefois intéressant de noter que le gradient ionique n'est pas le seul moyen de régulation des flux d'eau à travers le tonoplaste, certaines TIP (α -TIP) présentant une régulation de leur activité *via* la phosphorylation d'un site spécifique (Maurel *et al.*, 2008).

I.2.1.2 - Stockage de molécules plus complexes

a) Les acides aminés

La présence d'acides aminés dans la vacuole est connue depuis longtemps (Martinoia *et al.*, 1981), et résulte de plusieurs processus. La dégradation de certaines protéines par des protéases est notamment une source importante d'acides aminés dans la vacuole, mais l'identification de nombreux transporteurs tonoplastiques impliqués dans leur translocation, dans un sens ou dans l'autre, atteste du rôle actif majeur de la vacuole dans l'homéostasie de ces éléments au cours de la vie cellulaire, et notamment de leur influx depuis le cytosol. Plusieurs études, conduites sur des vacuoles de mésophylle d'orge, ont abouti à la mise en évidence de transporteurs de phénylalanine (Homeyer & Schultz, 1988), d'alanine, de glutamine, de leucine et de méthionine (Dietz *et al.*, 1990), d'arginine et d'aspartate (Martinoia *et al.*, 1991), ou encore de glycine (Goerlach & Willms-Hoff, 1992). D'une manière générale, et bien que le ratio de partition des acides aminés entre le cytosol et la vacuole dépende fortement de l'acide aminé et de l'espèce végétale considérés, leur concentration vacuolaire (C_v) reste relativement faible comparée à leur concentration cytosolique (C_c). Certains travaux mentionnent par exemple une concentration totale vacuolaire inférieure à 2 mM contre 275 mM dans le cytosol (Winter *et al.*, 1993). D'autres travaux concluent à un rapport C_c/C_v de 41, 38 et 26 pour respectivement la glutamine, le glutamate et l'aspartate, dans les feuilles d'épinard (Winter *et al.*, 1994), confirmant la faible teneur en acides aminés de la vacuole.

De façon intéressante, la partition cytosol / vacuole chez la levure semble très différentes, la C_v étant décrite pour être bien supérieure à la C_c : les travaux de Wiemken et Nurse (1973) font état chez *Candida* d'un pool vacuolaire correspondant à 90 % du total cellulaire. Si, chez *Saccharomyces cerevisiae*, la concentration vacuolaire est également plus importante que la concentration cytosolique (d'un facteur 20), l'acide glutamique, qui compte pour un tiers du total d'acides aminés, est par contre quasiment absent de la vacuole (Wiemken & Dürr, 1974).

b) Les sucres

Sur terre, les plantes supérieures produisent 400 millions de tonnes de saccharose par an, constituant la forme principale d'énergie et de carbone dans la plante. Synthétisé dans les feuilles, le saccharose est ensuite véhiculé à travers la plante *via* le phloème, et si dans certains cas la concentration de saccharose vacuolaire est de loin supérieure à celle du cytosol (betterave sucrière : $C_c = 76$ mM, $C_v = 514$ mM ; Saftner *et al.*, 1983), elle lui est souvent inférieure (orge : $C_c = 232$ mM, $C_v = 21$ mM ; Winter *et al.*, 1993, épinard : $C_c = 53$ mM, $C_v = 11$ mM ; Winter *et al.*, 1994). Il arrive alors que, si le saccharose ne s'accumule pas dans la vacuole, certains hexoses s'y concentrent (Preisser *et al.*, 1992 ; Heineke *et al.*, 1994).

Le transport du saccharose à travers le tonoplaste fait intervenir des voies de transport passif de simple diffusion (De Leon *et al.*, 1988), ou actif (Wilson & Lucas, 1987). Dans ce dernier cas c'est un transporteur secondaire de type antiport saccharose / H⁺ qui assure la translocation (Thom & Komor, 1984). Plusieurs publications suggèrent toutefois l'existence d'un transporteur d'hexoses (glucose, fructose ...), qui expliquerait la présence de ces derniers dans la vacuole. En 1986, les travaux de Thom et de Marezki mettent en évidence une accumulation de saccharose et de saccharose-phosphate à l'intérieur de vésicules de tonoplaste de canne à sucre incubées dans une solution d'UDP-glucose (Marezki & Thom, 1986). Cette observation reprenait l'hypothèse, formulée quelques années plus tôt, d'un complexe protéique de synthèse et de translocation des sucres enchâssé dans le tonoplaste (Browne & Coombe, 1984), dont l'activité sucrose-phosphate synthase serait cytosolique et l'activité sucrose-phosphate phosphatase vacuolaire (Hawker *et al.*, 1987). Un tel processus a d'ailleurs pu être confirmé ensuite sur des vacuoles de betterave rouge (Voß & Weidner, 1988), avec l'identification des 5 activités enzymatiques permettant la synthèse et le transfert du saccharose, ATP-dépendant, depuis le cytosol vers la vacuole. Toutefois aucun mécanisme similaire n'a pu être observé jusqu'à présent sur d'autres espèces végétales, pour lesquelles l'hypothèse de transporteurs indépendants des mécanismes de synthèse semble plus probable (De, 2001). Plus récemment, un groupe a identifié chez *Arabidopsis thaliana* une famille de transporteurs tonoplastiques de monosaccharides, appelée *Tonoplast Monosaccharide Transporter* (TMT, Wormit *et al.*, 2006), qui catalyse l'import de glucose et fructose dans la vacuole *via* la force proton-motrice. Ces transporteurs sont à ce jour les seules protéines responsables de l'influx d'oses dans la vacuole caractérisées d'un point de vue moléculaire et fonctionnel chez *Arabidopsis*. Les membres d'une autre famille de protéines, identifiés chez l'orge (*HvSUT*, Weschke *et al.*, 2000) et *Arabidopsis* (*AtSUT4*, Weise *et al.*, 2000), agiraient plutôt comme symport saccharose / H⁺, et participeraient donc à l'efflux, de la vacuole vers le cytosol, du saccharose (Neuhaus, 2007).

c) *Acides organiques*

Plusieurs autres composés organiques sont stockés dans la vacuole, certains d'entre eux participant à des processus métaboliques cellulaires fondamentaux. Parmi ceux-ci, des acides organiques de plusieurs types peuvent être identifiés dans la vacuole. Il s'agit soit d'acides dicarboxyliques (oxalate, malate, ou tartrate ; Wagner, 1981), soit d'acide tricarboxylique (citrate, Muller *et al.*, 1996). Ces métabolites sont décrits comme étant en quantité suffisante pour atteindre parfois 50 % de la masse sèche de certaines feuilles, et leur concentration vacuolaire peut être amplement supérieure à celle du cytosol (jusque 24 fois dans le cas de l'acide citrique ; De, 2001).

Leurs fonctions sont diverses : le citrate est stocké dans les vacuoles des fruits du citronnier et entraîne une baisse du pH vacuolaire jusqu'à une valeur de 2,5, et le malate peut participer au

maintien de l'homéostasie cellulaire (contrôle de la turgescence par exemple) ou à la photosynthèse chez les plantes à métabolisme crassulacéen (plantes de type CAM). Chez celles-ci, le CO₂ est fixé durant la nuit par la phosphoénol-pyruvate carboxylase, et stocké dans la vacuole sous forme d'acide malique, après l'action de la malate deshydrogénase. De jour, les stomates se ferment pour limiter les pertes d'eau et le malate vacuolaire est libéré dans le cytosol, où il est transformé en CO₂ + pyruvate par l'enzyme malique NADP-dépendante chloroplastique. Le CO₂ est alors fixé par la RuBisCO pour sa réduction en glyceraldehyde-3-phosphate.

Le premier transporteur vacuolaire d'acides organiques a été identifié en 2003 (*AttDT*, Emmerlich *et al.*, 2003) sur la base de son homologie avec un symport Na⁺/acide dicarboxylique humain localisé dans le rein. De façon intéressante, et contrairement à son homologue de mammifère, *AttDT* semble transporter plus particulièrement le malate, et n'est pas énergisé par un co-transport des acides organiques avec le sodium. Plus récemment, un second transporteur a été également identifié (*AtALMT9*, Kovermann *et al.*, 2007), ces deux protéines participant à l'influx de malate dans la vacuole.

d) *Anthocyanes*

Les anthocyanes sont des pigments souvent présents dans les vacuoles des cellules des pétales de fleurs, où elles ont un rôle attracteur pour les insectes, quoiqu'elles puissent être également impliquées dans la protection cellulaire contre les UV (Mori *et al.*, 2005). Non seulement essentielles pour leur stockage, les vacuoles semblent aussi être le lieu de synthèse des anthocyanes, certaines activités ayant été suggérées pour être tonoplastiques (De, 2001).

Le transport des anthocyanes à travers la membrane vacuolaire peut être le fait de plusieurs mécanismes. Leur acylation dans le cytosol, par exemple, permet leur prise en charge par un transporteur (Hopp & Seitz, 1987), et une autre forme de transport, conjugués à un glutathion, a aussi été mis en évidence (Marrs *et al.*, 1995). Une fois dans la vacuole, le changement conformationnel induit par le pH piège le pigment et il est alors fréquent que les anthocyanes forment des structures denses globulaires, appelées cyanoplastes. Cette concentration particulière de pigments comprend également des protéines dont VP24 qui a été décrite comme étant impliquée dans la formation de ces cyanoplastes (Nozue *et al.*, 1997).

I.2.2 - Implication de la vacuole dans des fonctions métaboliques

I.2.2.1 - Anabolisme

Si le rôle le mieux connu des vacuoles est le stockage ou la dégradation, elles peuvent être également, en quelques occasions, le siège de différentes activités de biosynthèse, que ce soit à

l'intérieur de la vacuole ou lors du passage des métabolites à travers le tonoplaste (Browne & Coombe, 1984). Ces processus de biosynthèse vacuolaire affectent des voies métaboliques très diverses.

La synthèse du saccharose au niveau du tonoplaste à partir du glucose-phosphate cytosolique, évoquée précédemment, est un exemple d'activité anabolique reliée au tonoplaste. Des invertases sont également présentes dans la vacuole et assurent un équilibre entre les hexoses (glucose, fructose) et le saccharose. Le métabolisme des sucres est d'ailleurs également représenté dans la vacuole à travers la synthèse de fructanes (tels que l'inuline), des polymères de fructose constituant une réserve de carbone (Keller *et al.*, 1988).

La dernière étape de la synthèse de l'éthylène, à partir de l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxilique, a également été observée dans la vacuole (Mayne & Kende, 1986). Une telle localisation de l'étape ultime de la synthèse d'une hormone est intéressante, et semble résulter de la nécessité d'un environnement particulier, optimal pour cette synthèse. Les auteurs montrent en effet que, si la synthèse d'éthylène a lieu dans des vacuoles intactes, la destruction du tonoplaste par divers moyens (découplants ou congélation par exemple) inhibe cette activité, suggérant la nécessité d'un gradient ionique de part et d'autre de la membrane. Cette hypothèse est d'ailleurs soutenue par l'observation d'un accroissement de la synthèse d'éthylène avec l'augmentation du pH du milieu d'incubation entre 5 et 7,5.

Un grand nombre de plantes, principalement des familles des *Apocynaceae* (ex. pervenche de Madagascar), des *Solanaceae* (ex. tomate) et des *Papaveraceae* (ex. pavot), est capable de produire et de stocker des alcaloïdes dans la vacuole. La pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) a été particulièrement étudiée pour sa capacité à synthétiser plus de cent alcaloïdes différents, dont certains ont une forte valeur pharmacologique (tels que la vinblastine un inhibiteur de la polymérisation de la tubuline utilisé notamment dans le traitement de cancers). Cette synthèse nécessite comme précurseur le géraniol, produit dans le chloroplaste, qui est transporté à l'intérieur de la vacuole, où vont se dérouler les premières étapes de synthèse conduisant à la production des alcaloïdes. Le transport du géraniol est assuré par une protéine de type cytochrome P450 liée à la membrane, G10H (géraniol-10-hydroxylase, Meijer *et al.*, 1993), qui convertit également le géraniol en 10-hydroxygéraniol. Ce dernier est ensuite transformé, *via* plusieurs étapes vacuolaires, en secologanine, qui est alors couplée à la tryptamine par une strictosidine synthase pour former la strictosidine, le précurseur de tous les alcaloïdes indoliques. La suite du processus de synthèse est moins bien connue, et pourrait faire intervenir des étapes cytosoliques et vacuolaires. La strictosidine serait transportée vers le cytosol où le groupement glucose serait éliminé, conduisant à

la formation d'ajmalicine, ensuite ré-importée dans la vacuole (De, 2001). Elle y subirait alors d'autres modifications, notamment sous l'action de peroxydases (ajmalicine → serpentine).

Les alcaloïdes une fois synthétisés sont en règle générale retenus dans la vacuole, leurs rôles dans la défense contre les pathogènes (Vazquez-Flota *et al.*, 2004) en faisant des molécules potentiellement toxiques pour le métabolisme cellulaire. Cette importance de la séquestration vacuolaire des alcaloïdes a d'ailleurs été récemment confirmée par l'observation de la formation de nombreuses vacuoles dans des cellules en culture soumises à une exposition de quelques minutes à de la cocaïne (Yu *et al.*, 2008).

1.2.2.2 - Dégradation et recyclage des constituants cellulaires

Surtout connue pour son rôle dans les processus de recyclage et d'autophagie, la vacuole présente effectivement un potentiel hydrolytique important, incluant tout autant des activités protéasiques et glycosidiques, relativement bien décrites dans la littérature, que des activités de type estérases (phosphomonoésterases, phosphodiésterases et acétylésterases) et nucléases (Abel *et al.*, 1989), probablement impliquées dans le turn-over des membranes et dans celui des acides nucléiques.

a) Activités protéasiques

Parmi les protéases cellulaires, les endopeptidases sont décrites pour être exclusivement vacuolaires. Les aminopeptidases majoritairement cytosoliques, peuvent aussi être présentes dans la vacuole. Comparées aux formes cytosoliques, les peptidases vacuolaires présentent une grande stabilité lorsqu'elles sont soumises à des attaques protéolytiques, et sont capables de dégrader les protéines du cytosol plus efficacement que les protéases cytosoliques (Canut *et al.*, 1987), ce qui souligne leur rôle fondamental au cours des mécanismes d'autophagie. Leur activité est toutefois extrêmement régulée, *via* leur dépendance à un pH optimum d'activité (Canut *et al.*, 1987), mais également *via* la présence d'inhibiteurs de protéases dans la vacuole (Ryan, 1980).

Moriyasu et Tazawa (1988) furent parmi les premiers à mettre en évidence une activité protéasique à l'intérieur de la vacuole en remplaçant, par perfusion, une partie du contenu de vacuoles purifiés par une solution de BSA qui est entièrement digérée après 16 h d'incubation. Le remplacement total et non plus partiel, de la fraction soluble ne permettant pas d'observer une quelconque activité protéasique, les auteurs conclurent à la présence de peptidases solubles, et non associées à la membrane, dans les vacuoles (Moriyasu & Tazawa, 1988). De façon très intéressante, ce type d'expérience mit également en évidence l'importance de l'intégrité du tonoplaste pour cette activité, aucune dégradation protéique n'étant observée lors de l'incubation de BSA dans une suspension de vacuoles lysées (Canut *et al.*, 1985).

Les activités protéasiques de la vacuole interviennent dans le cadre de plusieurs fonctions cellulaires. Elles sont par exemple impliquées dans la dégradation de protéines anormales, qui peuvent être spécifiquement dirigées vers la vacuole afin d'y être recyclées. Un tel mécanisme a pu être mis en évidence suite à l'expression de protéines mutées, fonctionnelles ou non, dans des cellules de plantes, redirigées vers la vacuole par le métabolisme cellulaire pour y être dégradées (Pueyo *et al.*, 1995 ; Chang & Fink, 1995).

Les protéases vacuolaires peuvent également intervenir dans la maturation de certaines protéines. Celles-ci, non fonctionnelles dans le cytosol, deviennent actives après maturation dans la vacuole (phosphatase alcaline vacuolaire par exemple, Noda *et al.*, 1995). A l'inverse, la vacuole peut être impliquée dans la régulation négative de l'activité de certaines protéines à travers leur dégradation, dans le cadre d'un *turnover* plus ou moins rapide (Canut *et al.*, 1985).

Quoique mis en évidence uniquement chez la levure, un autre aspect particulièrement intéressant des activités protéasiques de la vacuole consiste en la régulation de la signalisation intercellulaire (Chvatchko *et al.*, 1986). Certaines levures émettent en effet des phéromones protéiques (facteurs α et β), qui se lient à des récepteurs plasmalemmiques. Ces complexes sont ensuite internalisés puis transportés dans la vacuole où ils sont dégradés.

b) Autophagie

L'autophagie est un processus particulier au cours duquel des fractions entières non sélectives de cytosol, pouvant éventuellement inclure des organites, sont transférées dans la vacuole pour y être dégradées. Ce phénomène est connu depuis longtemps et fait partie des premières fonctions attribuées à la vacuole (Villiers, 1967). Ce processus peut avoir principalement deux origines : une carence en éléments nutritifs conduisant à un recyclage d'une partie des éléments cellulaires, ou une évolution de la cellule vers une spécialisation.

Le phénomène d'autophagie lors d'une carence carbonée a pu être mis en évidence suite à l'observation par microscopie électronique d'une forte régression du cytoplasme, associée à une expansion de la vacuole, chez des cellules cultivées dans un milieu pauvre en carbone (Aubert *et al.*, 1996). Ces mêmes travaux montrent toutefois que l'activation des processus d'autophagie dans la cellule ne dépend pas de la quantité de sucre (saccharose ou hexoses) disponible, mais plutôt de la présence de substrats de la respiration (pyruvate et glycérol en particulier) pour les fonctions mitochondriales. L'importance de ces processus dans la réponse de la plante aux carences est également soulignée par l'hypersensibilité de mutants affectés dans les mécanismes d'autophagie (*Atatg4a4b-1*) lorsqu'ils sont cultivés dans des conditions limitantes en différents nutriments (Bassham *et al.*, 2006).

L'autophagie prend des proportions extrêmes lorsque la vacuole est lysée dans le but de libérer dans le cytosol les hydrolases qu'elle contient, ce qui conduit à la mort de la cellule. Ces processus particuliers ont par exemple lieu lors de la différenciation cellulaire et ont été notamment observés lors de la formation de cellules laticifères chez *Euphorbia characias*, lors du développement des cotylédons ou lors de la gamétogenèse (De, 2001 ; Bassham *et al.*, 2006). Ce phénomène est également à l'origine de la formation du xylème primaire, à partir des cellules du méristème (Wodzicki & Humphreys, 1973). Dans un premier temps, la cellule stoppe son activité photosynthétique et commence à produire la paroi secondaire. Elle augmente alors la synthèse d'enzymes hydrolytiques, DNase ou protéases à sérine notamment, qui sont stockées dans la vacuole. Lorsque la consolidation de la paroi est terminée, la vacuole est lysée et l'ensemble des enzymes libéré dans le cytosol.

On retrouve un processus identique lors de l'activation du programme de mort cellulaire induit par des pathogènes (réponse hypersensible). Ce mécanisme requiert la présence d'une protéase particulière, γ -VPE (*Vacuolar Processing Enzyme*), une protéase à cystéine comparable aux caspases (intervenant dans le programme de mort cellulaire chez les mammifères). Lors d'une attaque par certains pathogènes, cette protéase est surexprimée sous forme de préprotéine. Son autolyse en proprotéine dans le cytosol permet de l'accumuler dans la vacuole, où une nouvelle maturation permet de l'activer. La vacuole est alors lysée et les protéases libérées (Seay & Dinesh-Kumar, 2005).

I.2.3 - Protection cellulaire

Le troisième rôle principal de la vacuole tient dans sa capacité à assurer la protection de la cellule contre un grand nombre de toxiques. Elle permet non seulement de confiner ces éléments loin des fonctions métaboliques principales, mais elle héberge en outre des enzymes capables de dégrader certains de ces toxiques et des métabolites (acides organiques par exemple) qui participent à la réduction du potentiel toxique de certains xénobiotiques.

I.2.3.1 - Détoxification des xénobiotiques

Les xénobiotiques définissent les composés d'origine anthropique. De façon générale, ils désignent plus particulièrement les drogues, pesticides ou herbicides présents dans la nature et auxquels peuvent être soumis les organismes biologiques. Chez les plantes, leur détoxification est étroitement liée à la vacuole, qui intervient dans leur séquestration et éventuellement leur dégradation. On peut définir trois phases dans le processus conduisant à leur détoxification (Ishikawa, 1992).

La phase d'activation (phase I) est cytosolique, et fait intervenir des enzymes et notamment des cytochromes P450 (Barrett, 1995) catalysant l'oxydation, la réduction ou l'hydrolyse du xénobiotique. Cette étape a pour but d'ajouter, ou de rendre accessible, un groupement fonctionnel permettant l'adjonction d'un glucose, d'un glutathion ou d'un acide glucuronique (phase II).

Le conjugué résultant de la phase II est généralement : i) moins actif sur sa cible initiale, ii) plus hydrophile, iii) moins mobile et, iv) plus facilement transportable pour sa compartimentation.

L'élimination, ou la compartimentation, des conjugués (phase III) est généralement considérée comme l'étape ultime dans le processus de protection. Si le transport des molécules vers l'apoplaste est connu mais peu mentionné dans la littérature, leur compartimentation dans la vacuole a fait l'objet de plusieurs travaux. Leur transport à travers le tonoplaste est assuré par des protéines de type ATP Binding Cassette (Lu *et al.*, 1997), capables de prendre en charge un large spectre de métabolites. Un même transporteur (*AtMRP2*) est par exemple décrit pour être capable de transporter tout autant les conjugués du glutathion que les produits du catabolisme de la chlorophylle (Lu *et al.*, 1998).

1.2.3.2 - Détoxification des espèces actives de l'oxygène

Les espèces actives de l'oxygène (EAO : peroxyde d'hydrogène H₂O₂, radical hydroxyle OH, ion superoxyde O₂⁻, ion hydroxyle OH[•] ...) apparaissent dans la vie cellulaire suite à plusieurs facteurs (exposition aux UV, à certains métaux lourds ou à certains xénobiotiques) et leur accumulation dans le cytosol est extrêmement dangereuse pour la cellule. Particulièrement nucléophiles, ils sont susceptibles de réagir avec un très grand nombre de métabolites, mais également avec les membranes, induisant leur destruction. La production de telles molécules est d'ailleurs un mécanisme de défense de la plante contre certains pathogènes, en tant que molécule toxique mais également en tant que composante de la voie de signalisation (Garcia-Brugger *et al.*, 2006).

Outre le glutathion qui participe activement à la détoxification des EAO, la cellule végétale bénéficie de plusieurs autres molécules intervenant dans la protection contre les EAO : ascorbate, caroténoïdes ou flavonoïdes par exemple. Les flavonoïdes, en particulier, sont décrits pour être en forte proportion dans la vacuole. Ils interviendraient toutefois plus spécifiquement dans la détoxification de l'H₂O₂, suffisamment stable pour diffuser à travers les membranes. Certains travaux suggèrent même une action conjointe d'une peroxydase vacuolaire avec les flavonoïdes dans la réduction du peroxyde d'hydrogène (Yamasaki *et al.*, 1997).

1.2.3.3 - Compartimentation des métaux lourds

Un autre aspect du rôle de la vacuole dans la protection cellulaire à travers la compartimentation de divers toxiques est sa capacité à séquestrer les métaux lourds (métaux de

densité supérieure à 5 g / cm^3). On distingue généralement les métaux lourds ayant une activité biologique (Zn^{2+} , Cu^{2+} par exemple), de ceux n'en ayant pas, qui sont exclusivement toxiques (Hg^{2+} , Cd^{2+} par exemple). Cette notion de toxicité reste toutefois fortement dépendante de la concentration considérée et la cellule végétale doit finement réguler la quantité d'ions métalliques libres dans le cytosol. L'excédent peut alors être confiné dans la vacuole soit sous forme de sels d'acides organiques (Krotz *et al.*, 1989), soit lié à des molécules plus spécialisées telles que les phytates ou les phytochélatines (pour revue voir Clemens, 2006).

Cet aspect du rôle de la vacuole dans la détoxification des métaux lourds, et en particulier dans la détoxification du cadmium, sera plus développé dans la suite de la synthèse bibliographique.

II - Le stress cadmium chez les plantes

L'industrialisation croissante de cette dernière décennie est à l'origine de la libération dans la nature de quantités toujours plus importantes de métaux lourds, et notamment de cadmium (Cd). Tous les écosystèmes, aquatiques ou terrestres, sont touchés, soit du fait d'une contamination directe (épandage d'engrais, exploitations minières ...), soit suite à la libération dans l'atmosphère des métaux (*via* la combustion d'énergie fossile par exemple) qui sont ensuite disséminés. Les concentrations en cadmium sont alors très variables et s'inscrivent dans un intervalle compris entre 0,04 et 35 μM (Sanita di Toppi & Gabrielli, 1999), la plupart des sols présentant une concentration en cadmium inférieure à 0,32 μM (correspondant à l'abondance naturelle de cet élément). Une terre est considérée comme modérément polluée si la concentration en cadmium est comprise entre 0,32 μM et 1 μM . Dans la plante, le cadmium est exclusivement toxique et affecte de nombreuses fonctions physiologiques telles que la photosynthèse, le métabolisme de l'azote ou l'assimilation de nutriments (Sanita di Toppi & Gabrielli, 1999). Il peut également être à l'origine d'une dérégulation de la balance hydrique (Poschenrieder *et al.*, 1989), en particulier *via* son homologie avec le calcium (dérégulation de l'ouverture des stomates). Le cadmium est également décrit pour être à l'origine de la production d'espèces actives de l'oxygène, bien qu'il ne participe pas directement à leur formation, comme c'est le cas par exemple pour le cuivre *via* les réactions de Fenton et / ou Haber-Weiss. Il est également susceptible de se lier à l'ADN, et donc de modifier l'expression des gènes (Deckert, 2005).

Au-delà d'une concentration de 1 μM le sol est décrit comme fortement pollué, et pour les cas extrêmes, seules les espèces végétales hyper-accumulatrices peuvent se développer.

II.1 - Entrée du cadmium dans la plante

Il n'est toutefois pas aisé de faire un parallèle entre la concentration des métaux lourds dans le sol et leur concentration dans les végétaux. La biodisponibilité du métal est soumise à de nombreux facteurs tels que le pH, la quantité des matières organiques, la température, ou encore la concentration du sol en ions divers.

L'assimilation du cadmium par les plantes se fait exclusivement par les racines (concentration atmosphérique quasi nulle) et est assurée par des transporteurs ioniques (Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} par exemple) suffisamment peu spécifiques pour permettre au cadmium de s'y lier et d'être transporté. Une concentration importante de ces éléments dans le sol contribuera, par compétition, à limiter l'entrée du cadmium dans les racines (Clemens, 2006). Chez le blé, le transporteur de calcium LCT1 (*Low-affinity Cation Transporter 1*) a par exemple été caractérisé quant à sa capacité à transporter le cadmium, sa surexpression en système levures rendant ces dernières hypersensibles (Clemens *et al.*, 1998). Le transport de cadmium par LCT1 *in planta* n'a toutefois pas pu être confirmé. Chez *Arabidopsis*, si l'homologue de LCT1 n'a pas été identifié, une autre catégorie de transporteurs de métaux (*ZIP : ZRT/IRT-like Protein*) a été décrite pour être la principale voie d'assimilation du fer dans la plante (Curie & Briat, 2003 ; Vert *et al.*, 2002, Figure 2), et leur faible spécificité les conduit à transporter également le zinc, le manganèse, le cobalt ou le cadmium (Korshunova *et al.*, 1999). Ce n'est toutefois pas le cas de tous les transporteurs de cette famille, IRT2 ne transportant pas de cadmium en système levure (Vert *et al.*, 2001).

Une autre protéine de cette famille, IRT1, a été mise en évidence pour sa capacité à transporter le cadmium (Korshunova *et al.*, 1999). L'expression de IRT1 est induite par une carence en fer (Connolly *et al.*, 2002), ce qui confirme encore l'influence de la concentration en métaux autres que le cadmium sur son assimilation par la plante. Le transport du zinc par certaines protéines (ZIP1, ZIP2 et ZIP3) a aussi été montré comme étant partiellement inhibé par le cadmium en système levure (Grotz *et al.*, 1998), le transport du cadmium par des protéines de type ZIP ayant été démontré chez les mammifères (Dalton *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent, là également, une compétition entre les ions métalliques (dont le cadmium) dans leur assimilation.

Si, d'une manière générale, l'accumulation de cadmium dans la plante semble résulter exclusivement d'un transport peu spécifique de cet élément strictement toxique, on peut toutefois mentionner l'existence d'un écotype de l'espèce hyper-accumulatrice *Thlaspi caerulescens* (écotype Ganges) présentant un K_m relativement faible pour le cadmium (0,2 μM - Lombi *et al.*, 2001) associé à une assimilation du cadmium même en large excès de Zn^{2+} . Les auteurs concluent à l'existence chez cette espèce d'un transporteur spécifique du cadmium, seul exemple de la littérature. Une deuxième particularité concerne l'existence, chez la diatomée marine *Thalassiosira weissflogii*, d'une enzyme (anhydrase) contenant un site de fixation pour le cadmium (Lane *et al.*,

2005). Ceci représente l'unique cas d'un organisme pour lequel la présence de cadmium intracellulaire correspond à une réalité physiologique, qui pourrait expliquer l'existence dans le vivant de transporteurs spécifiques de ce métal.

II.2 - Chélation des métaux, et plus particulièrement du cadmium, dans la plante / Répartition tissulaire des ions métalliques

La faculté des plantes à répartir les métaux lourds, notamment entre les racines et les feuilles, est liée à la nature du métal et à l'espèce végétale considérée. Le cadmium a, plus que l'arsenic par exemple, une certaine propension à atteindre les feuilles, les fruits et les graines étant généralement les organes les moins exposés (Clemens, 2006). C'est d'ailleurs cette distribution du cadmium à travers les différents tissus de la plante qui conduit à son entrée dans la chaîne alimentaire (pour revue, voir Grant *et al.*, 2008) et expose les hommes à ses effets.

Chez certaines plantes (dites hyperaccumulatrices), une capacité importante à concentrer le métal dans les feuilles est associée à un phénotype de tolérance, ce qui révèle le caractère essentiel de cette répartition dans la résistance contre les métaux lourds.

II.2.1 - Transport par le système vasculaire

La capacité d'une plante à distribuer le cadmium dans divers tissus, et ainsi à limiter son accumulation au niveau des racines, dépend principalement de sa capacité à utiliser le système vasculaire comme vecteur de cette répartition. Une étude, conduite sur le blé et visant à comparer la répartition du cadmium entre deux cultivars a montré qu'une concentration particulièrement importante du cadmium dans les graines de l'un des écotypes était associée à une concentration importante du cadmium dans le phloème de ce même écotype (Harris & Taylor, 2004).

Cette mobilité des métaux à l'intérieur de la plante est fortement dépendante de l'environnement chimique des toxiques. La plante dispose de chélatants, dont la synthèse peut être modulée en fonction de la concentration intra-cellulaire de métaux et capables de lier ces ions afin de limiter leur réactivité dans la cellule et de mieux contrôler leur dispersion.

Le chargement par le xylème des métaux toxiques peut être décomposé en trois phases (Figure 2) :

- (i) la chélation de l'ion dans le cytosol des cellules racinaires
- (ii) le transport des complexes ainsi formés, ou éventuellement de l'ion seul, à travers la voie symplastique pour aboutir à

- (iii) la libération de l'ion dans le xylème.

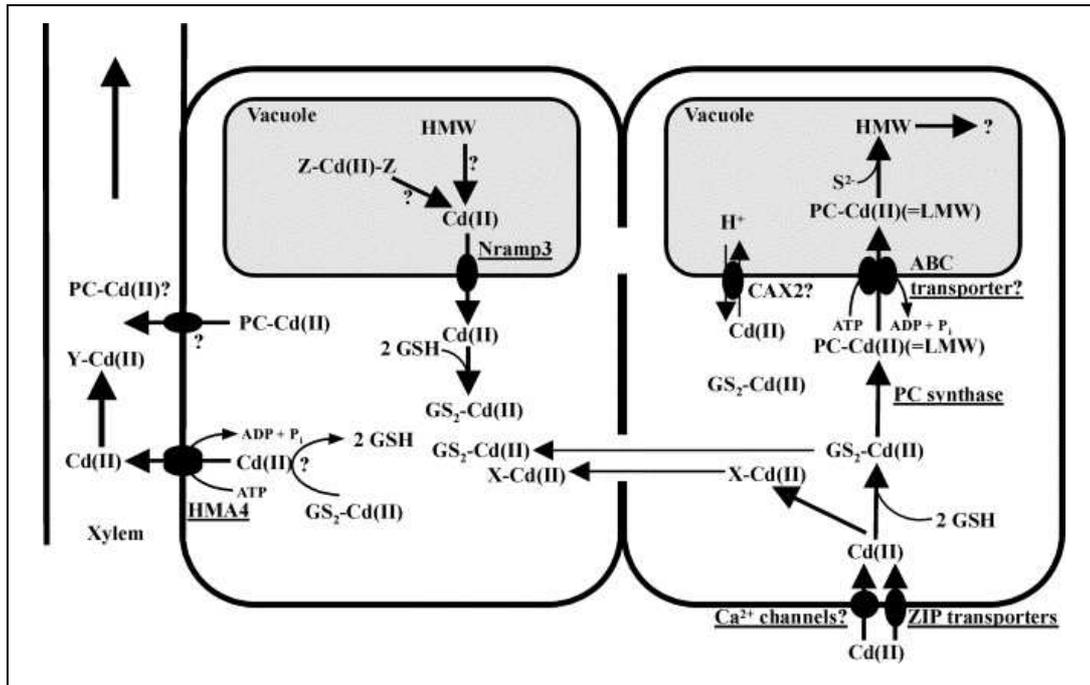


Figure 2 : Principaux flux intra-cellulaires du cadmium, depuis son entrée dans les cellules racinaires jusqu'à sa libération dans le système vasculaire. Le cadmium entre par les racines via des transporteurs de métaux (ZIP) ou des canaux calciques (LCT1). Une fois dans le cytosol, les ions métalliques en excès sont chélatés, la nature du ligand déterminant le devenir du métal. Ce dernier peut être (i) exporté via la voie symplastique vers le système vasculaire où il est distribué à l'ensemble de la plante, ou bien (ii) stocké dans la vacuole. Le transport des ions passe généralement par leur complexation à des molécules non-identifiées (X), bien que des ATPases de type P (HMA4) puissent assurer une translocation des ions, sous forme non liée, délivrés par des complexes de glutathion. Une fois dans le xylème, d'autres ligands peuvent éventuellement prendre le relais (Y = nicotianamine ou acide citrique par exemple). Dans le cas d'une compartimentation vacuolaire, le cadmium peut traverser le tonoplaste sous forme non liée, via un transporteur de type antiport $\text{Ca}^{2+} / \text{H}^+$ (CAX2). L'accumulation du cadmium dans la vacuole peut également passer par sa chélation, dans le cytosol, par les phytochélatines (PC), des peptides dérivant du glutathion. Les complexes PC-Cd ainsi formés, de faible poids moléculaire (LMW) traverseraient le tonoplaste via un transporteur non identifié (transporteur ABC ?), et pourraient évoluer ensuite vers des formes de plus haut poids moléculaire (HMW), peut-être suite à l'incorporation de soufre. Certains auteurs suggèrent également la formation d'autres complexes Cd-Z (Z = acides organiques). Le confinement du cadmium de cette manière assurerait une séquestration à long terme du toxique, et limiterait sa re-libération vers le cytosol, notamment via des transporteurs de métaux peu spécifiques tels que NRAMP3. D'après Clemens, 2006.

Plusieurs travaux mettent en évidence l'importance du ligand dans le transport des métaux par le xylème. Dans le cas du nickel, la présence d'histidine exogène permet d'élever le taux de transport du métal par le xylème d'un facteur 50 chez *Alyssum montanum*, et plusieurs hyper-accumulateurs de nickel répondent au stress métallique par une élévation de leur concentration intra-cellulaire en histidine (Krämer *et al.*, 1996). De la même manière, d'autres travaux ont pu

montrer que la nicotianamine (Pich *et al.*, 1994 ;Mari *et al.*, 2006), l'acide citrique (Senden *et al.*, 1995), ou les phytochélatines (Gong *et al.*, 2003 ;Chen *et al.*, 2006) sont susceptible de lier des métaux pour en faciliter le transport xylémien mais aussi phloémien.

Ces mécanismes de prise en charge d'ions métalliques par le xylème pour en assurer la distribution à travers l'ensemble de la plante sont primordiaux dans l'assimilation de métaux essentiels (Zn ou Fe par exemple). Il est alors fort probable que la répartition des métaux exclusivement toxiques comme le cadmium exploite ces mêmes mécanismes. Dans ce sens, des travaux réalisés sur le blé ont pu montrer qu'un excès de Zn dans le milieu nutritif de la plante induit une diminution de la répartition feuilles / racines du cadmium. A ce jour, une ATPase de type P (HMA4, *Heavy Metal transporting ATPase 4*), localisée à la membrane plasmique, a été identifiée pour sa capacité à transporter les métaux lourds et pour son rôle probable dans la redirection des ions vers le système vasculaire (Verret *et al.*, 2004).

II.2.2 - Distribution du cadmium dans la plante : cas particulier des trichomes

La distribution du cadmium à travers l'ensemble de la plante permet entre autre de multiplier les sites de stockage, notamment en ce qui concerne la séquestration vacuolaire du métal, décrite plus loin. Mais elle peut également permettre de transporter le métal vers des sites depuis lesquels il est possible de l'excréter. Ce type de processus a, en particulier, été mis en évidence chez le tabac (Choi *et al.*, 2001). Les auteurs montrent en effet que des plants de tabac soumis à de fortes concentrations de cadmium présentent une augmentation du nombre de leurs trichomes, des cellules particulières présentes sur les feuilles de certaines plantes. La fonction de ces trichomes varie d'une plante à l'autre, et peut être impliquée dans la défense contre les pathogènes aussi bien que dans la diffusion du menthol chez le genre *Mentha*. Chez le tabac, elles sont notamment le siège de la formation de sels de cadmium, solides, qui sont alors excrétés. De façon très intéressante, ce mécanisme a pu également être mis en évidence pour des métaux essentiels, tels que le zinc, en complexe avec des carbonates de calcium ou des acides organiques (Sarret *et al.*, 2006).

II.3 - Mécanismes cellulaires de la détoxification du cadmium

Deux voies principales conduisent à la détoxification des ions métalliques excédentaires dans le cytosol. La première, détaillée précédemment, est plus spécifique des cellules des racines, depuis lesquelles les ions sont exportés, *via* le xylème, vers les parties aériennes. La seconde consiste en un confinement des ions toxiques dans la vacuole. Ce dernier mécanisme a fait l'objet de nombreux travaux, mais un certain nombre d'acteurs protéiques, en particulier les transporteurs, restent à

identifier. Il peut être décomposé en trois phases principales : (i) la chélation des ions cytosoliques, principalement par les phytochélatines, (ii) leur translocation dans la vacuole, et enfin (iii) leur neutralisation.

II.3.1 - Synthèse des phytochélatines

II.3.1.1 - Structure et occurrence des phytochélatines

Les phytochélatines (PC) sont des peptides de formule $[\gamma\text{Glu-Cys}]_n\text{-Gly}$, où n est compris entre 2 et 11, généralement inférieur à 5 (Rauser, 1995). Également appelées métallothionéines de classe III, elles sont synthétisées de manière enzymatique à partir du glutathion (Figure 3) et constituent une composante essentielle de la tolérance au cadmium puisque des mutants affectés dans la synthèse des PC présentent un phénotype d'hypersensibilité à plusieurs métaux lourds (Cd^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} ; Howden *et al.*, 1995). La présence de nombreux thiols, portés par les cystéines, permet la chélation de certains cations divalents, ce qui conduit, entre autre, à diminuer la concentration de métaux libre dans le cytosol et de limiter leur grande réactivité. En conditions standards, la quantité de cuivre libre dans une cellule de levure est, par exemple inférieure, à 1 atome (Rae *et al.*, 1999). Ces processus de chélation sont à eux seuls un facteur de tolérance important, et certains travaux mentionnent, pour des lignées surexprimant les phytochélatines, une augmentation de la concentration en cadmium cellulaire, associée à un phénotype de résistance (Clemens *et al.*, 1999).

Ces peptides sont représentés de façon ubiquitaire dans le règne végétal, des algues aux dicotylédones, en passant par les monocotylédones. On les retrouve également chez certaines levures, notamment *Schizosaccharomyces pombe*, mais aussi chez le ver *Caenorabditis elegans* (Vatamaniuk *et al.*, 2001). Toutefois, si la structure de base des phytochélatines reste globalement constante d'une espèce à l'autre, elle peut présenter quelques variations, notamment en ce qui concerne l'acide aminé terminal, habituellement une glycine (Gly), constituant alors les isophytochélatines (Figure 3). Cet acide aminé peut être remplacé par une alanine (*Candida glabrata* - Rauser, 1995), une sérine (riz - Klapheck *et al.*, 1994), ou un glutamate (maïs - Meuwly *et al.*, 1995). De façon très surprenante, de récents travaux réalisés au laboratoire dans l'équipe ont permis de mettre en évidence, chez *Arabidopsis*, l'ensemble des isoformes de phytochélatines connues (Sarry *et al.*, 2006 ; Ducruix *et al.*, 2006).

II.3.1.2 - Synthèse des phytochélatines – induction de la synthèse par le cadmium

Purifiée et caractérisée pour la première fois à partir de *Silene cucubalus* (Grill *et al.*, 1989), la phytochélatine synthase (PCS) catalyse l'adjonction d'un dipeptide [Glu-Cys], provenant d'un glutathion, sur un groupement $[\gamma\text{Glu-Cys}]_n\text{-Gly}$. La première isoforme caractérisée sur un plan

moléculaire, PCS1, a été simultanément clonée par 3 équipes indépendantes en 1999 (Vatamaniuk *et al.*, 1999 ; Clemens *et al.*, 1999 ; Ha *et al.*, 1999). Plus tard, une seconde PCS, PCS2, a également pu être identifiée et clonée (Cazale & Clemens, 2001). Cette dernière semble toutefois moins déterminante dans la réponse au stress cadmium, sa surexpression ne permettant pas de restaurer un phénotype sauvage chez un mutant *pcs1* (Lee & Kang, 2005).

L'activité de la phytochélatine synthase, généralement active sous forme oligomérique, est strictement dépendante de la présence de métaux en excès dans le cytosol. Le cadmium est l'ion le plus activateur, puis viennent, par potentiel d'activation décroissant, l'argent, le plomb, le zinc, le cuivre, le mercure et l'or (Cobbett, 2000). En 2000, des travaux sur la PCS1 d'*Arabidopsis* purifiée ont montré que ce n'est toutefois pas une liaison directe du cadmium à un site spécifique de l'enzyme qui permet son activation, mais plutôt l'état réduit du substrat, le glutathion, en thiolate de glutathion : Cd(GS)₂ ou Zn(GS)₂ par exemple (Vatamaniuk *et al.*, 2000).

Si ce type de régulation est sans doute le principal mode de contrôle de la production des phytochélatines au cours d'un stress, des résultats contradictoires évoquent toutefois une possible régulation transcriptionnelle de la PCS par le cadmium. Alors que certains auteurs concluent à une constance de l'expression de PCS1, même au cours d'un stress (Cobbett, 2000), des expériences d'analyse transcriptomique sur puce à ADN montrent une augmentation transitoire de la quantité d'ARNm codant pour PCS1 pour les temps courts d'exposition au cadmium (Herbette *et al.*, 2006).

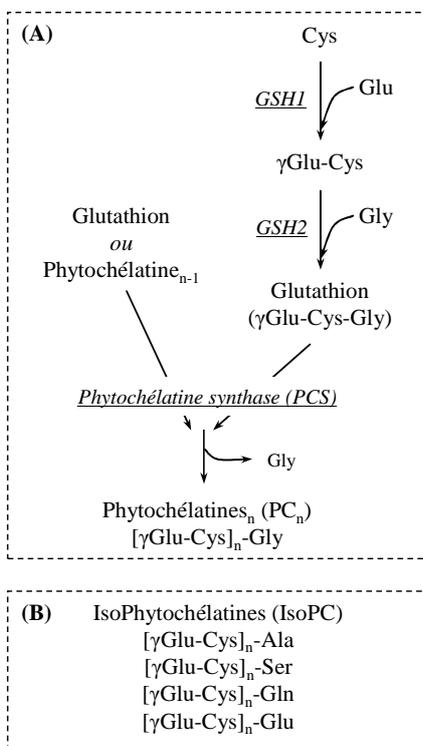


Figure 3 : Synthèse des phytochélatines et des isophytochélatines. (A) : Le glutathion est synthétisé à partir de la cystéine (Cys), du glutamate (Glu) et de la glycine (Gly) sous les actions successives des deux enzymes GSH1 et GSH2. La phytochélatine synthase catalyse ensuite l'adjonction d'une sous-unité [γ Glu-Cys] provenant d'un glutathion sur une autre molécule de glutathion ou sur une phytochélatine (PC) précédemment synthétisée pour former des « polymères » de glutathion, de formule [γ Glu-Cys]_n-Gly. (B) : Suivant l'espèce végétale et le stress métallique considéré, il arrive que des isophytochélatines (IsoPC) apparaissent. Celles-ci sont des PC dont l'acide aminé terminal n'est pas une glycine mais une alanine (Ala), une sérine (Ser), une glutamine (Gln) ou un glutamate (Glu). L'origine des IsoPC n'est pas connue chez *Arabidopsis*, et pourrait résulter, comme c'est le cas chez *Ordeum*, de la synthèse d'Isogluthathion, GSH2 catalysant l'ajout d'une Alanine (Ala), d'une sérine (Ser), d'une glutamine (Gln) ou d'une glycine (Gly) sur la sous-unité [γ Glu-Cys].

II.3.1.3 - Conditions limitantes de la synthèse des phytochélatines

La synthèse des phytochélatines dérive de celle du glutathion, une seule étape supplémentaire, éventuellement réitérée un certain nombre de fois, permettant la synthèse de PC_n à partir de PC_{n-1} et d'une nouvelle molécule de glutathion. La capacité de la plante à augmenter la quantité de PC cytosolique est donc strictement dépendante de la quantité de glutathion disponible, et par conséquent des quantités de chacun des trois acides aminés le composant : la cystéine, le glutamate et la glycine.

a) *Régulation de la voie d'assimilation du soufre lors d'un stress cadmium*

La cystéine est un acide aminé soufré qui supporte la fonction thiol (-SH) indispensable au potentiel de chélation du glutathion et des phytochélatines. La disponibilité du soufre et sa réduction, qui a lieu principalement dans le chloroplaste (Buchner *et al.*, 2004), est donc, *via* la production de cystéine, un facteur limitant important de la production des phytochélatines.

Ce phénomène a été clairement mis en évidence suite à des expériences d'analyse d'expression génique sur puce à ADN (Herbette *et al.*, 2006). Une exposition de plantules d'*Arabidopsis* au cadmium conduit à une induction de l'accumulation de soufre dans la plante, corrélée à une augmentation de l'expression de plusieurs transporteurs de sulfate (*SULTR1;1*), localisés au niveau des racines. D'autres transporteurs, tels que *SULTR2;1*, localisé au niveau du système vasculaire racinaire (Takahashi *et al.*, 2000) ou *SULTR4;1*, localisé au tonoplaste pour le transport du sulfate vacuolaire vers le cytosol sont également induits par le cadmium.

Une étape importante dans l'assimilation du soufre et conduisant à la synthèse de cystéine est la réduction du sulfate. Celle-ci est réalisée en 3 étapes, aboutissant à la synthèse de sulfure d'hydrogène (H₂S) directement utilisé par la cystéine synthase. Cette réduction est catalysée successivement par une ATP sulfurylase, une APS réductase, et une sulfite réductase. Les travaux réalisés par Herbette *et al.* (2006) mettent en évidence, dans les racines, l'induction de l'expression de l'une des 4 ATP sulfurylase (At3g22890), et de 2 des 4 APS réductases (At1g62180, At4g04610) identifiées chez *Arabidopsis*. Conjointement à cette augmentation des activités d'assimilation et de réduction du sulfate, on observe une redirection très claire de la voie d'assimilation du soufre vers la synthèse de cystéine (Sarry *et al.*, 2006), au détriment de celle des glucosinolates. Ces métabolites secondaires, impliqués dans la défense contre les pathogènes et les herbivores, constituent en effet un pool important de soufre réduit. Leur synthèse, à partir de certains acides aminés (et notamment la cystéine) et d'adenosine 5'-phosphosulfate, est fortement réprimée lors d'un stress cadmium (Figure 4) ce qui permet d'augmenter le flux métabolique vers la synthèse de cystéine puis de γ Glu-Cys, premières étapes de la synthèse du glutathion. Il est intéressant de noter que cette régulation de la voie d'assimilation du soufre est très semblable à celle

observée lors d'une carence en soufre, en ce qui concerne le métabolisme des glucosinolates par exemple (Hirai *et al.*, 2004), ou l'induction des transporteurs *SULTR1;1* et *SULTR2;1* (Takahashi *et al.*, 2000).

b) *Importance de la disponibilité en glycine lors du stress*

Au cours de la première étape de la synthèse du glutathion, le γ Glu-Cys formé est pris en charge par la glutathione synthase (GSH2), qui catalyse l'ajout d'une glycine (Gly) pour former le glutathion (Figure 3). Des travaux menés par l'équipe (Sarry *et al.*, 2006 ; Ducruix *et al.*, 2006) ont montré que, lors d'une exposition au cadmium, la quantité de glutathion présente dans des cellules en culture décroît de façon dramatique, dès les concentrations les plus faibles (5 μ M). En parallèle, la quantité de PC augmente, de même que celle des isoPC_{Ala} (homoPC) et des isoPC_{Ser}. Cette induction est proportionnelle à la dose de cadmium à laquelle sont exposées les cellules, et révèle une apparition échelonnée des différentes isoformes. Les PC sont détectées, quoique très

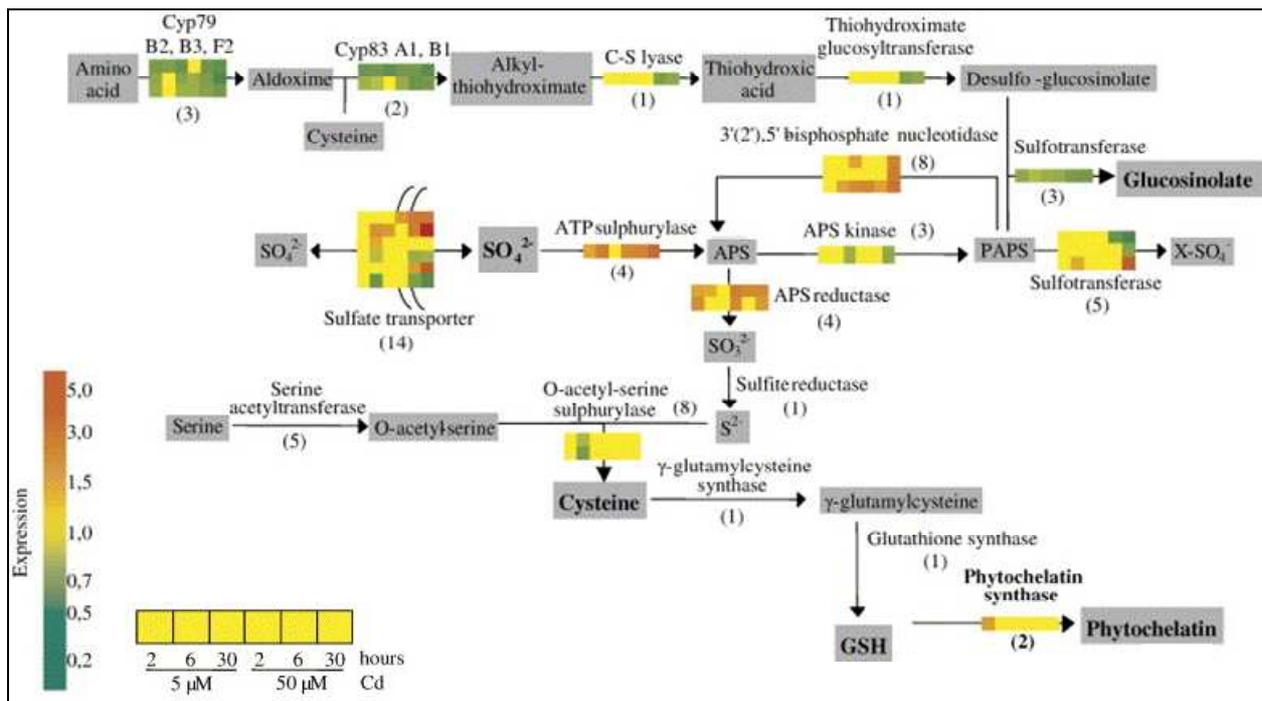


Figure 4 : Régulation de l'expression génique des enzymes impliquées dans l'assimilation du soufre dans les racines de plantes d'*Arabidopsis thaliana* exposées à un stress cadmium. Les ARNm des plantules exposées à 0, 5 et 50 μ M de cadmium pendant 2, 6 et 30h ont été hybridés à des puces CATMA (Complete Arabidopsis Transcriptome MicroArray), et les rapports d'expression (Traité vs. Contrôle) de 24.576 gènes mesurés. La figure indique les valeurs obtenues pour certains gènes, impliqués dans la voie d'assimilation du soufre et répondant à l'exposition au cadmium (les gènes dont l'expression est stable ne sont pas figurés). Le chiffre entre parenthèse indique le nombre total d'enzymes catalysant la réaction considérée. D'après Herbet *et al.* (2006)

faiblement, même en absence de cadmium, alors que les homoPC ne sont observées qu'à partir d'une exposition à 5 μM Cd, et que les isoPC_{Ser}, isoPC_{Gln}, et isoPC_{Glu} ne sont mesurées qu'à partir d'une exposition à 200 μM Cd (Sarry *et al.*, 2006 ; Ducruix *et al.*, 2006).

Ces analyses ont également mis en évidence, pour les concentrations fortes d'exposition (200 μM Cd), une augmentation significative de la quantité de $\gamma\text{Glu-Cys}$. Cette observation suggère une limitation importante de la synthèse de glutathion dans sa dernière étape, due à une faible disponibilité en glycine. Ce phénomène pourrait expliquer l'apparition des isoformes des PC, qui seraient alors produites à partir d'isoGlutathion (Glu-Cys-Ala, Glu-Cys-Ser, Glu-Cys-Gln ...). La production d'homoPC a d'ailleurs été précédemment corrélée à la production d'homoglutathion chez plusieurs espèces (Rauser, 1995).

Cette hypothèse a été testée par l'ajout de glycine exogène dans le milieu de culture des cellules lors d'une exposition au cadmium. Si cette expérience a bien conduit à un retard de l'apparition du pic de $\gamma\text{Glu-Cys}$ et entraîne une augmentation de la quantité de PC, elle a également, conduit à une augmentation de l'ensemble des isoPC (Ducruix *et al.*, 2006). Ces résultats indiquent que, si la quantité de glycine disponible est effectivement un facteur limitant de la synthèse des PC, ce n'est pas une carence en cet acide aminé qui est à l'origine de l'apparition des isoformes PC_{Ala}, PC_{Ser}, PC_{Gln} et PC_{Glu}. Cette observation renvoie à l'hypothèse selon laquelle la phytochélatine synthase posséderait des affinités différentes pour ses substrats au niveau du site accepteur (accueillant la PC_{n-1}) et du site donneur de $\gamma\text{Glu-Cys}$ (Oven *et al.*, 2002). Pour la synthèse de PC_n, le site accepteur serait capable d'utiliser un large spectre de substrats (GSH, PC_{n-1}, mais aussi isoGSH et isoPC_{n-1}), alors que le site donneur de $\gamma\text{Glu-Cys}$ serait plus spécifique du GSH que de ses isoformes.

II.3.2 - Compartimentation des métaux lourds dans la vacuole

II.3.2.1 - Transporteurs tonoplastiques responsables de l'influx de Cd

Les mécanismes succédant à la chélation cytosolique du cadmium, en particulier par les phytochélatines, sont relativement mieux connus chez certaines levures que chez les végétaux. Chez ces levures, les complexes PC-Cd formés dans le cytosol (ou bien (GS)₂Cd dans le cas de *Saccharomyces cerevisiae*, qui ne produit pas de PC) sont transloqués dans la vacuole, *via* une protéine de type ATP Binding Cassette (ABC). Ce transporteur, YCF1 (*Yeast Cadmium Factor 1*) chez *Saccharomyces cerevisiae* (Li *et al.*, 1997) ou HMT1 *Heavy (Metal Transporter 1)* chez *Schizosaccharomyces pombe* (Ortiz *et al.*, 1992), a été caractérisé pour son rôle primordial dans la résistance au cadmium, des levures mutées pour ces protéines présentant un phénotype d'hypersensibilité au cadmium (Szczyпка *et al.*, 1994).

En dépit de travaux visant à l'identifier (Bovet *et al.*, 2005), un tel transporteur n'a jamais été caractérisé chez les plantes. Toutefois, l'accumulation conjointe de phytochélatines et de cadmium dans la vacuole lors d'un stress a été établie (Vogeli-Lange & Wagner, 1990), bien que leur transport à travers le tonoplaste sous forme de complexes PC-Cd n'ait jamais pu être confirmé. Le rôle de la vacuole dans la protection cellulaire contre le cadmium n'est donc pas remis en cause, les auteurs mesurant dans des vacuoles purifiées la totalité du cadmium et des phytochélatines présents dans les cellules. Si le transport du cadmium sous forme de complexes PC-Cd n'a jamais été clairement établi chez les plantes, d'autres transporteurs tonoplastiques, à l'inverse, ont été caractérisés pour leur implication dans la séquestration vacuolaire du cadmium. En particulier, une activité de type antiport $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^+$ a pu être détectée dans des fractions microsomales de racine d'avoine (Salt & Wagner, 1993), et il a alors été suggéré qu'un transporteur $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ vacuolaire puisse catalyser la translocation du Cd^{2+} . Deux antiports $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ ont été localisés à la membrane vacuolaire, CAX1, de relativement haute affinité ($K_m = 13,1 \mu\text{M}$), et CAX2, de plus basse affinité ($K_m > 100 \mu\text{M}$) (Hirschi *et al.*, 1996). Les auteurs proposèrent alors que CAX2 soit responsable de transport $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^+$, ce qui fut confirmé plus tard (Koren'kov *et al.*, 2007; Korenkov *et al.*, 2007b).

II.3.2.2 - Devenir du cadmium vacuolaire

L'une des formes de stabilisation du cadmium vacuolaire pourrait consister en une chélation des ions par des acides organiques tels que le citrate, l'oxalate ou le malate. Cette hypothèse, proposée à l'origine pour expliquer la compartimentation vacuolaire du Zn (Mathys, 1977), fut reprise plus tard pour le cadmium (Krotz *et al.*, 1989) sans toutefois être démontrée. Un travail original de simulation informatique de la spéciation du cadmium cellulaire (Wang *et al.*, 1991) suggère une répartition du Cd entre des ligands protéiques (PC) et des ligands de type acides organiques (AO) dépendante de la concentration en Cd et en soufre, et du pH du milieu considéré. Les auteurs concluent à une prédominance des complexes PC-Cd pour les plus hautes concentrations en cadmium (de l'ordre du micromolaire au millimolaire), alors que pour des concentrations nanomolaires les complexes AO-Cd (presque exclusivement citrate-Cd) seraient majoritaires.

Des extraits obtenus à partir de *S. pombe* exposés à du cadmium contiennent deux types de complexes PC-Cd, résolus par gel-filtration : des complexes de faible poids moléculaire (LMW, *Low Molecular Weight*), comprenant essentiellement des PC_2 et des PC_3 , et d'autres de haut poids moléculaire (HMW, *Heavy Molecular Weight*). Ces derniers sont toutefois absents des souches de levures *hmt1* (transporteur vacuolaire des complexes phytochélatines-cadmium, Wu *et al.*, 1995), ce qui suggère que la translocation dans la vacuole des complexes PC-Cd est essentielle à la formation des complexes de haut poids moléculaires. L'existence de ces deux types de complexes est moins

claire chez les plantes, bien qu'ils aient pu être résolus chez plusieurs espèces végétales (Rausser, 1995).

La modification de ces complexes d'un faible vers un haut poids moléculaire permettrait, d'une part, de diminuer le pouvoir osmotique des molécules séquestrées, mais également d'augmenter la stabilité des complexes, notamment par l'incorporation de soufre. Ce type de structure, associant le cadmium, les phytochélatines et le soufre, est observé chez les levures (Dameron *et al.*, 1989) comme chez les plantes (Rausser, 1995). Le rapport S^{2-}/Cd semble différent d'une espèce à l'autre, et s'il est généralement compris entre 0,15 et 0,40, il peut aller jusqu'à 1. L'évolution vers une équimolarité entre le soufre et le cadmium dans ces structures entraîne alors la cristallisation, et donc la précipitation, de particules de sulfure de cadmium (CdS). Celles-ci, retrouvées chez les levures comme chez les plantes (Reese *et al.*, 1992), sont encore associées à des phytochélatines et constitueraient la forme de stockage privilégiée du cadmium dans la vacuole.

III - Objectifs de la thèse

Il ressort de la synthèse présentée sur la vacuole végétale que, si les fonctions métaboliques associées à cet organite sont relativement bien décrites dans la littérature, peu de protéines impliquées dans ces mécanismes sont identifiées. Le protéome vacuolaire représentant moins de 1 % du total protéique cellulaire et la purification de ces organites étant relativement délicate, ce n'est que récemment que des analyses protéomiques ciblées sur cet organite ont été mises en place (Szponarski *et al.*, 2004 ; Shimaoka *et al.*, 2004 ; Carter *et al.*, 2004 ; Endler *et al.*, 2006 ; Schmidt *et al.*, 2007). Cette faible connaissance du protéome vacuolaire est probablement à l'origine du manque d'information concernant les mécanismes de séquestration vacuolaire du cadmium. Si les étapes cytosoliques ont été identifiées, celles impliquant directement la vacuole (transport au travers du tonoplaste et prise en charge des ions suite à leur translocation) restent à déterminer.

Dans le but d'identifier les protéines à l'origine vacuolaires impliquées dans la lutte contre le cadmium, mon travail de thèse a consisté dans un premier temps à proposer une méthode d'isolement de vacuoles, dont j'ai pu vérifier l'état de pureté. Dans un second temps, nous avons initié une analyse protéomique de ces organites par spectrométrie de masse, en collaboration avec le Laboratoire d'Etude de la Dynamique des Protéomes. Ces analyses avaient non seulement pour but d'établir une liste des protéines vacuolaires la plus exhaustive possible, exposée dans le premier chapitre, mais également de mettre en place des outils et des méthodes d'analyse destinés à suivre l'évolution qualitative et quantitative du protéome. Le deuxième chapitre détaille les cartographies protéiques réalisées par IEF / SDS-PAGE et Blue-Native PAGE, qui devraient constituer une référence pour le suivi de l'évolution des protéines vacuolaires lors d'un stress. L'ensemble de ces données a pu être ensuite exploité afin d'identifier, dans des analyses préliminaires, des candidats aux fonctions étudiées. Le chapitre III présente l'élaboration d'une base de données informatique

destinée à réaliser cette étude, et l'identification d'un acteur potentiel de la signalisation cellulaire engagée lors d'un stress provoqué par la cadmium.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

I - Biologie cellulaire

I.1 - Matériel Végétal

I.1.1 - Cellules en culture liquide d'*Arabidopsis thaliana*

L'étude protéomique a été réalisée sur des vacuoles de cellules de méristème foliaire d'*Arabidopsis thaliana* var. Columbia. Ces cellules sont maintenues dans un milieu de culture liquide Murashige & Skoog (poudre basal medium – Sigma, ref. M5519 - 0,44 % [p / v]; saccharose 3 % [p / v]; 2-4 D (acide 2,4- dichlorophénoxyacétique) 0,02 g.L⁻¹; K₂HPO₄ 0,3 M; Na₂HPO₄ 30 mM; pH 5,5), dans des erlenmeyers de 250 mL. Elles sont repiquées tous les 7 jours à raison de 5 mL de cellules (sédimentées par centrifugation à 85 g, 5 min) dans 100 mL de milieu, et placées sous agitation (135 rpm) à 22°C, en lumière constante (35 μmoles de photons.m⁻².s⁻¹).

I.1.2 - Cultures *in vitro*

Les expériences visant à étudier l'influence de la concentration endogène en brassinostéroïdes sur la tolérance au cadmium d'*Arabidopsis thaliana* ont été réalisées sur de jeunes plantules cultivées *in vitro* sur milieu nutritif gélosé. Les graines (*Arabidopsis thaliana* var. Col-0) sont stérilisées dans la solution de composition suivante : Javel 15 % [v / v], Triton X-100 0,01 % [v / v]. Elles sont ensuite semées dans des boîtes de Pétri, sur un milieu ½ MS (poudre basal medium (Sigma, ref. M0404) 0,22 % [p / v]; saccharose 0,5 % [p / v]; MES 0,05 % [p / v]; pH 5,7 ; Agar 0,8 % [p / v]), et les boîtes sont scellées avec du sparadrap. Après 4 jours en chambre froide pour synchroniser la germination des graines, les boîtes sont placées en phytotron, sous 16 h de jour (120 μE.m⁻².s⁻¹, 56 % d'humidité, 21°C) et 8 h de nuit (56 % d'humidité, 20°C). Pour évaluer l'impact d'un élément sur la croissance des plantules, celles-ci sont mises à germer 4 ou 7 jours sur un milieu standard, puis transférées sur un milieu de composition identique contenant le ou les élément(s) à tester (CdNO₃ : sigma, ref. 247510 ; EpiBrassinolide : sigma, ref. E1641 ;

Brassinazole : TCI, ref. B2829). Les concentrations utilisées sont mentionnées dans la partie résultats. Les plantules de 10 jours, ayant été exposées 6 jours, sont prélevées pour être analysées.

I.2 - Purification de vacuoles de cellules en culture d'*Arabidopsis thaliana*

I.2.1 - Préparation de protoplastes

La première étape consiste à préparer des protoplastes à partir de cellules. Pour ce faire, les cellules sont prélevées en phase exponentielle de croissance (5 jours après repiquage), rincées à l'eau et séchées sur papier filtre à l'aide d'une trompe à vide. Les cellules (environ 18 g) sont ensuite incubées 2 h dans un cristallisateur à 30°C, sous agitation (70 rpm), en présence de 20 mL de milieu de digestion (Mannitol 0,6 M; MES 25 mM; Cellulase 2 % [p / v]; Pectolyase 0,5 % [p / v]; pH 5,5). La suspension est ensuite filtrée sur une toile à bluter de 52 µm de vide de maille afin de retenir les cellules, en agrégats, tandis que les protoplastes passent à travers. Le filtrat est centrifugé 1 min à 1270 g et le surnageant éliminé. Le culot, contenant les protoplastes, est remis délicatement en suspension dans un tampon de rinçage (Mannitol 0,7 M ; Tris-HCl 10 mM ; MES 15 mM ; pH 7). Après une nouvelle concentration par centrifugation, les protoplastes peuvent être observés au microscope et comptés sur lame de Malassez. Le nombre de protoplastes ainsi obtenu est de $95 \cdot 10^6 (\pm 13 \cdot 10^6)$ par gramme de cellules.

I.2.2 - Isolement de vacuoles (méthode adaptée de Frangne *et al.*, 2002)

I.2.2.1 - Méthode 1

La rupture ménagée des protoplastes est ensuite effectuée de façon à préserver les vacuoles. Les protoplastes sont dilués trois fois dans un milieu de lyse (milieu A : mannitol 0,2 M; ficoll 10 % [p / v]; EDTA 20 mM; HEPES-KOH 5 mM (pH 8); préchauffé à 42°C) et l'ensemble est maintenu à 25°C pendant 15 min. Les vacuoles sont alors purifiées sur un gradient discontinu de Ficoll composé de trois couches. Dans un tube de centrifugation de 40 mL (tube SS34, Sorvall), on place successivement un volume de protoplastes lysés, deux volumes d'un mélange 1:2 [v:v] des milieux A et B (milieu B : bétaïne 0,4 M ; KCl 30 mM ; HEPES-KOH 20 mM ; pH 7,5), et un volume de milieu B. Ce gradient est alors centrifugé 20 min à 1500 g et les vacuoles sont prélevées à l'interphase des milieux A+B et B. Après addition de milieu B (10 % du volume prélevé), la suspension est centrifugée (1800 g pendant 20 min) une dernière fois afin de concentrer les

vacuoles. Le surnageant est éliminé et le culot (50 μ L en moyenne), composé des organites, est délicatement prélevé.

1.2.2.2 - Méthode 2

Après la lyse des protoplastes, la suspension est placée en première couche d'un gradient de trois couches 7,5 % - 5 % - 0 % de Ficoll (la couche intermédiaire est composée d'un mélange 1:1 [v:v] des milieux A et B). Après centrifugation (1500 g, 20 min, 4°C) les vacuoles sont récoltées à l'interphase des milieux A+B et B, puis diluées deux fois dans un milieu de composition identique (mélange 1:1 [v:v] des milieux A et B) supplémenté avec 5 % [p / v] de Ficoll (concentration finale de 10 % de Ficoll). Cette suspension (1 volume) est ensuite placée dans un tube (SS34, Sorvall), puis recouverte de 2 volumes d'un mélange 1:2 [v:v] des milieu A et B (3,3 % de Ficoll), et de 1 volume de milieu B. Le gradient est centrifugé (1500 g, 20 min, 4°C), et les vacuoles purifiées sont récoltées à l'interphase des milieux A+B et B, puis sont concentrées et récoltées comme décrit précédemment.

I.3 - Préparation de fractions enrichies en cytosol

La lyse ménagée des protoplastes, qui libèrent alors les vacuoles qu'ils contiennent, permet également de préserver l'ensemble des organites de la cellule. Le lysat cellulaire placé en première couche du gradient de purification contient donc, entre autres, le cytosol cellulaire, peu contaminé par les protéines des matrices des différents organites (mitochondries ou chloroplastes par exemple). Après centrifugation, les organites du lysat cellulaire sont majoritairement sédimentés tandis que les protoplastes sont remontés par flottaison, ce qui permet de recueillir une fraction fortement enrichie en cytosol. Celle-ci est alors centrifugée (15 min, 20 000 g) pour éliminer les éventuels organites restants, puis une dernière centrifugation à haute vitesse (30 min, 100 000 g) sépare de la fraction cytosolique soluble d'éventuels débris membranaires résultant de la lyse du plasmalemme.

II - Techniques biochimiques

II.1 - Séparation d'échantillons protéiques par électrophorèse

II.1.1 - Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes

II.1.1.1 - Electrophorèse en une dimension (SDS – PAGE)

Les échantillons protéiques sont solubilisés par chauffage (à 90°C, pendant 90 s) dans un milieu dénaturant et réducteur (glycérol 10% [p/v]; DTT 100 mM; bleu de bromophénol 0,002% [p/v]; Tris-HCl 0,05 M; pH 6,8). Quinze à cinquante microgrammes de protéines sont déposés par puits. Les gels sont constitués d'une première partie dite de concentration (acrylamide 5 % [p / v], pH 6,8), et d'une seconde dite de résolution (acrylamide 12 % [p / v], pH 8,8). Le tampon d'électrophorèse est constitué de glycine 129 mM; SDS 0,1 % [p / v]; Tris-HCl 25 mM (pH 7,3). L'électrophorèse se déroule à température ambiante à un voltage de 60 V pendant 20 min, puis de 150 V pendant environ 40 min. Les protéines ainsi séparées en fonction de leur masse moléculaire peuvent ensuite être révélées par coloration ou transférées sur membrane

II.1.1.2 - Electrophorèse en deux dimensions (IEF / SDS-PAGE)

Les cartographies protéiques par électrophorèse bidimensionnelle ont été réalisées en collaboration avec Thierry Rabilloud (Laboratoire BBSI, CEA - Grenoble). Les protéines sont séparées en fonction de leur point isoélectrique au cours de la première dimension (focalisation isoélectrique, ou IEF) puis en fonction de leur masse moléculaire au cours de la deuxième dimension. Cent soixante quinze microgrammes de protéines (vacuolaires ou cytosoliques) sont solubilisés dans 400 µL d'une solution de composition : urée 7 M; thiourée 2 M; CHAPS 4 % [p / v]; DTT 20 mM et ampholytes. L'isofocalisation électrique est réalisée sur une bande de gel (ou strip) de gradient de pH 3 - 6,75. La focalisation se fait en plusieurs étapes au cours desquelles le voltage est peu à peu augmenté : 12 h à 50 V, 4 h à 250 V, 7 h à 1000 V, et enfin 12 h à 7500 V. Le bas voltage permet d'éliminer les sels, et l'augmentation progressive permet d'éviter une surchauffe du strip. Après la focalisation, le strip est placé au sommet d'un gel de polyacrylamide 12 % et recouvert par la solution suivante : agarose à bas point de fusion 1 % [p / v] SDS 0,2 %; Bis-Tris 0,15 M et bleu de bromophénol 0,002 % (indicateur de migration). L'agarose permet de maintenir un milieu solide entre les deux gels et d'éviter que les protéines ne diffusent latéralement. Un

voltage fixe à 25 V pendant 1 h est suivi d'un voltage fixe à 300 V pendant 5 h. Le gel est incubé dans une solution d'acide acétique 10 % [v / v] et de méthanol 50 % [v / v] avant d'être coloré avec du bleu de Coomassie colloïdal.

II.1.2 - Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes

II.1.2.1 - Première dimension : Blue Native PAGE

Cette technique, développée initialement par Schägger et von Jagow (Schagger & von Jagow, 1991) pour isoler les complexes respiratoires de la mitochondrie, est utilisée pour séparer les complexes protéiques d'un échantillon sans dissocier les protéines qui les composent. Elle utilise le bleu de Coomassie G250, connu pour sa capacité à lier les protéines, comme composé chargé permettant la migration des protéines dans un champ électrique. A l'inverse du SDS, généralement utilisé pour les électrophorèses en conditions dénaturantes, ce dernier permet de charger les protéines sans les dénaturer, la migration des échantillons protéiques dans un gel de gradient d'acrylamide permettant de séparer les complexes en fonction de leur masse moléculaire.

a) *Méthode 1 : échantillons solubles*

Les échantillons de vacuoles lysées sont centrifugés (100 000 g, 30 min, 4°C) afin de séparer les fractions solubles et membranaires. Les protéines solubles sont alors concentrées sur membrane de filtration (seuil d'exclusion de 3 kDa), reprises dans un tampon de composition NaCl 50 mM ; acide amino-caproïque 5 mM ; imidazole-HCl 50 mM (pH 7). L'échantillon (100 µg au minimum) est alors de nouveau centrifugé sur membrane pour atteindre une concentration finale d'environ 1 µg.µL⁻¹. Le gel est constitué d'un gradient d'acrylamide (5 % - 13 %) dans le milieu suivant : acide amino-caproïque 500 mM; imidazole-HCl 25 mM (pH 7). Le gel de concentration ne contient que 4 % [p / v] d'acrylamide dans un milieu de composition identique. Le tampon cathode est dans un premier temps composé de tricine 50 mM; imidazole 7,5 mM; bleu de Coomassie G250 0,02 ‰ [p / v], puis remplacé (après migration d'1/3 du gel environ) par un tampon ne contenant que 0,002 ‰ [p / v] de bleu. Le tampon anode est constitué d'imidazole-HCl 25 mM (pH 7).

b) *Méthode 2 : échantillons membranaires*

Le culot membranaire est repris dans un tampon de composition : acide amino-caproïque 750 mM; dodécylmaltoside 1 % [p / v]; Bis-Tris 50 mM (pH 7), à une concentration protéique finale de 5 µg.µL⁻¹. L'échantillon (100 µg de protéines minimum) est incubé 1 h dans la glace, puis

de nouveau centrifugé (100 000 g, 30 min, 4°C). Le surnageant contenant les protéines solubilisées par le détergent est prélevé et le bleu de Coomassie est ajouté à raison de 0,5 % [p / v]. La totalité de l'échantillon est ensuite déposée au sommet d'un gel de gradient d'acrylamide (5 % - 13 % [p / v]) dans le tampon suivant : acide amino-caproïque 500 mM; Bis-Tris 50 mM ; pH 7. Le tampon cathode est composé de Tricine 50 mM ; Bis-Tris 15 mM; Bleu de Coomassie G250 0,02 ‰ ou 0,002 ‰ [p / v], et le tampon anode de Bis-Tris 50 mM pH 7.

II.1.2.2 - Seconde dimension : SDS-PAGE

La piste de migration est découpée puis incubée 30 min dans du tampon d'électrophorèse en SDS-PAGE supplémenté avec du SDS (1 % [p / v]) et du β -mercaptoéthanol (1 % [v / v]), afin de dénaturer les protéines constituant les complexes. La bande de gel est ensuite rincée 3 fois 10 min dans de l'eau et placée au dessus d'un gel de type SDS-PAGE, incluse dans le gel de concentration. La migration, de type SDS-PAGE, s'effectue alors comme décrit précédemment.

II.1.3 - Coloration des gels

II.1.3.1 - Coloration au bleu de Coomassie

a) Bleu de Coomassie non colloïdale

Le gel est placé dans une solution de composition méthanol 50 % [v / v]; acide acétique 10 % [v / v]; bleu de Coomassie R250 0,005 % [p / v]. Après 15 à 30 min, le milieu de coloration est alors éliminé et remplacé par un milieu décolorant (méthanol 50 % [v / v]; acide acétique 10 % [v / v]), jusqu'à visualisation des protéines.

b) Bleu de Coomassie colloïdale

Le gel est incubé 2 h dans une solution de bleu de Coomassie colloïdal (méthanol 34 % [v / v] ; acide o-phosphorique 2 % [v / v] ; sulfate d'ammonium 17 % [p / v] ; bleu de Coomassie G250 0,065 % [p / v]), et la coloration spécifique des protéines à l'intérieur du gel est totale après 1 à 2 jours d'incubation. Le gel est ensuite conservé dans une solution d'acide acétique 5 % [v / v].

II.1.3.2 - Coloration au nitrate d'argent

Les protéines sont dans un premier temps fixées dans un bain de d'éthanol 30 % [v / v] ; acide acétique 10 % [v / v] pendant 7 min, puis le gel est transféré dans une solution identique supplémentée avec du thiosulfate de sodium (2,5 mM), pendant 7 min également. Après 3 rinçages

à l'eau, le gel est placé dans une solution d'AgNO₃ 0,1 % [p / v] ; formaldéhyde 0,075 % et incubé pendant 7 min à l'obscurité, puis rincé brièvement. Les protéines sont révélées dans une solution de composition Na₂CO₃ 2,5 % [p / v] ; formaldéhyde 0,075 %. La réaction de coloration est ensuite stoppée par ajout d'acide acétique (10 % du volume).

II.2 - Western-blot

II.2.1 - Transfert des protéines sur membrane

Après séparation sur gel de polyacryamide en conditions dénaturantes, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose pendant 2 h à 80 V dans le tampon suivant : TGS 80 % [v / v]; éthanol 20 % [v / v]. Après transfert (Mini Protean III electro module, BioRad, USA), la membrane est lavée dans un tampon de rinçage : NaCl 150 mM; Triton X100 0,05 % [p / v] ; Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), et incubée 5 min dans une solution de rouge ponceau (rouge ponceau 0,1 % [p / v] ; acide trichloroacétique 0,5 % [p / v]) afin de vérifier le transfert des protéines.

II.2.2 - Immunorévélation des protéines

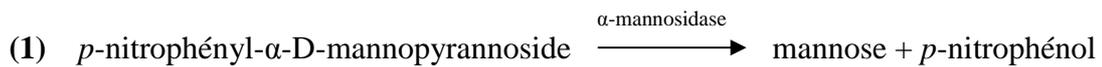
La membrane est saturée dans le tampon de rinçage contenant 5 % [p / v] de lait écrémé, puis incubée 3 h à température ambiante en présence de l'anticorps primaire. Après rinçage (3 fois 10 min) dans le tampon sans lait, elle est incubée 1 h à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire. Celui-ci, couplé à la peroxydase, est dirigé contre le fragment constant du premier anticorps et s'y fixe. Dans un tampon de composition luminol 1,25 mM ; acide coumaric 0,2 mM ; H₂O₂ 0,025 % [v / v] ; Tris-HCl 100 mM (pH 8,5), la peroxydase catalyse une réaction libérant un photon, la lumière émise au niveau de la protéine recherchée pouvant alors être détectée sur un film autoradiographique. Les anticorps primaires utilisés sont décrits dans la partie Résultats.

II.3 - Mesure d'activités enzymatiques

II.3.1 - Activité de l'α-mannosidase - adapté de Boller & Kende, 1979

Le rendement de purification des vacuoles a été mesuré à l'aide d'un marqueur enzymatique spécifique de celles-ci, l'α-mannosidase, qui catalyse la réaction (1, cf. ci-dessous).

Dix à cinq cent microgrammes de protéines (vacuolaires ou protoplastiques) sont ajoutés à 1,5 mL du milieu réactionnel suivant : acide citrique 50 mM (pH 5) ; *p*-nitrophényl- α -D-mannopyrannoside 1 mM. La réaction est conduite à 37°C. Une aliquote de 450 μ L est prélevée à 15, 30 et 45 min de réaction et l'ajout de 720 μ L de Na₂CO₃ (1 M) permet d'arrêter la réaction. Après, Les protéines précipitées sont éliminées centrifugation (15 min à 16 000 *g*) et la concentration de *p*-nitrophénol ($\epsilon_{pNP} = 18,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) libérée par la réaction, est dosée par spectrophotométrie à 405 nm.



III - Techniques de biologie moléculaire

III.1 - Amplification d'un fragment d'ADN par PCR

Environ 0,5 μ L d'ADN matrice est ajouté à 25 μ L du milieu suivant : tampon Taq polymerase (New England Biolab, USA) 1 X ; amorce « rev » : 2 μ M ; amorce « fwd » : 2 μ M ; dNTP (désoxyribonucléide triphosphate) : 2 μ M de chaque ; Taq polymerase (New England Biolab, USA) : 1,25 unités. L'amplification est réalisée sur environ 30 cycles, chacun comprenant les étapes suivantes : 45 s de dénaturation à 94°C, 30 s d'hybridation à 58°C et 1,5 à 3,5 min d'élongation à 72°C (1 min par kilobase). L'amplification est achevée par 10 min d'élongation des extrémités à 72°C. L'efficacité de la PCR peut ensuite être vérifiée par analyse par électrophorèse sur gel d'agarose de 5 μ L de volume réactionnel.

Les RT-PCR, effectuées à partir d'ADNc, sont réalisées à l'aide de l'ADN polymérase Taq Titanium (Clontech, Takara Bio, USA). Pour l'amplification de fragments destinés au séquençage, l'ADN polymérase utilisée est la Pfu (Promega, USA), en présence de 3 mM de MgCl₂ lorsqu'elle est utilisées sur des cDNA.

III.2 - Expression de plasmides en système bactérien

III.2.1 - Construction du plasmide

III.2.1.1 - Clonage traditionnel

a) Vecteur *pCR-Blunt II-TOPO®* (Invitrogen, USA)

Cette technique utilise la topoisomérase I du virus *Vaccinia*, qui se lie spécifiquement à l'ADN et clive le double brin après la séquence 5'-CCCTT-3'. L'énergie résultant de cette hydrolyse est alors conservée sous la forme d'une liaison covalente entre un résidu tyrosyl de la topoisomérase et le phosphate en 3' du brin clivé. Cette liaison peut toutefois être attaquée par l'extrémité 5'-OH d'un nouveau fragment nucléotidique qui se liera alors au brin clivé, libérant la topoisomérase. Un microlitre du « vecteur activé », linéarisé et lié à la topoisomérase I à ses deux extrémités, est mis en présence de 0,5 à 4 µL d'un fragment d'ADN amplifié par PCR, et dont les extrémités ont été déphosphorylées (1 h d'incubation, à 37°C, en présence de 0,1 U de phosphatase alcaline par pmol d'extrémité).

Après 60 min d'incubation à température ambiante, des bactéries (*E. coli* DH5α) sont transformées avec les plasmides résultants du clonage. Le « vecteur activé » contenant le gène de résistance à la kanamycine, et un insert (le gène de fusion) empêchant l'expression du gène létal *ccdB* contenu dans le vecteur, seules les bactéries transformées par les vecteurs contenant l'insert se multiplieront en présence de kanamycine.

b) Vecteur *pGEM-T Easy®* (Promega, USA)

Après amplification par PCR d'un fragment d'intérêt, 3 µL de produit de PCR sont ajoutés à 5 µL de tampon de ligation 2X, 1 µL (50 ng) de vecteur, et 1 µL (3 unités) de ligase. La réaction est maintenue à 28°C pendant 1h, puis 5 µL de milieu réactionnel sont utilisés pour la transformation de bactéries *E. coli* DH5α, placées sur un milieu de culture LB, supplémenté avec 50 µg.mL⁻¹ de kanamycine, 500 µg.mL⁻¹ d'IPTG et 80 µg.mL⁻¹ de X-Gal. L'insertion du fragment au milieu du gène de la β-Galactosidase permet de discriminer les colonies contenant l'insert (colonies blanches, n'exprimant pas la β-Galactosidase) de celles contenant le vecteur vide (colonies bleues, exprimant la β-Galactosidase). Cette méthode de clonage utilise les extrémités cohésives T-sortant du vecteur linéarisé, qui se lient aux extrémités A-sortant des fragments d'amplification générés par certaines polymérase. Si la Pfu est utilisée pour l'étape d'amplification, une dernière élongation de 10 min avec une polymérase de type Taq doit être réalisée pour ajouter les nucléotides dA aux amplicons.

III.2.1.2 - *Clonage Gateway® (Invitrogen, USA)*

Cette méthode est basée sur les propriétés de recombinaison site-spécifique du bactériophage lambda. Un cocktail d'enzymes (clonase) permet une recombinaison entre les séquences nucléotidiques attR1 et attR2 contenues dans un « clone entrée » et les séquences attL1 et attL2, contenue dans un « vecteur destination ». Ceci permet un clonage directionnel de n'importe quel fragment nucléotidique, placé entre attR1 et attR2, dans n'importe quel « vecteur destination ». De cette manière, les ADN complémentaires (ADNc) codant plusieurs protéines identifiées par les travaux de protéomique vacuolaire et présentes dans un « clone entrée » ont été clonés dans un « vecteur destination », en aval du promoteur constitutif p35S du virus de la mosaïque du chou fleur (CaMV) et du gène rapporteur de la Green Fluorescent Protein (GFP). La présence d'un gène de résistance à la spectinomycine sur le « vecteur destination » et celle du gène létal ccdB entre les séquences attL1 et attL2 du « vecteur destination », supprimé après la recombinaison, permet la sélection des seules bactéries ayant été transformées par le « vecteur destination » contenant l'ADNc, alors appelé « vecteur d'expression ».

Les « clones entrées » contenant l'ADNc codant divers protéines (Tableau I) ont été achetés au Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) / DNA Stock Center, et amplifiés dans des bactéries *Escherichia coli* DB3-1.

Le vecteur destination utilisé (pK7WGF2) a été obtenu du VIB (Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology).

Tableau I : Clones « entré » obtenus via l'ABRC et contenant les ADNc des protéines dont la localisation est à confirmer.

Clone ABRC	Locus	Protéine codée
U15125	At3g19820	DWF1
U16352	At1g19450	Transporteur de sucre hypothétique
U16861	At3g63520	CCD1
U17005	At5g58070	Lipocaline
U17016	At5g62740	Band 7
U17252	At3g16240	δ-TIP

III.2.2 - Transformation de bactéries

III.2.2.1 - *Escherichia coli thermocompétentes*

Quarante microlitres de bactéries *E. coli* DH5 α , DB3.1 ou TOP10 (Invitrogen) sont placés dans la glace en présence d'environ 10 ng de plasmides. Après 30 min d'incubation, les bactéries sont soumises pendant 25 s à un choc thermique à 37°C, puis replacées à 4°C pendant 2 min. La suspension bactérienne est alors placée dans 960 μ L de LB (Luria-Bertani) sans antibiotique à 37°C, sous faible agitation (80 rpm), pendant 1 h. Elles peuvent ensuite être étalées dans des boîtes de Petri sur du milieu LB contenant de l'agar (0,8 % [p/v]) et l'antibiotique de sélection (spectinomycine 100 μ g.mL⁻¹ ou kanamycine 50 μ g.mL⁻¹)

III.2.2.2 - *Agrobacterium tumefaciens électrocompétentes*

Les bactéries *A. tumefaciens* C58 (40 μ L) sont placées dans une cuve à électroporation, dans la glace, en présence de 0,5 à 1 μ L de plasmides. Les bactéries sont alors soumises à un choc électrique (2,5 kV), puis diluées avec 960 μ L de LB sans antibiotique et placées à 28°C, sous faible agitation (80 rpm), pendant 3 h. Elles sont ensuite étalées dans des boîtes de Petri sur milieu LB contenant de l'agar (0,8 % [p/v]) et l'antibiotique de sélection (gentamicine 20 μ g.mL⁻¹; rifampicine 50 μ g.mL⁻¹ et spectinomycine 100 μ g.mL⁻¹ ou kanamycine 50 μ g.mL⁻¹).

III.2.3 - Extraction de plasmides

Les plasmides sont purifiés à partir de cultures de bactéries selon le protocole décrit par la société Qiagen. Des cultures de 5 à 500 mL de bactéries sont réalisées sur la nuit à 28°C (*A. tumefaciens*) ou 37°C (*E. coli*) sous agitation constante (160 à 200 rpm). La lyse alcaline des bactéries permet de libérer l'ensemble de leurs constituants, notamment les acides nucléiques (plasmides, ADN génomique et ARN). La lyse, en présence de RNAses afin d'éliminer en partie les ARN, est suivie d'un abaissement brutal du pH qui entraîne la précipitation de l'ADN génomique, les plasmides restant en solution. Après centrifugation pour éliminer les débris cellulaires et le précipité, le surnageant est passé au travers d'une colonne de silice à laquelle se lient les plasmides en condition de haute salinité. Après plusieurs lavages, les plasmides purifiés sont élués par un tampon alcalin (pH \approx 8,1), à faible teneur en sels.

III.3 - Expression transitoire *in vivo* de protéines chimères

III.3.1 - Expression dans des feuilles de tabac

Des bactéries *Agrobacterium tumefaciens* souche C58 contenant les clones d'expression sont cultivées à 28°C, en boîte de pétri, sur milieu LB (1,1 % [p / v] d'agarose, spectinomycine 100 µg.mL⁻¹). Après 72 h, les bactéries sont transférées en milieu liquide et remises en culture pendant 24 h, puis diluées 5 fois dans un milieu d'induction (MES 78 mM ; NaH₂PO₄ 1,734 mM ; NH₄Cl 18,7 mM ; MgSO₄ 1,2 mM ; KCl 2 mM ; CaCl₂ 0,06 mM ; FeSO₄ 9 µM ; glucose 0,5 % [p / v]; acétosyringone 0,2 mM) (Lavy *et al.*, 2002). Après 6 à 10 h, la suspension de bactéries est diluée avec de l'eau pour ajuster la densité optique mesurée à 600 nm à une valeur de 0,5, puis elle est infiltrée sous pression, à l'aide d'une seringue sans aiguille, dans la face inférieure de feuilles de tabac (*Nicotiana benthamiana*) de 8 à 10 semaines. L'expression des fusions GFP-protéine est alors observable entre les 2^{ème} et 4^{ème} jours, avec un maximum d'intensité au 3^{ème} jour.

III.3.2 - Expression dans des protoplastes

Les protoplastes sont préparés comme indiqué précédemment (cf. p. 45), et leur densité ajustée à 5.10⁵ protoplastes / mL. Le milieu de rinçage est remplacé par du milieu W5 (NaCl 154 mM ; CaCl₂ 125 mM ; KCl 5 mM ; glucose 5 mM ; MES-KOH 1,5 mM ; pH 5,6). Dans un tube de 2 mL, 100 µL de protoplastes (soit 5.10⁴) sont ajoutés à 10 µL d'ADN (correspondant à 100 µg) et incubés 10 min à 22°C. Une solution de PEG (PEG 4000 40 % [p / v]; mannitol 0,4 M ; CaCl₂ 0,1 M) est ajoutée et l'ensemble est maintenu 30 min à 22°C. Les protoplastes sont d'abord dilués avec 440 µL de milieu W5 et centrifugés 5 min à 100 g afin de les concentrer, puis repris dans 1 mL de milieu W5. Ils peuvent alors être conservés en boîte de Petri pendant 4 jours sous faible éclairage, jusqu'à observation.

IV - Equipements particuliers

IV.1 - Identification de protéines par spectrométrie de masse

IV.1.1 - Principe de la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique permettant de déterminer la masse d'éléments chargés. Appliquée à l'identification de protéines telle que nous l'avons réalisée, elle consiste en l'ionisation de peptides et de fragments peptidiques, dont la masse est ensuite mesurée par la mesure de leur vitesse après accélération dans un champ électrique. Le spectrogramme obtenu regroupe généralement l'ensemble des fragments du peptide à identifier, l'incrément de masse entre deux fragments consécutifs correspondant le plus souvent à un fragment alourdi d'un acide aminé, que l'on peut alors identifier. En calculant cet écart de masse entre chaque pic du spectrogramme, du fragment le plus léger (1 acide aminé) au plus lourd (peptide entier), il est possible d'accéder à la séquence protéique.

L'ensemble des analyses par spectrométrie de masse a pu être réalisée grâce à une collaboration importante avec le Laboratoire d'Etude de la Dynamique des Protéomes (LEDyP, CEA-Grenoble), et plus particulièrement avec Michel Jaquinod, Lauriane Kuhn, Sylvie Kieffer-Jaquinod et Jérôme Garin.

IV.1.2 - nanoLC ESI-MS/MS

Lorsque plusieurs protéines différentes sont présentes dans un extrait à analyser, il est nécessaire d'en réaliser un séquençage partiel pour les identifier. Pour ce faire, l'extrait est soumis à une digestion trypsique et les peptides résultants séparés par chromatographie liquide. Lorsque plusieurs peptides différents apparaissent en même temps en sortie de la colonne chromatographique, un premier spectromètre agit comme un filtre et ne permet le passage que des peptides identiques (en général le peptide le plus représenté). Ces peptides sont ensuite fragmentés par collision et un second spectrophotomètre mesure les masses des fragments ainsi générés. Ceci permet alors un séquençage des peptides et ces portions de séquence protéique sont comparées aux éléments d'une base de données (http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH) afin d'identifier les protéines présentes dans l'extrait.

IV.1.2.1 - Préparation des échantillons

a) *Préparation des échantillons après électrophorèse sur gel d'acrylamide*

La piste de migration des protéines est découpée et divisée en plusieurs fragments d'environ 1,5 mm. Chaque bande est alors décolorée (100 μ L de NH_4HCO_3 : CH_3CN [50 : 50]) 30 min à température ambiante, puis déshydratées dans 100 μ L d'actéonitrile (ACN) 100 %. L'ACN est alors éliminé et les morceaux de gel, séchés sous vide, sont réhydratés par 100 μ L d' H_2O_2 7 %, 15 min à l'obscurité. Les bandes sont ensuite incubées dans 20 μ L d'une solution de digestion (CaCl_2 10 mM, Urée 100 mM ; Tris-HCl 150 mM ; pH 8,1 : CH_3CN [95 : 5], contenant 150 ng de trypsine modifiée (Promega, Madison, WI)). Après 5 h de digestion à 37°C, les peptides protéolytiques sont extraits des bandes de gel par diffusion dans 50 μ L d'une solution de composition Urée 300 mM ; CH_3CN 90 % pendant 30 min, sous sonication. Les solutions d'extraction et de digestion sont enfin rassemblées puis séchées, pour être reprise par 25 μ L de CH_3CN 5 % [v / v], acide formique 0,2 %, avant analyse en spectrométrie de masse.

b) *Préparation des échantillons directement en solution*

La fraction membranaire est resuspendue dans 80 μ L de NH_4HCO_3 25 mM pH 8,1 et chauffée à 90°C pendant 10 min. La dénaturation est alors stoppée par 120 μ L de méthanol froid à -20°C. La digestion est alors réalisée sur la nuit, à 35°C, avec un rapport trypsine / substrat de 1 %. Enfin, du tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCP) hydrochloride est ajouté pour une concentration finale de 10 mM et la réduction des peptides réalisée pendant 30 min à 35°C. Les peptides peptidiques sont enfin déshydratés dans 25 μ L de CH_3CN 5 % [v / v], acide formique 0,2 %.

IV.1.2.2 - Analyse

Les échantillons (6 μ L) sont injectés sur une colonne PepMap μC_{18} (LC Packings, Sunnyvale, CA). L'élution séquentielle des peptides est réalisée grâce à 2 gradients linéaires successifs : i) 10 % à 40 % de solution B (ACN 90 % [v / v] ; acide formique 0,1 % [v / v]) pendant 40 min, puis ii) 40 % à 90 % de solution B pendant 5 min, avec un débit de 200 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Pour les analyses consécutives à la digestion en solution (150 ng de peptides), les gradients utilisés sont de 15 % à 60 % de solution B pendant 90 min, puis de 60% à 90% de solution B pendant 5 min. Le spectromètre de masse est calibré sur les ions générés par la fragmentation du Glu-fibrinopeptide B. Les paramètres utilisés sont les suivants : temps d'analyse de 1 s de scan et 0,1 s d'interscan en mode MS, fenêtres de rapports m/z de 400-1400 en mode MS et de 50-2000 en mode MS/MS. Une seconde analyse du même échantillon avec une liste d'exclusion des rapports m/z majoritaires de la première analyse a été réalisée afin d'améliorer l'exhaustivité des

identifications. Les fichiers générés sont traités grâce au logiciel MASCOT, paramétré comme suit : enzyme = trypsine/proline, 1 « missed cleavage » autorisé, tolérance en masse des peptides = 0,25 Da, tolérance en mode MS/MS = 0,25 Da, charges des peptides : +2 et +3.

Pour la digestion en gel : acétylation des extrémités N-ter, oxydation des méthionines en sulfones et sulfoxides, FMA +1, FMA -1, acide cystéique.

Pour la digestion en solution: acétylation des extrémités N-ter, oxydation des méthionines en sulfones et sulfoxides, FMA +1, FMA -1.

Les protéines identifiées par au moins deux peptides, et dont le score Mascot est supérieur à 50, ont été automatiquement retenues. Pour les autres, les spectres ont été interprétés manuellement et les protéines identifiées confirmées ou non.

IV.2 - Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometer (ICP-MS)

IV.2.1 - Principe

L'ICP-MS est une technique permettant de doser en quelques minutes plus de 50 éléments de la table périodique à des concentrations relativement faibles : très souvent inférieures à $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ (1 ppb). Elle repose sur l'association d'une torche à plasma, capable d'ioniser les composants d'une solution, et d'un spectromètre de masse quadripolaire permettant de séparer ces ions et de les envoyer sur un détecteur.

L'échantillon à analyser est amené jusqu'à une chambre de nébulisation (chambre de Scott), maintenue à basse température par un refroidisseur à effet Peltier. La nébulisation est assurée par de l'argon (gazeux) et un nébuliseur de type Babington, et le parcours en U de la chambre de Scott favorise la sélection de fines gouttelettes qui sont ensuite dirigées vers la torche à plasma. Celle-ci est constituée d'un plasma d'argon où les températures atteignent 6000 à 10 000 °C et où les constituants de l'échantillon sont ionisés en cations monovalents. Une interface constituée de deux cônes de nickel permet d'affiner le faisceau d'ions, puis un système de lentilles électrostatiques permet d'extraire les cations et de débarrasser le faisceau des photons et autres éléments neutres. Enfin, un quadripôle permet de sélectionner un rapport masse / charge, correspondant à un isotope d'intérêt, qui est envoyé vers un détecteur de type multiplicateur d'électrons (HP4500 ChemStation ICP-MS, Yokogawa Analytical Systems Inc, Tokyo, Japan).

IV.2.2 - Préparation des échantillons et dosage du cadmium

Les feuilles (environ 200 mg) et les racines (environ 100 mg) de plantules de 10 jours sont placées à 50°C pendant 3 jours afin de les déshydrater, puis pesées. Elles sont alors minéralisées 8 h à 85°C dans un bain à sec en présence de 4 mL d'un mélange HNO₃ 75 % [v / v] (HNO₃ 65 %, Merck, ref. 1.00441); HCl 25 % [v / v] (HCl 30 %, Merck, ref. 1.00318). L'échantillon est ensuite repris dans 5 mL de HNO₃ 1 % [v / v], et après dilution, la concentration en cadmium (isotopes ¹¹²Cd, ¹¹⁴Cd et ¹¹⁶Cd) est mesurée contre des étalons.

Chapitre I

*Analyse protéique globale de la
vacuole d'Arabidopsis thaliana*

Chapitre I : Analyse protéique globale de la vacuole d'*Arabidopsis thaliana*

I - Mise en place d'une stratégie d'étude protéomique de la vacuole d'*Arabidopsis thaliana*.

Chez la cellule végétale, la vacuole est, notamment, le site privilégié de stockage de composés divers. Elle intervient tout autant dans le maintien précis de l'homéostasie des ions ou molécules essentiels que dans la séquestration de toxiques, en particulier de certains métaux lourds. Plusieurs publications font état de l'accumulation des ions métalliques (cadmium en particulier) dans la vacuole au cours d'un stress, et il est généralement admis que cette compartimentation assure une protection de la plante, tout au moins à l'échelle cellulaire. Cependant, les mécanismes conduisant à cette séquestration sont mal connus, et c'est principalement en extrapolant les résultats obtenus à partir de travaux réalisés sur levure que se sont construits les modèles de la détoxification métallique cellulaire végétale. Le rôle essentiel de la vacuole dans ce mécanisme n'est toutefois pas remis en cause et une étude ciblée sur cet organite permettrait probablement de préciser son rôle et d'en établir les acteurs protéiques, en particulier les transporteurs chargés de la translocation des ions métalliques. C'est dans ce but que nous avons mis en place une approche protéomique destinée à établir la liste des protéines de la vacuole. Une telle identification en série, qui n'avait jamais été publiée à l'initiation de ces travaux, devait nous permettre de mieux connaître cet organite. Dans un premier temps, nous avons mis en place un protocole de purification des vacuoles sur gradient de Ficoll à partir de protoplastes de cellules d'*Arabidopsis thaliana* en culture, puis nous avons caractérisé la qualité de nos préparations par différentes approches (analyses par immuno-détection et mesures d'activités enzymatiques) et identifié par spectrométrie de masse les protéines vacuolaires majoritaires. L'ensemble de ces résultats, présenté dans ce chapitre, a mis en évidence le niveau de pureté satisfaisant des préparations réalisées, et nous a permis d'envisager la caractérisation protéomique, par spectrométrie de masse, des vacuoles purifiées.

I.1 - Purification de vacuoles à partir de cellules en culture d'*Arabidopsis thaliana*.

I.1.1 - Mise en place du protocole d'isolement de vacuoles à partir de cellules en culture d'*Arabidopsis thaliana*.

Les analyses protéomiques envisagées nécessitaient l'obtention de vacuoles intactes et dépourvues de contaminants. Plusieurs techniques de purification décrites dans la littérature ont été testées et modifiées, au terme de quoi nous avons pu mettre en place un protocole adapté à nos conditions et nous donnant satisfaction.

La première étape de purification de vacuoles consiste en la préparation de protoplastes, cellules végétales dépourvues de parois. Cette paroi, principalement composée de pectine et de cellulose, confère aux cellules une grande résistance aux forces de pressions, et notamment aux forces osmotiques mises en jeu pour leur lyse. Or la libération des vacuoles, fragiles, doit être réalisée dans des conditions de maintien de l'intégrité de ces organites, ce qui suppose une libération ménagée des constituants intracellulaires. Ceci est réalisé par l'incubation des cellules dans une solution d'enzymes pectolyase et cellulase (méthode adaptée de van der Rest *et al.*, 2002), ce qui permet, après deux heures, d'obtenir environ $46 (\pm 3) \cdot 10^6$ protoplastes par gramme de cellules (Figure 5). Plusieurs méthodes ont été testées pour la rupture des membranes cellulaires, et nous avons retenu la lyse par choc osmotique et thermique (Frangne *et al.*, 2002). Celle-ci permet d'obtenir un meilleur rendement qu'une lyse mécanique, utilisée notamment par van der Rest *et al.* (2002) ou par Martinoia *et al.* (1986). Le passage des protoplastes, sous pression, à travers une toile à bluter de 10 à 20 μm de vide de maille (van der Rest *et al.*, 2002) a en outre tendance à standardiser la taille des vacuoles obtenues et à provoquer la lyse des plus grandes. Les cellules végétales comptent souvent plusieurs vacuoles, dont la fonction de chacune peut être spécialisée. La composition protéique est alors adaptée à cette spécialisation et la sélection de vacuoles d'une taille particulière est susceptible d'introduire un biais dans l'analyse de la composition protéique. Une lyse osmotique permet de conserver intactes des vacuoles d'une taille variant entre 8 et 45 μm , et le choc thermique permet quant à lui d'augmenter légèrement le rendement de la préparation.

L'étape suivante de purification des vacuoles a été également adaptée du protocole de Frangne *et al.* (2002). Le lysat cellulaire (contenant 7,5 % [p/v] de Ficoll) est placé dans un tube et recouvert d'un gradient de densité discontinu (3,3 % puis 0 % [p/v] de Ficoll) et, après centrifugation, les vacuoles intactes remontent par flottation et se localisent entre les couches 3,3 % et 0 % de Ficoll (Figure 5). Les autres organites et les protoplastes non lysés, plus denses, sédimentent au fond du tube ou se positionnent entre les couches 7,5 % et 3,3 % de Ficoll. La présence d'une couche de milieu au dessus des vacuoles (0 % de Ficoll) permet de récolter plus

facilement les organites, mais nécessite ensuite une étape de concentration. Pour ce faire, la suspension de vacuoles est légèrement diluée dans du milieu B (voir Matériels et Méthodes), puis centrifugée. Le culot de vacuoles ainsi obtenu peut être prélevé et observé au microscope (Figure 5).

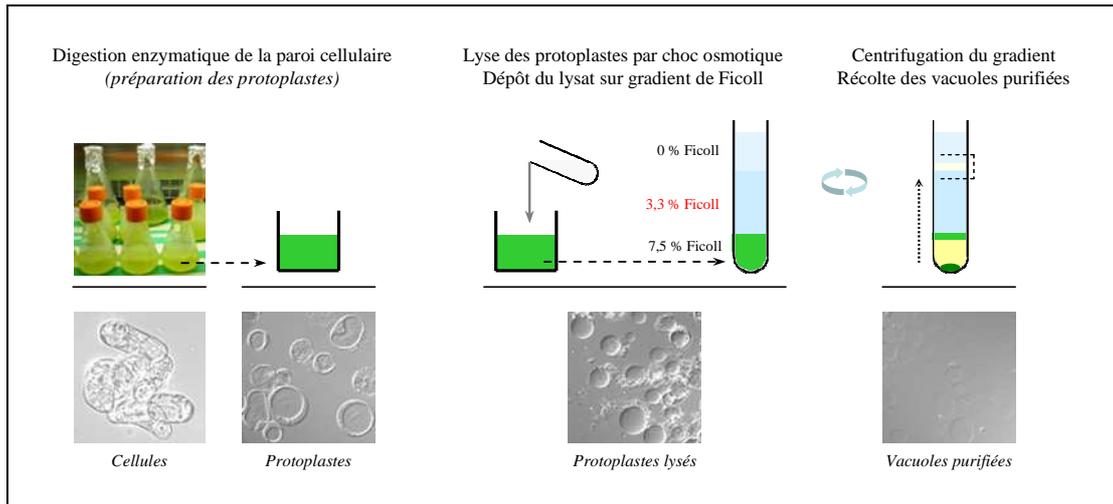


Figure 5 : *Principe de la purification de vacuoles à partir de cellules d'Arabidopsis thaliana en culture liquide. Les cellules sont prélevées en phase exponentielle de croissance et, après rinçage, incubées dans une solution de pectolyase et cellulase afin de digérer la paroi. Les protoplastes ainsi obtenus sont alors lysés par choc osmotique, et les vacuoles, libérées, sont purifiées par centrifugation du lysat sur un gradient de densité de Ficoll.*

Le suivi de chaque étape par observations microscopiques a été déterminant lors de la mise au point de la méthode que nous utilisons. L'observation des préparations de vacuole par épifluorescence nous a notamment permis de comparer les quantités de vacuoles isolées selon diverses méthodes. Leur observation en transmission est relativement difficile, mais nous avons remarqué que sous éclairage UV (excitation à 365 nm) les vacuoles se distinguent plus facilement. Elles apparaissent en bleu, très certainement par fluorescence de composés phénoliques contenus dans le suc vacuolaire (Figure 6-A). Mais c'est surtout dans l'estimation de la nature et de la quantité des contaminants présents que ces observations se sont révélées être utiles. La chlorophylle est en effet excitable à 365 nm, et fluoresce dans le rouge (Figure 6-A1). La contamination par des chloroplastes pouvant être facilement détectée, nous nous sommes attachés à modifier les protocoles testés pour réduire leur présence dans nos préparations (Figure 6-A2), essentiellement en changeant la densité de la couche intermédiaire du gradient de purification.

I.1.2 - Evaluation de la qualité des préparations de vacuoles.

Si les observations microscopiques nous ont guidées dans l'ajustement du protocole pour améliorer la qualité des préparations, la confirmation de l'absence de contaminants a été obtenue par des analyses de type western-blot. Pour cela, 15 µg de protéines protoplastiques et vacuolaires ont été soumis à une électrophorèse de type SDS-PAGE puis transférés sur membrane de nitrocellulose (Figure 6-B). Nous avons alors cherché à mettre en évidence dans nos préparations vacuolaires l'éventuelle présence de certaines protéines caractéristiques de différents compartiments cellulaires. Les anticorps spécifiques utilisés sont dirigés contre :

- La protéine 21 de la membrane externe du chloroplaste (OEP21, Bolter *et al.*, 1999)
- La protéine b du complexe de l'antenne collectrice de lumière (LHC) des thylacoïdes
- La translocase 40 de la membrane externe de la mitochondrie (TOM40, Jansch *et al.*, 1996)
- Une H⁺-ATPase de type P (PMA2) de la membrane plasmique (Morsomme *et al.*, 1998)
- Une séquence peptidique caractéristique de plusieurs protéines du réticulum endoplasmique (domaine HDEL, Napier *et al.*, 1992; Baluska *et al.*, 1999)

Chacun de ces marqueurs protéiques a été recherché dans les préparations protoplastiques (Figure 6-B), et s'est révélé être absent des échantillons vacuolaires, à l'exception toutefois du marqueur du réticulum endoplasmique (Figure 6-B). Ce résultat confirme l'absence de contamination par des chloroplastes, déjà observée grâce aux analyses par microscopie et met également en évidence l'absence d'autres contaminants potentiels que sont la mitochondrie et la membrane plasmique. On remarque toutefois la présence dans l'extrait vacuolaire d'une bande à

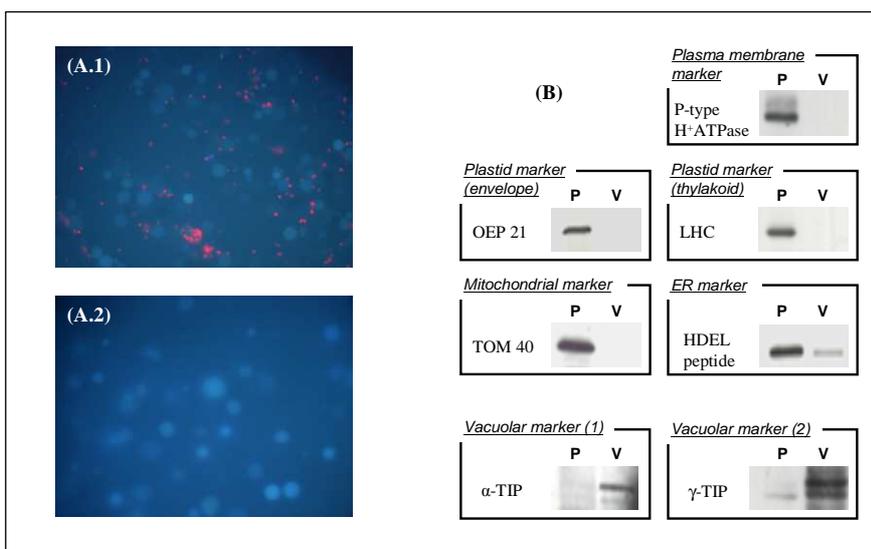


Figure 6 : Evaluation de la pureté des préparations de vacuoles purifiées à partir de cellules d'*Arabidopsis* en culture. (A) L'excitation des vacuoles intactes à 365 nm permet de les visualiser en fluorescence en bleu, et de visualiser les contaminants chlorophylliens qui apparaissent en rouge dans les préparations contaminées (A.1), et qui sont absents des préparations pures (A.2). (B) 15 µg de protéines d'extrait protoplastique (P) ou vacuolaire (V) ont été séparés par électrophorèse

(SDS-PAGE, 12 % d'acrylamide) puis transférés sur membrane de nitrocellulose. Les protéines marqueurs de différents organites ont été révélées dans chacune des deux fractions par l'emploi d'anticorps spécifiques (voir la description des anticorps dans le texte).

70 kDa correspondant à la protéine à domaine HDEL majoritaire du réticulum endoplasmique. La protéine mise en évidence n'est cependant pas enrichie dans la fraction vacuolaire, et nous avons considéré cette contamination comme relativement mineure. Celle-ci est d'ailleurs probablement inévitable compte tenu des mouvements de membrane qui ont été décrits entre la vacuole et le réticulum endoplasmique (Herman & Schmidt, 2004).

La présence de peroxysomes dans les préparations vacuolaires a également été vérifiée par mesure de l'activité glycolate oxydase, spécifique de cet organite. Si celle-ci a pu être quantifiée dans les fractions protoplastiques (activité spécifique de 250 nmol d'O₂ consommée / h / mg de protéines), elle est restée indétectable dans les échantillons vacuolaires, démontrant que cet organite ne contamine pas les préparations de vacuoles obtenues.

L'enrichissement en protéines vacuolaires a alors été confirmé par western blot, *via* l'emploi d'anticorps spécifiques, dirigés contre deux protéines intrinsèques du tonoplastes, l'une de type α (α -TIP de tabac ; Gerbeau *et al.*, 1999) et l'autre de type γ (γ -TIP du chou-fleur ; da Silva Conceicao *et al.*, 1997) (Figure 6-B) ainsi que par le suivi de l'activité d'une enzyme spécifique, l' α -mannosidase (Boller & Kende, 1979). Comme attendu, l'immunorévélation des TIP confirme l'enrichissement en protéines vacuolaires. L'activité α -mannosidase, enzyme spécifique de la vacuole, a également été mesurée dans les vacuoles et les protoplastes. Sur la base de cette activité, le rendement de la purification a été estimé à 2,1 %. L'activité spécifique de cette enzyme a également été calculée dans les extraits vacuolaires purifiés et dans les extraits protoplastiques. Nous avons pu ainsi calculer le facteur d'enrichissement des vacuoles par rapport aux protoplastes, qui est de l'ordre de 42.

Les différents tests biochimiques visant à établir le degré de pureté des préparations de vacuoles réalisées concourent à mettre en évidence l'absence de contamination majeure (chloroplastes, mitochondries, plasmalemmes, peroxysomes) et attestent du fort enrichissement en protéines vacuolaires caractéristiques (α -TIP, γ -TIP, α -mannosidase). Ces résultats ont permis d'envisager la caractérisation protéomique de la vacuole de cellules d'*Arabidopsis thaliana* en culture.

I.2 - Identification des protéines majeures de la vacuole

Alors qu'à l'initiation de nos travaux aucune analyse globale du protéome de la vacuole végétale n'avait été réalisée, plusieurs équipes ont presque simultanément publié des résultats de protéomique vacuolaire pendant que nous mettions au point le protocole de purification de vacuoles (Carter *et al.*, 2004; Sazuka *et al.*, 2004; Shimaoka *et al.*, 2004; Szponarski *et al.*, 2004). Afin de

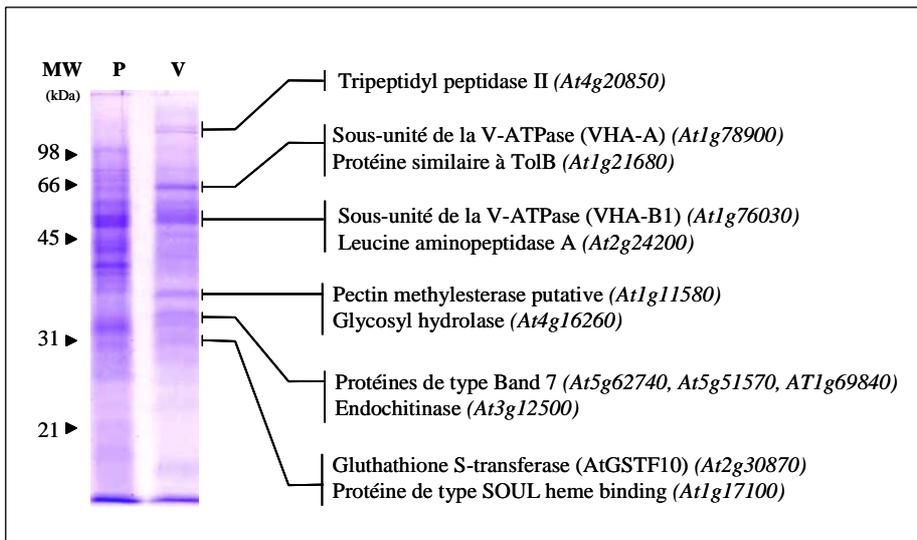


Figure 7 : Identification des protéines majeures de nos échantillons vacuolaires.

Après séparation de 20 µg de protéines protoplastiques (P) et vacuolaires (V) par SDS-PAGE (12 % d'acrylamide), les bandes majeures de l'extrait vacuolaire ont été découpées, puis leur contenu protéique soumis à une digestion trypsique. Les peptides résultant sont alors

séquencés par spectrométrie de masse (nanoLC-MS/MS), et les protéines présentes dans chaque bande identifiées. MW : marqueurs de poids moléculaires.

comparer nos premières analyses dans le contexte de ce qui venait d'être publié, nous avons dans un premier temps cherché à identifier les protéines majoritaires de nos préparations. Pour cela, 20 µg de protéines vacuolaires ont été soumises à une électrophorèse de type SDS-PAGE suivi d'une coloration au bleu de Coomassie (R250) (Figure 7). Le contenu protéique des bandes les plus marquées a ensuite été analysé par spectrométrie de masse après séparation par chromatographie liquide (LC-MS/MS) (Figure 7). Les protéines identifiées sont les suivantes : deux sous-unités de l'ATPase vacuolaire (VHA-A, VHA-B1), trois protéases (une tripeptidyl peptidase II, une leucine aminopeptidase putative et une endochitinase), trois protéines de type Band 7, une glycosidase, une glutathione S-transférase (AtGSTF10), une pectine méthylestérase putative, une protéine de type « SOUL heme-binding » et une protéine similaire à la protéine bactérienne TolB, impliquée dans la stabilité des membranes chez les bactéries Gram négatives (Gram-).

Par comparaison avec les identifications réalisées par les équipes ayant publié sur le même sujet, nous avons pu remarquer que, sur ces 13 protéines majoritaires, une seule était présente dans tous les travaux (VHA-A, At1g78900) et une autre n'avait au contraire jamais été identifiée précédemment (GH, At4g16260). D'autre part, deux des trois analyses publiées ne concernant que la fraction membranaire, l'identification des protéines solubles de la vacuole provenaient majoritairement des travaux de Carter *et al.* (2004), réalisés sur des protoplastes isolés à partir de feuilles. Nous proposons quant à nous une caractérisation globale (membranaire et soluble) à partir de cellules en culture, ce qui pouvait déboucher sur des identifications différentes de celles de cette équipe. En effet, Carter *et al.* (2004) mentionnent comme protéine très majoritaire de leurs extraits

une MAP (*Myrosinase-Associated Protein*), absente de nos premières identifications. Ce type de protéines intervient notamment dans la défense contre les pathogènes lors de la rupture de tissus foliaires par des herbivores, et a une expression cellule-dépendante au sein d'un même tissu (Thangstad *et al.*, 1990; 1991), illustrant les variations d'expression qui peuvent exister entre les systèmes « plante entière » et « cellule en culture ». Ces différentes observations suggérant le caractère complémentaire de notre étude par rapport à ce qui avait pu être décrit précédemment, nous avons décidé de poursuivre les analyses et mis en place une stratégie de caractérisation protéomique à partir des vacuoles purifiées.

I.3 - Mise en place d'une stratégie d'étude protéomique de la vacuole d'*Arabidopsis thaliana*.

L'étude que nous souhaitons réaliser avait pour but d'établir un profil protéique vacuolaire de référence, constituant une base de connaissances essentielle à l'étude de la dynamique de ce protéome lors d'un stress cadmium. Dans cette optique, plusieurs aspects de l'organisation du protéome vacuolaire ont été étudiés au cours de ce travail, présenté de façon schématique dans la Figure 8 :

- Dans un premier temps, nous avons souhaité réaliser une étude qualitative du protéome de la vacuole d'*Arabidopsis thaliana*, à travers une analyse la plus exhaustive possible des protéines de cet organelle. Cette première étude, réalisée sur les fractions membranaires d'une part et solubles d'autre part, nous a permis i) d'identifier les protéines vacuolaires constitutivement exprimées dans nos conditions de culture, et ii) de compléter la caractérisation protéique qualitative de la vacuole déjà initiée par les travaux précédemment publiés.

- Un second aspect de l'étude mise en place a consisté en une évaluation quantitative de la composition du protéome soluble de la vacuole. Pour ce faire, une cartographie bidimensionnelle des protéines solubles de la vacuole a été réalisée par IEF / SDS-PAGE. Ce type d'analyse a permis d'évaluer les proportions relatives des protéines majeures de ce protéome, et ainsi d'établir une cartographie de référence pour en étudier les fluctuations en fonction de *stimuli* extérieurs. Ce travail a également été l'occasion de comparer le contenu protéique de la vacuole avec celui de fractions enrichies en protéines cytosoliques dans le but d'identifier de potentiels contaminants dans nos préparations. Cette étude comparative a été complétée par une analyse protéomique de vacuoles soumises à une digestion par la protéinase K, destinée à éliminer les protéines associées à la vacuole du côté cytosolique du tonoplaste.

- Enfin, nous avons souhaité aller plus loin dans l'étude protéomique en évaluant l'organisation en complexes des protéines vacuolaires. Pour ce faire, nous avons réalisé des

analyses des protéomes solubles et membranaires par électrophorèses sur gel d'acrylamide en conditions non dénaturantes (BN-PAGE), qui nous ont permis de mieux appréhender l'organisation supramoléculaire de ce protéome.

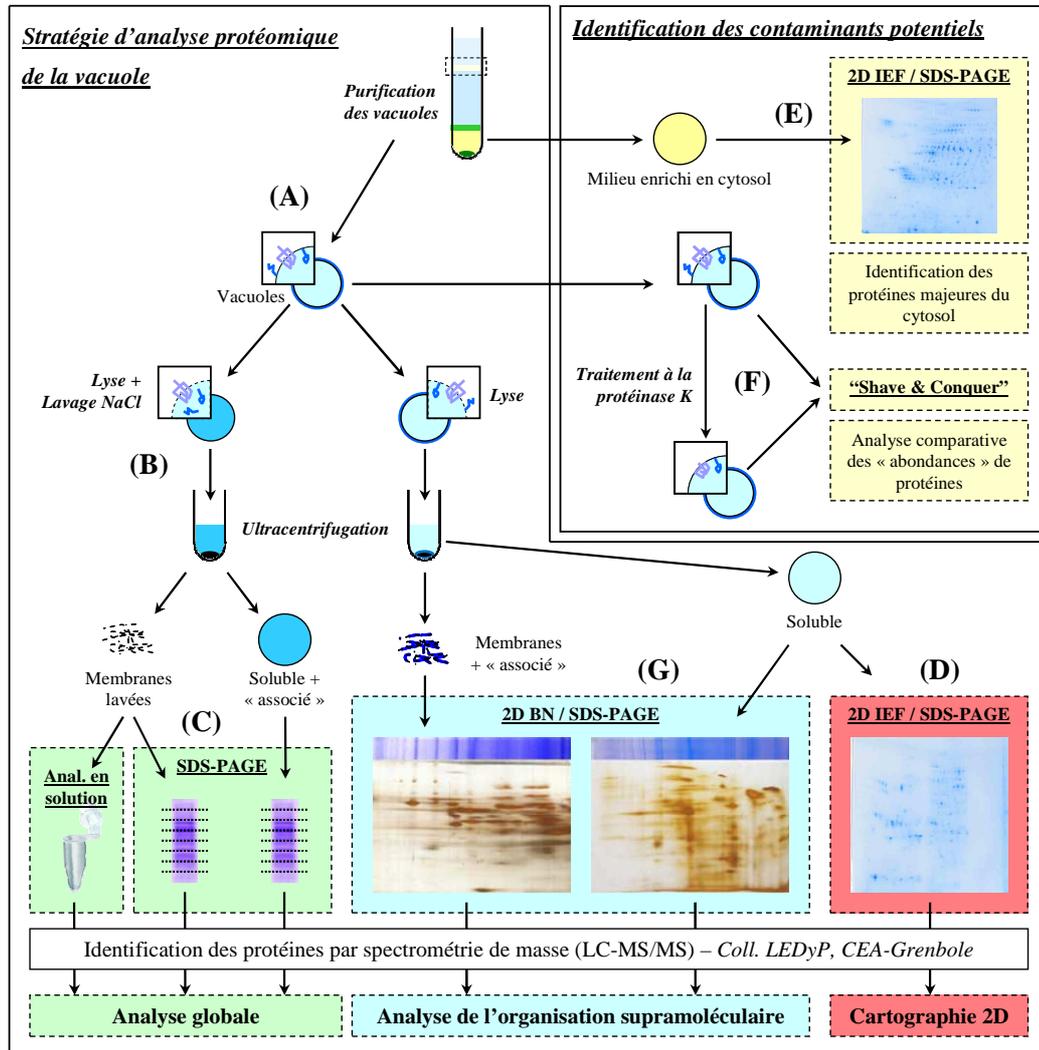


Figure 8 : Stratégie générale d'analyse protéomique de la vacuole d'*Arabidopsis thaliana*. Après purification des vacuoles sur gradient de Ficoll (A) les organites ont été centrifugés afin de séparer la fraction membranaire de la fraction soluble (B), et les protéines constituant chacune de ces fractions identifiées par spectrométrie de masse (C). Cette étude qualitative du protéome vacuolaire a ensuite été complétée par une analyse plus quantitative de la fraction soluble par séparation des protéines sur gel bidimensionnel IEF / SDS-PAGE (D), et identification des protéines majeures par spectrométrie de masse. Une telle analyse a également permis de réaliser une comparaison du protéome vacuolaire avec celui de fractions enrichies en protéines cytosoliques (E) dans le but d'identifier les contaminants cytosoliques potentiels de nos échantillons. Des expériences de digestion de vacuoles intactes par la protéinase K (F) ont également été réalisées dans cette optique. Enfin, nous avons souhaité évaluer plus avant l'organisation supramoléculaire des protéomes solubles et membranaires de la vacuole en réalisant des électrophorèses sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes (BN-PAGE, G). Les gels de type IEF / SDS-PAGE ont été réalisés en collaboration T. Rabilloud (LBBSI, CEA-Grenoble), et les identifications par spectrométrie de masse en collaboration avec le laboratoire LEDyP (CEA-Grenoble), et plus particulièrement avec M. Jaquinod, L. Kuhn et S. Kieffer-Jaquinod.

II - Analyse du protéome membranaire de la vacuole **d'*Arabidopsis thaliana***

La première étape de l'étude mise en place consiste en une analyse globale des constituants protéiques membranaires de la vacuole. La Figure 9 reprend la stratégie générale de l'analyse mise en place (Figure 8) et met en évidence la partie présentée dans ce chapitre.

Après purification sur gradient de Ficoll (Figure 9-A), les vacuoles isolées ont été lysées par deux cycles de congélation / décongélation, puis centrifugées en présence de 500 mM de NaCl (Figure 9-B) afin de « décrocher » les protéines associées à la membrane. La fraction membranaire a alors été analysée par spectrométrie de masse. Pour ce faire, nous avons réalisé une courte électrophorèse de type SDS-PAGE (environ 2,5 cm de migration) à partir de 40 µg de protéines membranaires, et la piste de migration a été découpée en quinze fragments analysés séparément par spectrométrie de masse afin de diminuer la complexité des échantillons (Figure 9-C). Pour cela, le contenu protéique de chaque morceau de gel a été soumis à l'action de la trypsine, une protéase qui hydrolyse spécifiquement après une lysine ou une arginine. Les peptides résultants ont alors fait l'objet d'une étape d'oxydation ménagée par une solution d'H₂O₂ et ont été extraits du gel avant leur chargement sur une colonne chromatographique (nanoLC). Cette étape particulière d'oxydation permet la transformation des cystéines en acides cystéiques (+48 Da), et l'oxydation maximale des méthionines (+32 Da). Une limite importante à l'efficacité du séquençage est en effet la variation de l'état d'oxydation des protéines analysées, et plus particulièrement de ces acides aminés. Ces oxydations peuvent intervenir soit *in vivo*, soit lors de la préparation des échantillons, et sont difficilement contrôlables. Elles sont alors susceptibles d'entraîner une hétérogénéité de la masse des peptides, et cette procédure originale, différente des étapes de réduction / alkylation souvent effectuées, a permis d'améliorer sensiblement la qualité des spectres grâce à la stabilisation des résidus cystéine et méthionine, conduisant ainsi à une meilleure identification des protéines analysées.

Les identifications des protéines ont été réalisées dans le cadre d'une collaboration avec le Laboratoire d'Etude de la Dynamique des Protéomes (LEDyP) du CEA de Grenoble, et ont été effectuées par Michel Jaquinod, Sylvie Kieffer-Jaquinod et Lauriane Kuhn.

Cette étude a débouché sur l'identification de 387 protéines, ce qui représente la plus importante identification protéique réalisée sur des fractions tonoplastiques à ce jour. Cette première analyse a alors fait apparaître plusieurs transporteurs, dont certains étaient identifiés pour la première fois sur le tonoplaste (cf. ci-après). Cette observation nous a incités à approfondir le travail de caractérisation, en réalisant une identification protéique à partir d'un échantillon complet, sans fractionnement préalable par électrophorèse, cette étape étant parfois critique dans le cas de protéines hydrophobes. Nous avons alors effectué une étape de dénaturation et de solubilisation à

haute température (90°C pendant 10 min) suivie d'un refroidissement immédiat par ajout de méthanol froid (-20°C). Ceci a été suivi d'une digestion trypsique directement sur les membranes en solution (Figure 9-D). L'ensemble des peptides tryptiques obtenus a alors pu être analysé par nanoLC-MS/MS et a permis l'identification de 122 protéines, dont 33 nouvellement détectées.

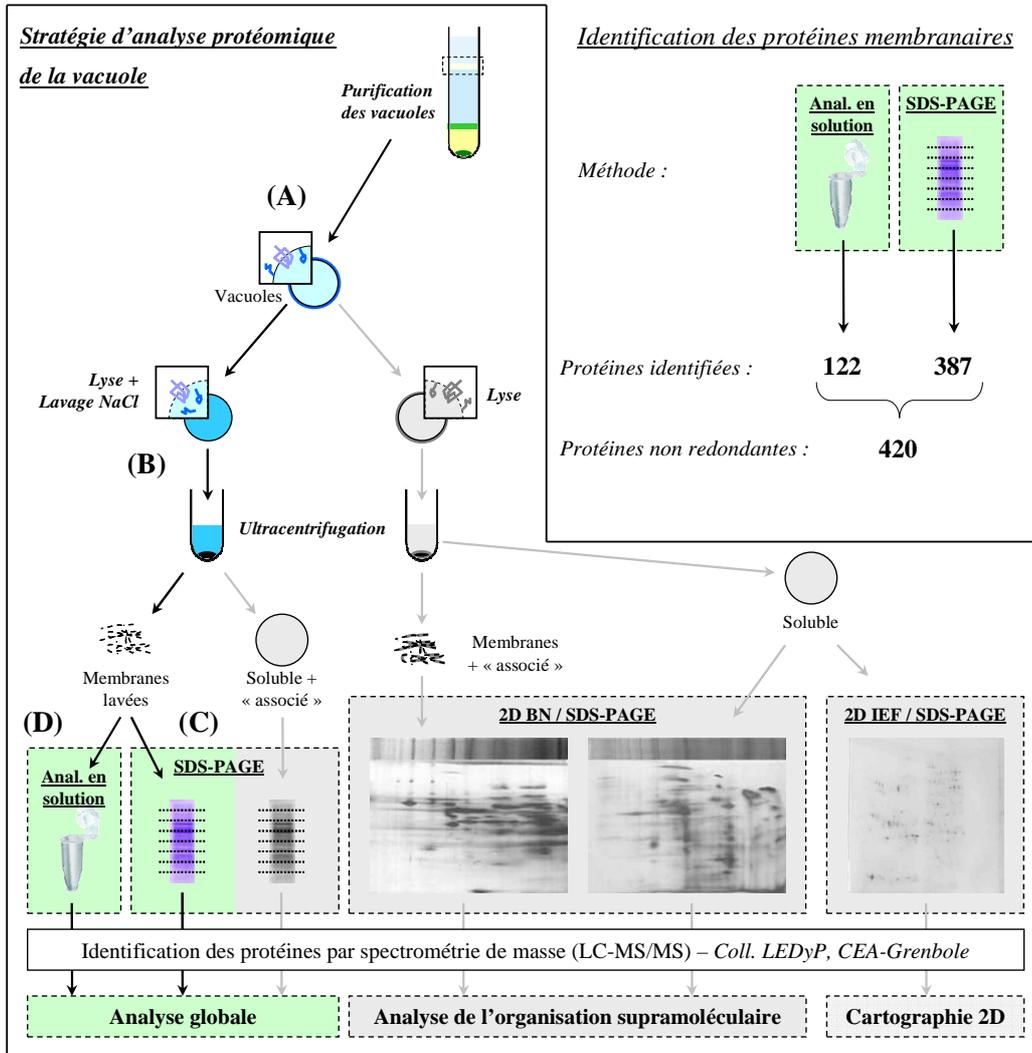


Figure 9 : Analyse par spectrométrie de masse de la composition protéique de la membrane de vacuoles d'*Arabidopsis thaliana*. Les vacuoles purifiées (A) ont été lysées par congélation / décongélation puis centrifugées en présence de 500 mM de NaCl (B). 40 µg de protéines de la fraction membranaire ainsi isolée ont alors été séparés par électrophorèse (SDS-PAGE, 12% d'acrylamide, 2,5 cm de migration) puis divisés en 15 fractions analysées chacune par nanoLC-MS/MS (C). Une analyse complémentaire a consisté en une identification du contenu protéique de l'échantillon par spectrométrie de masse sans électrophorèse préalable (D), les deux approches conduisant respectivement à l'identification de 387 et 122 protéines, ce qui correspond à 420 protéines membranaires non redondantes.

II.1 - Analyse de la composition protéique du tonoplaste

Les identifications réalisées sur la fraction membranaire des vacuoles ont conduit à l'établissement d'une liste de 420 protéines non redondantes, à partir des deux analyses, en gel et en solution (Jaquinod *et al.*, 2007a). Parmi celles-ci, 195 peuvent être considérées comme intrinsèquement membranaires car comportant un ou plusieurs (jusqu'à 16) domaines transmembranaires. D'autres ne sont composés que de feuilletts β (5 protéines), ou des sites prédits de liaison covalente à des lipides : myristoylation (12 protéines), prénylation (9 protéines) ou ancre glycosylphosphatidylinositol (ancres GPI : 4 protéines). Vingt-neuf protéines, en particulier des sous-unités de l'ATPase vacuolaire, sont également connues pour être liées à la membrane par l'intermédiaire d'une protéine intrinsèquement membranaire. La Figure 10 présente les types de liaison à la membrane de 260 protéines identifiées et connues ou prédites pour être associées à la membrane.

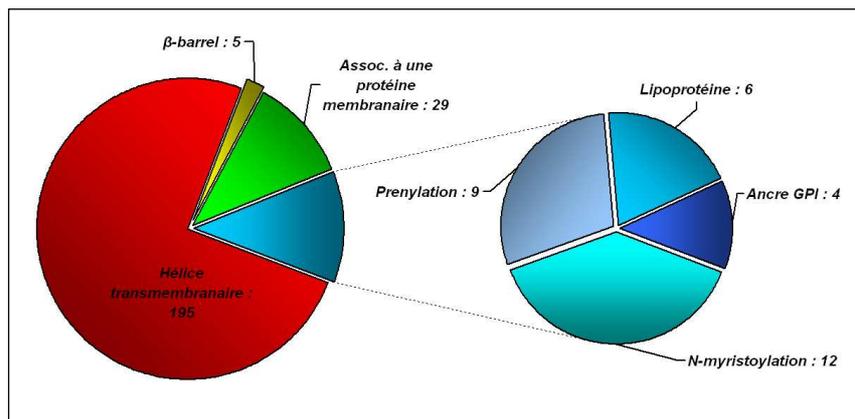


Figure 10 : *Types de liaison au tonoplaste de 260 protéines identifiées dans la vacuole et connues pour être associées à la membrane. On distingue les protéines intrinsèquement membranaires (contenant une ou plusieurs hélice(s) transmembranaire(s) ou brins β : 200), les protéines solubles associées à des protéines membranaires (29), et les protéines liées à un lipide (31).*

Cette forte représentation de protéines hydrophobes, contenant jusqu'à 16 segments transmembranaires est particulièrement intéressante, et souligne l'efficacité du protocole d'identification utilisé. Les 420 protéines identifiées dans la fraction membranaire ont pu faire l'objet d'une classification en catégories fonctionnelles principales, sur la base de celle proposée par le MIPS. Huit groupes ont été définis : Transporteurs, Glycosidases, Protéases, Protéines de réponse au stress, Transduction de signal, Métabolisme, Cytosquelette et Autres (Figure 8). Cent vingt et une protéines n'ont pas été classées, soit parce que la protéine est identifiée mais son rôle exacte

n'est pas connu (*Band 7, SOUL / Heme binding protein* par exemple), soit parce que la protéine n'est pas caractérisée (*expressed protein* principalement).

L'un des rôles majeurs de la vacuole est le stockage, temporaire ou permanent, de composés variés. Le caractère essentiel de cette fonction est illustré par la proportion élevée de protéines de transport retrouvées dans la fraction tonoplastique (plus de 25%), qui constituent la catégorie fonctionnelle la plus importante de la vacuole (Figure 11). C'est également ce groupe qui compte les plus de protéines identifiées lors de l'analyse en solution. Les scores *MASCOT* élevés obtenus suggèrent que, si les membres de cette catégorie sont variés (110 transporteurs différents identifiés), ils sont aussi fortement représentés pour certains (score = 2080 pour MRP14 par exemple).

Parmi les principales fonctions de la vacuole, les activités hydrolytiques sont caractérisées par l'identification de 7 glycosidases et 17 protéases identifiées. Il est intéressant de noter que 8 sous-unités du protéasome (appartenant aux domaines 20s et 19s) sont présentes. Décrites pour être cytosoliques, leur co-purification avec les membranes vacuolaires, en dépit du lavage salin effectué, suggère leur association au tonoplaste, probablement pour des raisons physiologiques. Ce point sera approfondi par la suite.

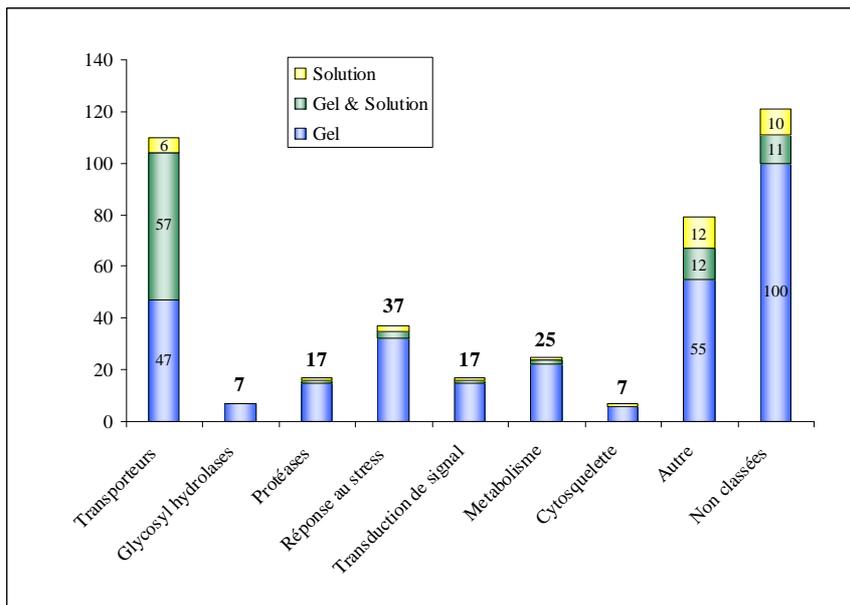


Figure 11 : Principales catégories fonctionnelles des protéines identifiées à partir de la fraction membranaire des vacuoles. Les proportions des protéines identifiées à partir des différents protocoles sont mentionnées, avec éventuellement le nombre exact de protéines : Bleu = protéines identifiées uniquement par l'analyse après électrophorèse, Jaunes = protéines identifiées uniquement par l'analyse en solution, Vert = protéines identifiées par les deux approches. Lorsque les contributions des différents protocoles ne sont pas détaillées, la valeur indiquée est celle du nombre total des protéines de la catégorie considérée.

des différents protocoles ne sont pas détaillées, la valeur indiquée est celle du nombre total des protéines de la catégorie considérée.

Trente-sept protéines impliquées dans la réponse cellulaire au stress sont également représentées. Il s'agit notamment de nombreuses HSP, de thioredoxines, impliquées dans la réponse aux stress oxydants, ou encore d'une strictosidine synthase qui pourrait participer à la réponse de la plante lors d'agressions de type lacération (herbivorie).

Plusieurs protéines décrites pour être des intermédiaires de la transduction de signaux (7) ont également été identifiées, et notamment deux membres de la famille des 14-3-3. Ces protéines sont les ligands directs d'une grande variété de substrat protéiques : récepteurs membranaires, kinases ou phosphatases par exemple, pour lesquelles elles ont des activités régulatrices (Roberts, 2003). La co-purification avec le tonoplaste des 14-3-3 identifiées, alors qu'on ne leur connaît pas de domaine de liaison à la membrane, suggère qu'elles sont impliquées dans des mécanismes de régulation de la transduction de signaux au niveau de la vacuole. De tels processus n'ayant jamais été décrits, ces résultats sont particulièrement intéressants dans la compréhension du fonctionnement de la cellule végétale et du rôle qu'y tient la vacuole.

II.1.1 - Les transporteurs

Les transporteurs localisés sur le tonoplaste et qui sont à l'origine de la capacité de la vacuole à séquestrer et éventuellement libérer des composés cellulaires sont très mal connus. Particulièrement hydrophobes du fait de leur fonction, qui nécessite de nombreux domaines transmembranaires, ces protéines sont souvent difficiles à extraire des membranes ou à sur-exprimer, ce qui rend leur caractérisation délicate. La stratégie d'analyse protéomique que nous avons mise en place a permis d'identifier 110 transporteurs. Par comparaison, les publications de Szponarski *et al.* (2004), Shimaoka *et al.* (2004) et Carter *et al.* (2004) font état, respectivement, de 13, 40 et 46 transporteurs qui représentent un total de 63 protéines non redondantes. Notre contribution à l'étude du protéome tonoplastique a permis d'ajouter 60 protéines à la liste établie, portant à 123 le nombre de transporteurs non redondants identifiés par l'ensemble des travaux. La Figure 12 présente les contributions relatives des 4 publications considérées (Carter *et al.*, 2004; Shimaoka *et al.*, 2004; Szponarski *et al.*, 2004; Jaquinod *et al.*, 2007a) dans l'identification des transporteurs tonoplastiques. Les transporteurs identifiés par Schmidt *et al.* (2007) ne sont pas inclus, du fait qu'il est difficile d'attribuer une identification sans équivoque à certains peptides séquencés à cause du matériel initial (le chou-fleur) utilisé par cette équipe. Il est intéressant de noter que, sur l'ensemble des 123 transporteurs, la stratégie d'analyse protéomique que nous avons

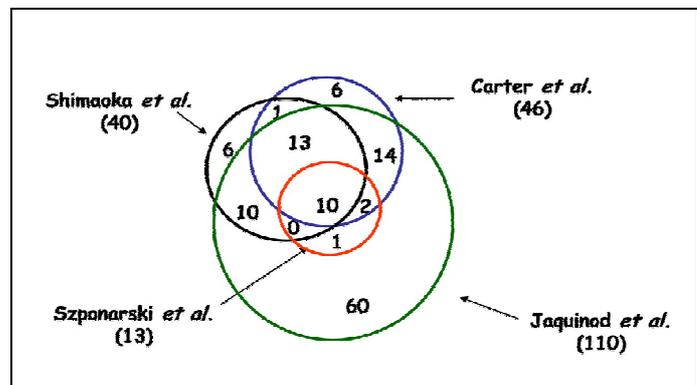


Figure 12 : Contributions de différents travaux de protéomique vacuolaire à l'établissement d'une liste de 123 transporteurs tonoplastiques. Le nombre de transporteurs identifié par chacune des équipes est indiqué entre parenthèses.

adoptée nous permet d'identifier la grande majorité d'entre eux (près de 90 %). Cette particularité est intéressante si l'on considère que les perspectives de ce travail sont d'identifier mais également de suivre la dynamique de transporteurs éventuellement impliqués dans la détoxification du cadmium. Les transporteurs que nous avons identifiés ont été répartis en 9 classes majeures (Figure 13) : sous-unités de l'ATPase vacuolaire, aquaporines (TIP), canaux ioniques, transporteurs de métaux, transporteurs de sucres, transporteurs d'acides aminés et de peptides, protéines à domaine SPFH (MATE efflux), et transporteurs à *ATP Binding Cassette* (ABC).

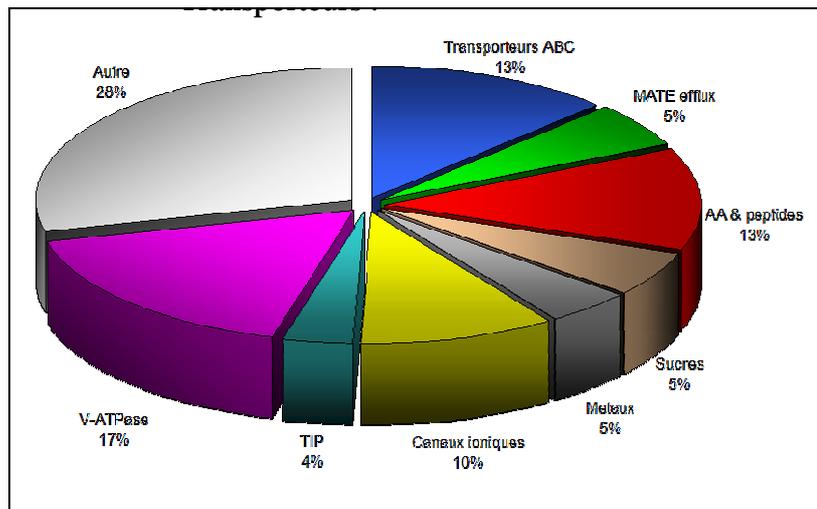


Figure 13 : Principales classes de transporteurs identifiées dans le tonoplaste de la vacuole, classées selon l'ontologie du Munich Information for Protein Sequence (MIPS).

II.1.1.1 - Les pompes à protons

Deux types de pompes sont responsables de l'influx de protons à l'intérieur de la vacuole et ont pu être identifiés par nos analyses : le complexe de l'ATPase vacuolaire, dont la quasi-totalité des sous-unités a été retrouvée, et la pyrophosphatase (H^+ -PPase), dont une isoforme a été identifiée avec un score MASCOT de 2193. L'ATPase de type V est l'un des transporteurs les mieux connus de la vacuole. C'est un complexe protéique de 13 sous-unités chargé de l'import actif de protons dans la vacuole *via* l'hydrolyse d'ATP (cf. synthèse bibliographique p. 17 et Tableau II). Il est formé de deux domaines, l'un, soluble, catalysant l'hydrolyse de l'ATP (domaine V1), et l'autre, transmembranaire, permettant le passage des protons à travers le tonoplaste (domaine V0). Ce complexe est un constituant majeur de la vacuole, et l'identification de 11 des 13 sous-unités le composant avec pour certaines de très hautes valeurs MASCOT (jusqu'à 2368, la valeur moyenne des scores étant de 700) traduit cette abondance. Ces 11 sous-unités ont été retrouvées dans la fraction membranaire (Tableau II), et pour certaines d'entre elles, codées par plusieurs gènes, toutes

les isoformes ont pu être identifiées. En particulier, les 8 sous-unités du domaine V1 ont toutes été identifiées. Parmi celles-ci, 5 n'ont pas d'isoformes et sont codées par un seul gène, alors que les 3 autres ont chacune 3 isoformes. Les différentes sous-unités du domaine V1 sont donc codées par 14 loci, dont 13 ont été retrouvées lors de nos analyses. Le domaine membranaire V0 comprend 5 sous-unités, toutes codées par 2 à 5 gènes. Nous avons pu identifier 3 de ces sous-unités, avec dans chaque cas 2 isoformes (Tableau II).

Tableau II : Sous unités-de l'ATPase vacuolaire. Les scores MASCOT des sous-unités identifiées dans nos travaux pour les analyses de la fraction membranaire après électrophorèse sur gel d'acrylamide (Gel) et directement en « solution » (Solution) sont précisés.

Sous-unité	Locus	Score MASCOT		Sous-unité	Locus	Score MASCOT	
		Gel	Solution			Gel	Solution
V1 - Domaine catalytique				V0 - Canal à protons			
VHA-A - Sous unité calalytique de liaison l'ATP				VHA-a - Couplage, assemblage			
VHA-A	At1g78900	2038	157	VHA-a1	At2g28520	-	-
VHA-B - Sous unité non-calalytique de liaison l'ATP				VHA-c - Translocation des protons			
VHA-B1	At1g76030	1455	-	VHA-a2	At2g21410	1270	1048
VHA-B2	At4g38510	1364	140	VHA-a3	At4g39080	2368	1920
VHA-B3	At1g20260	1402	-	VHA-c'' - Translocation des protons			
VHA-C - Stabilité du domaine V1				VHA-d - Assemblage et stabilité du domaine V0			
VHA-C	At1g12840	998	139	VHA-d1	At3g28710	579	-
VHA-D - Axe central, couplage				VHA-e			
VHA-D	At3g58730	471	92	VHA-e1	At5g55290	-	-
VHA-E - Axe central ou périphérique				VHA-e2			
VHA-E1	At4g11150	888	51	VHA-e2	At4g26710	-	-
VHA-E2	At3g08560	144	-				
VHA-E3	At1g64200	422	-				
VHA-F - Laison entre les domaines V1 et V0							
VHA-F	At4g02620	250	-				
VHA-G - Couplage entre les domaines V1 et V0							
VHA-G1	At3g01390	389	163				
VHA-G2	At4g23710	145	-				
VHA-G3	At4g25950	-	-				
VHA-H - Sous unité régulatrice							
VHA-H	At3g42050	857	81				

Ces résultats suggèrent l'absence d'une spécificité tissulaire forte quant à l'expression des isoformes des sous-unités composant le domaine V1 de l'ATPase vacuolaire. A l'inverse, le domaine V0 est composé exclusivement de sous-unités comprenant plusieurs isoformes (14 protéines représentant 5 sous-unités), dont seules 6 ont été identifiées (Tableau II). Il est possible

que le caractère membranaire de ces protéines, et donc très hydrophobe, soit à l'origine de cette difficulté d'analyse, cependant le score *MASCOT* élevé des sous-unités VHA-a2 et VHA-a3 (respectivement 1270 et 1368) laisse supposer que l'absence d'isoforme VHA-a1 de nos identifications est plus probablement due à sa faible représentation dans les échantillons. Cette hypothèse d'une probable spécificité des sous-unités du domaine V0 est également appuyée par l'identification d'isoformes des sous-unités VHA-c différentes dans les travaux de Carter *et al.* (2004) et dans les nôtres. Cette équipe, qui a isolé des vacuoles à partir de feuilles, n'a retrouvé que l'isoforme VHA-c3 (score *MASCOT* = 91, Carter *et al.*, 2004), alors que nous identifions les isoformes c2 (score = 97) et c5 (score = 172). Les travaux de Schmidt *et al.* (2007) n'ont pas permis d'identifier précisément la (ou les) isoforme(s) de cette sous-unité présente(s) dans leurs extraits.

L'identification de 11 des 13 sous-unités connues de l'ATPase vacuolaire démontre l'efficacité du protocole que nous avons mis en place en vue d'analyser les protéines vacuolaires. De façon intéressante, les travaux de Shimaoka *et al.* (2004), de Carter *et al.* (2004) et de Schmidt *et al.* (2007) ont abouti à une couverture équivalente dans l'identification des sous-unités de l'ATPase vacuolaire, les mêmes sous-unités VHA-c'' et VHA-e n'ayant pas été retrouvées non plus. La faible représentation de ces protéines au sein du complexe de la V-ATPase et la petite taille (8 kDa) de la sous-unité VHA-e pourraient être à l'origine de ce phénomène.

II.1.1.2 - Transporteurs à « ATP Binding Cassette » (ABC)

Les transporteurs ABC sont impliqués dans l'import actif, grâce à l'hydrolyse d'ATP, de composés divers : sucres, lipides, conjugués du glutathion, alcaloïdes, stéroïdes ou encore acides organiques (Theodoulou, 2000). Le génome d'*Arabidopsis thaliana* compte 129 transporteurs de ce type, divisés en 12 sous-familles (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001). Nos travaux ont permis d'identifier 14 transporteurs ABC représentant 5 sous-familles (Tableau III) : MultiDrug Resistance protein (MDR), Pleiotropic Drug Resistance (PDR), Non-Intrinsic ABC Protein (NAP), Transporter associated with Antigen Processing (TAP), Multidrug Resistance-associated Protein (MRP). Quatre d'entre elles ne sont représentées que par une seule protéine (MDR17, PDR8, NAP3 et TAP2), et 10 protéines appartiennent à la même sous-famille (MRP1 à 8, MRP10 et MRP14). Jusqu'à présent, seuls 3 transporteurs ABC ont été localisés au tonoplaste par des expériences de fluorescence *in vivo* : MRP1, (Klein *et al.*, 2004), MRP2, (Lee *et al.*, 2004) et TAP2 (Larsen *et al.*, 2007). La présence de ces trois protéines est confirmée par nos identifications (Tableau III). La localisation vacuolaire de 6 autres transporteurs que nous identifions est confirmé par des travaux de protéomique de différentes équipes : MRP3, MRP5 et MRP6 (Dunkley *et al.*, 2006) ; MRP4 (Carter *et al.*, 2004; Shimaoka *et al.*, 2004; Szponarski *et al.*, 2004; Dunkley *et al.*, 2006) ; MRP14 (Carter *et al.*, 2004; Shimaoka *et al.*, 2004; Dunkley *et al.*, 2006). Enfin, 6 transporteurs ont pu être localisés à la membrane de la vacuole pour la première fois grâce à nos analyses. Si 5 d'entre eux

(MDR17, MRP7, MRP8, MRP10, NAP3) n'avaient pas de localisation connue, PDR8 avait été décrite pour être plasmalemmique *via* des expériences de localisation *in vivo* (Kobae *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2007), et grâce aux travaux de protéomique de Dunkley *et al.* (2006). Une double localisation de cette protéine est toutefois envisageable, avec une relativement faible représentation dans le protéome vacuolaire qui expliquerait son absence des identifications réalisées par d'autres équipes. Le score MASCOT relativement élevé (296) avec lequel nous l'identifions et l'absence notable de protéines majoritaires du plasmalemmes dans nos identifications rend très improbable une éventuelle contamination. Cette localisation à la fois vacuolaire et plasmalemmique est d'ailleurs également observée pour MRP4. Identifiée dans la quasi-totalité des travaux avec des scores importants (Tableau III), cette protéine semble faire partie des composants principaux du tonoplaste alors que les travaux de Klein *et al.* (2004) l'avaient situé à la membrane plasmique par des expériences de fusion à la GFP.

Tableau III : Transporteurs ABC identifiés dans la fraction membranaire de la vacuole. Les valeurs de score MASCOT, de couverture (exprimés en pourcentage) et le nombre de peptides identifiés sont reportés pour les analyses après électrophorèse sur gel d'acrylamide (Gel) et en « solution ». Les valeurs de couverture obtenues par Shimaoka *et al.* (2004) (**Sh**), et les meilleurs scores obtenus par Carter *et al.* (2004) (**C**), et Dunkley *et al.* (2006) (**D**) sont également spécifiés. (* : protéine assignée à la membrane plasmique par Dunkley *et al.*, 2006).

Nom	Locus	Gel		Solution		Sz	Sh	C	D
		Score (cov.)	# peptides	Score (cov.)	# peptides				
MultiDrug Resistance proteins (MDR), 22 membres									
AtMDR17	At3g62150	64 (4)	2	-	-	-	-	-	-
Multidrug Resistance-associated Proteins (MRP), 15 membres									
AtMRP1	At1g30400	1180 (23)	23	1549 (23)	27	26%	5%	80	716
AtMRP2	At2g34660	710 (21)	19	887 (14)	15	-	4%	-	553
AtMRP3	At3g13080	328 (13)	8	312 (9)	6	-	-	-	445
AtMRP4	At2g47800	856 (19)	19	1738 (24)	30	15 %	5%	55	700
AtMRP5	At1g04120	529 (13)	11	474 (10)	9	-	-	-	224
AtMRP6	At3g13090	100 (2)	2	-	-	-	-	-	-
AtMRP7	At3g13100	-	-	86 (2)	2	-	-	-	-
AtMRP8	At3g21250	212 (12)	5	273 (7)	6	-	-	-	110
AtMRP10	At3g59140	75 (3)	2	75 (3)	2	-	-	-	-
AtMRP14	At3g62700	1296 (26)	27	2080 (29)	41	-	6%	171	489
Pleiotropic Drug Resistance protein (PDR), 13 membres									
AtPDR8	At1g59870	296 (11)	8	45 (1)	1	-	-	-	1267*
Non-intrinsic ABC Protein (NAP), 15 membres									
AtNAP3	At1g67940	113 (9)	-	-	-	-	-	-	-
Transporter associated with Antigen Processing (TAP), 3 membres									
AtTAP2	At5g39040	86 (5)	2	88 (3)	2	-	9%	38	264

Les transporteurs ABC de type TAP ont été caractérisés chez l'homme pour leur implication dans les processus de présentation d'antigènes par le complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMHI). Localisés sur la membrane du réticulum endoplasmique (RE), ces transporteurs sont alors chargés du transfert de peptides antigéniques vers l'intérieur du RE pour leur présentation à l'extérieur de la cellule *via* le CMHI, et pourraient, à ce titre, être en interaction avec le protéasome. Localisé à la vacuole par plusieurs travaux de protéomique (Carter *et al.*, 2004; Shimaoka *et al.*, 2004; Dunkley *et al.*, 2006) et par fusion à la GFP (Larsen *et al.*, 2007), ce transporteur pourrait, chez les plantes, avoir une autre fonction que la translocation de polypeptides puisqu'une plante mutée sur ce transporteur présente un phénotype d'hypersensibilité à l'aluminium (Larsen *et al.*, 2007).

II.1.1.3 - *Aquaporines (Tonoplast Intrinsic Proteins)*

Les « Tonoplast Intrinsic Proteins » (TIP) sont des aquaporines à la localisation exclusivement vacuolaire. Le génome d'*Arabidopsis* en code 10 isoformes, réparties en 5 sous-familles (cf. Synthèse bibliographique et Johanson *et al.*, 2001). Deux d'entre elles sont présentes dans nos identifications, chacune représentée par 2 isoformes (Tableau IV).

Tableau IV : Tonoplast Intrinsic Proteins (TIP) identifiées par nos travaux. Les scores MASCOT obtenus à partir des analyses en gel et en solution sont précisés, ainsi que les scores d'identification obtenus par Carter *et al.* (2004) (C). La TIP présente dans les travaux de Schmidt *et al.* (2007) (Sc) est marquée d'un astérisque.

Nom	Locus	Score MASCOT		C	Sc
		Gel	Solution		
TIP1 (= γTIP - 3 membres)					
TIP1.1	At2g36830	88	-		
TIP1.2	At3g26520	40	-	108	*
TIP2 (= δTIP - 3 membres)					
TIP2.1	At3g16240	447	311	234	
TIP2.2	At4g17340	45	-	108	

La variété importante d'isoformes de TIP codées par le génome d'*Arabidopsis thaliana* est à relier à la grande spécificité tissulaire et / ou développemental des aquaporines vacuolaires (www.geneinvestigator.com et Tableau V). Chez *Arabidopsis*, les ARN codant les protéines de la

sous-famille 3 (TIP3.1 et TIP3.2) ne sont produits que dans les graines, la sous-famille 4 (TIP4.1) et la TIP2.3 sont spécifiques des racines, et le gène de l'isoforme TIP5.1 est exclusivement exprimé dans le pollen, de même que celui de l'isoforme 1.3 (Tableau V).

Ces données permettent de mieux comprendre pourquoi seules les isoformes 1.1, 1.2, 2.1 et 2.2 ont été identifiées si l'on considère l'ensemble des travaux de protéomique vacuolaire qui mentionnent des TIP. Ces dernières présentent en effet une expression relativement ubiquitaire, excepté dans les cellules en cultures qui constituent le tissu dans lequel l'expression des TIP est, de loin, la plus faible. De façon intéressante, cette faible expression des aquaporines dans les cellules en culture est confirmée par les scores d'identification de Carter *et al.* (2004) sur ces protéines, globalement plus élevés que ceux obtenus à partir de nos analyses (Tableau IV). Alors que cette équipe a en moyenne des scores *MASCOT* plus faibles que les nôtres, cette différence peut être la conséquence d'une expression variable de ces protéines d'un matériel à l'autre.

Au delà d'une expression tissu-dépendante, les isoformes des aquaporines tonoplastiques sont décrites pour être dans des proportions relatives spécifiques du type de vacuoles (lytique ou de stockage) dans lesquelles elles s'expriment (Jauh *et al.*, 1999). Toutefois ces travaux ont été principalement conduits sur des cellules de racines et les résultats peuvent être difficilement extrapolés à d'autres types cellulaires, et être comparés notamment aux analyses publiées sur le protéome vacuolaire (Olbrich *et al.*, 2007 ; Hunter *et al.*, 2007).

Tableau V : Expression génique des 10 isoformes de TIP d'*Arabidopsis thaliana* en fonction du tissu considéré. Les nuances de bleu rendent compte des niveaux d'accumulation des ARNm correspondant aux différentes isoformes (blanc : pas d'expression détectée, bleu clair : expression faible, bleu foncé : expression forte). Ces données sont issues du site genevestigator (<https://iii.genevestigator.ethz.ch>, mai 2008).

	Cell suspension				Inflorescence														Rosette							Roots												
	Seedlings	Cotyledons	Hypocotyl	Radicle	Flower	Carpel	Ovary	Stigma	Petal	Sepal	Stamen	Pollen	Pedice	Siliqua	Seed	Stem	Node	Shoot apex	Cauline leaf	Juvenile leaf	Adult leaf	Petiole	Senescent leaf	Hypocotyl	Xylem	Cork	Lateral roots	Root tip	Elongation zone	Root hair zone	Endodermis	Endodermis + cortex	Epid. Atrichoblasts	Lateral root cap	Stele			
TIP1.1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
TIP1.2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
TIP1.3																																						
TIP2.1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
TIP2.2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
TIP2.3	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
TIP3.1																																						
TIP3.2																																						
TIP4.1																																						
TIP5.1																																						

II.1.1.4 - Autres transporteurs

Soixante-treize autres transporteurs ont été localisés à la vacuole suite aux identifications que nous avons réalisées (Tableau VI).

Parmi eux, 18 sont impliqués dans le transport de métabolites de grande taille, tels que des sucres, des lipides, ou des toxiques divers. Huit sont membres de la *Major Facilitator Superfamily* (MFS), 6 appartiennent à la famille des *Multidrug / Oligosaccharidyl-lipid / Polysaccharide* (MOP), 3 protéines sont de la famille des *Drug / Metabolite Transporter* (DMT) et 1 représente le groupe des *Resistance / Nodulation / Division* (RND). Les membres de la MFS sont des transporteurs secondaires, symport, antiport ou uniport, capables d'assurer la translocation de divers métabolites : sucres, intermédiaires du cycle de Krebs, ou antibiotiques par exemple. La famille des MOP est particulièrement intéressante puisqu'*Arabidopsis* exprime plusieurs membres de cette famille, non présente dans le règne animal. Elle comprend les protéines de la sous-famille des *Multidrug And Toxin Extrusion* (MATE), qui présente des homologies importantes avec des pompes d'efflux bactériennes et dont 4 représentants ont été identifiés. Le génome d'*Arabidopsis* code 54 membres de cette famille, qui reste toutefois peu caractérisée. Seuls quelques uns ont été identifiés pour leur implication dans les mécanismes de détoxification, et la présence de 6 d'entre eux au niveau de la vacuole est très probablement à rattacher au rôle de la vacuole dans la séquestration de toxiques.

Cinq transporteurs de peptides ont été retrouvés dans la fraction membranaire. Trois sont membres de la famille des *Proton-dependent Oligopeptide Transporters* (POT), et deux font partie des *OligoPeptide Transporters* (OPT). Cette dernière famille, qui n'existe pas chez les mammifères, est impliquée dans le transport de peptides de 3 à 6 amino-acides (Stacey *et al.*, 2002). Un cluster particulier de celle-ci comprend notamment le transporteur Yellow Strip 1, caractérisé chez le maïs pour son activité de symport H^+ / phytosidérophore (Curie *et al.*, 2001). Cette protéine est essentielle pour l'assimilation du fer chez cette plante, mais est également capable de prendre en charge d'autres métaux, *via* des phytosidérophores ou des nicotianamines (Schaaf *et al.*, 2004). Les deux OPT identifiés (At5g41000 et At3g27020) font partie de cette famille.

D'autres transporteurs de métaux ont également été identifiés : le transporteur de fer Nramp3, dont la localisation vacuolaire a été confirmée par des expériences de fusion à la GFP (Thomine *et al.*, 2003), de même que IRT3, un transporteur de fer putatif. Le transporteur de zinc ZAT1, l'antiport H^+/Na^+ NHX4, ou encore les perméases à potassium KuP4, KuP5 et KuP7 ont également été identifiés, de même que TPC1, qui participe à l'efflux de calcium vers le cytosol (Furuichi *et al.*, 2001), et plusieurs ATPases permettant l'influx de calcium *via* l'hydrolyse d'ATP (At1g07810, At2g41560).

Tableau VI : Transporteurs identifiés dans la vacuole par nos travaux. Les 37 transporteurs décrits précédemment (sous-unités de la V-ATPase, transporteurs ABC et protéines TIP) ont été omis dans ce tableau. Pour chaque protéine sont indiqués la masse (MW), le point isoélectrique (pI), le nombre de domaines transmembranaires (TMD) donné par Aramemnon (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de>) les scores d'identification en gel et en solution, la famille et le type de transporteur (transporteur secondaire, ATPase, canal ionique), et enfin les pourcentages de couverture de Szponarski et al., (2004), le nombre de peptides identifiés par Shimaoka et al. (2004) et les scores d'identification de Carter et al. (2004). n i = non identifié.

Nom	Locus	MW (Da)	pI	TMD	Score (Gel)	Score (Sol)	Famille	Type	Sz (% cov)	Sh (# pep)	Ca (score)
Potassium transporter family protein (KUP7, HAK7, KT7, POT7)	At5g09400	95292	5.1	13	76	99	KuP	2d Transp.	n i	n i	n i
Integral membrane protein	At1g75220	52867	8.7	12	239	206	MFS	2d Transp.	n i	n i	n i
Integral membrane protein	At1g19450	52753	8.7	12	163	122	MFS	2d Transp.	n i	n i	91
Sugar transporter	At2g48020	49667	9	12	34	-	MFS	2d Transp.	n i	n i	97
Transporter-related similarity to D-xylose proton-symporter	At1g20840	79433	5.1	11	78	86	MFS	2d Transp.	n i	n i	91
Sugar transporter family protein	At5g17010	53504	6.4	12	-	32	MFS	2d Transp.	n i	n i	n i
Sugar transporter family protein	At3g03090				31		MFS	2d Transp.	n i	n i	n i
Transporter-related, low similarity to hexose transporter	At4g35300	79674	5.4	10	354	354	MFS	2d Transp.	n i	n i	50
Transporter-related, similar to cAMP inducible 2 protein and glycerol 3-phosphate permease	At4g17550	59037	7.1	13	124	82	MFS	2d Transp.	n i	n i	n i
MATE efflux family protein	At3g21690	54916	4.2	12	131	127	MOP	2d Transp.	n i	6	n i
MATE efflux family protein	At3g26590	54286	5.7	12	103	119	MOP	2d Transp.	n i	n i	33
MATE efflux family protein	At4g25640	53190	6.5	12	112	128	MOP	2d Transp.	n i	n i	n i
MATE efflux protein	At5g52450	52439	8.1	12	168	166	MOP	2d Transp.	n i	n i	n i
Ripening-responsive protein	At1g47530	52389	7.2	12	209	173	MOP	2d Transp.	n i	n i	n i
Ripening-responsive protein	At1g75530	52426	6.4	11	65	-	MOP	2d Transp.	n i	n i	n i
Nodulin MtN21 family protein	At1g75500	42544	9.2	10	291	204	DMT	2d Transp.	n i	n i	n i
Glucose-6-phosphate/phosphate translocator 2 (GTP2)	At1g61800	42726	9.6	8	52	-	DMT	2d Transp.	n i	n i	n i
Mechanosensitive ion channel domain-containing protein	At1g78610	96543	8.7	6	102	68	DMT	2d Transp.	n i	n i	n i
Patched family protein similar to Niemann-Pick C1 protein	At4g38350	116900	5.3	13	438	283	RND	2d Transp.	11	5	66
Proton-dependent oligopeptide transport family protein	At1g22570	62897	9.1	12	44	-	POT	2d Transp.	n i	n i	n i
Proton-dependent oligopeptide transport family protein	At1g72140	61347	8.2	12	34	-	POT	2d Transp.	n i	n i	n i
Peptide transporter (His transporter)(PTR2-B)	At2g02040	64380	5.5	10	807	567	POT	2d Transp.	n i	7	103

Nom	Locus	MW (Da)	pI	TMD	Score (Gel)	Score (Sol)	Famille	Type	Sz (% cov)	Sh (# pep)	Ca (score)
Oligopeptide transporter OPT family protein, putative Fe(III)-phytosiderophore uptake mediator (YSL6)	At3g27020	73525	5.9	15	236	184	OPT	2d Transp.	n i	n i	n i
Oligopeptide transporter OPT family protein, putative Fe(III)-phytosiderophore uptake mediator (YSL4)	At5g41000	73526	8.3	14	-	65	OPT	2d Transp.	n i	n i	n i
NRAMP metal ion transporter 3 (NRAMP3)	At2g23150	56102	4.8	11	91	84	Nramp	2d Transp.	n i	4	n i
Zinc transporter (ZAT1, MTP1)	At2g46800	43810	6.6	7	48	47	CDF	2d Transp.	n i	3	n i
Sodium proton exchanger (NHX4, putative)	At3g06370	55570	7.4	14	92	93	CPA	2d Transp.	n i	n i	n i
Metal transporter, putative (IRT3)	At1g60960	45060	6.2	7	47	47	ZIP	2d Transp.	n i	n i	n i
Potassium transporter family protein (KUP5/KT5)	At4g33530	94677	5.2	13	44	40	KuP	2d Transp.	n i	n i	n i
Potassium transporter / tiny root hair 1 protein/K carrier required for auxin transport (TRH1/KT3/KUP4)	At4g23640	86786	9.6	13	46	48	KuP	2d Transp.	n i	n i	n i
Lysosomal Cystine Transporter	At5g40670	31007	7.4	6	37	-	LCT	2d Transp.	n i	n i	n i
Cationic amino acid transporter (CAT9)	At1g05940	60138	7.7	15	52	51	APC	2d Transp.	n i	n i	n i
Cationic amino acid transporter (CAT2)	At1g58030	67072	5.8	14	287	24	APC	2d Transp.	n i	n i	58
Cationic amino acid transporter (CAT4)	At3g03720	63597	5.8	14	180	145	APC	2d Transp.	n i	n i	40
Cationic amino acid transporter (CAT8)	At1g17120	64863	8.26	12	32	-	APC	2d Transp.	n i	n i	n i
Amino acid transporter family protein	At3g30390	49485	6.1	11	50	50	AAAP	2d Transp.	n i	n i	30
Amino acid transporter family protein	At2g41190	58825	4.8	10	185	179	AAAP	2d Transp.	n i	n i	n i
Amino acid transporter family protein	At2g39130	60070	5.6	10	62	-	AAAP	2d Transp.	n i	n i	n i
Amino acid transporter family protein	At2g40420	47639	6.3	10	-	62	AAAP	2d Transp.	n i	n i	n i
Amino acid transporter family protein	At3g28960	44645	8.9	10	32	-	AAAP	2d Transp.	n i	n i	n i
Proton-dependent concentrative adenosine transporter (ENT1)	At1g70330	49312	6.8	11	75	74	ENT	2d Transp.	n i	n i	n i
ADP, ATP carrier protein 2	At5g13490	41720	9.8	3	198	-	MC	2d Transp.	n i	n i	n i
Putative ADP, ATP carrier protein 1	At3g08580	41449	9.8	3	424	-	MC	2d Transp.	n i	n i	n i
Mitochondrial phosphate transporter (PHT3-1)	At5g14040	40064	9.3	3	83	-	MC	2d Transp.	n i	n i	n i
Peroxisomal membrane protein (PMP36)	At2g39970	36190	9.9	3	43	-	MC	2d Transp.	n i	n i	n i
Dicarboxylate/tricarboxylate carrier (DTC)	At5g19760	31891	9.4	2	324	-	MC	2d Transp.	n i	n i	n i
Putative mitochondrial substrate carrier family protein	At4g01100	38301	9.6	1	155	-	MC	2d Transp.	n i	n i	n i
Putative plant uncoupling mitochondrial protein	At3g54110	32641	9.6	1	227	-	MC	2d Transp.	n i	n i	n i

Nom	Locus	MW (Da)	pI	TMD	Score (Gel)	Score (Sol)	Famille	Type	Sz (% cov)	Sh (# pep)	Ca (score)
Two-pore calcium channel (TPC1)	At4g03560	84819	4.9	10	413	268	VIC	Ion Channels	21	n i	167
Zinc finger (DHHC type) family protein	At3g51390	39202	8.4	4	45	45	VIC	Ion Channels	n i	n i	n i
Chloride channel protein (CLC-c)	At5g49890	85177	8.7	10	79	-	CLC	Ion Channels	n i	n i	n i
Putative plasma membrane P3A-type H ⁺ -ATPase (AHA2)	At4g30190	104335	6.5	10	159	117	P-ATPase	ATP-Dep	n i	n i	n i
Putative Ca ²⁺ -transporting P2B-type ATPase (ACA11)	At3g57330	111874	6	11	731	593	P-ATPase	ATP-Dep	29	2	91
Putative plasma membrane P3A-type H ⁺ -ATPase (AHA9)	At1g80660	105142	6	10	84	51	P-ATPase	ATP-Dep	n i	n i	n i
Calmodulin-regulated Ca ²⁺ -ATPase 4 (ACA4)	At2g41560	112678	5.8	9	196	200	P-ATPase	ATP-Dep	n i	n i	105
Ca ²⁺ /Mn ²⁺ -transporting P2A-type ATPase (ECA1/ACA3)	At1g07810	116291	5	8	38	-	P-ATPase	ATP-Dep	n i	n i	n i
Porin family protein	At3g20000	34228	6.3	b	177	-	MPT	ATP-Dep	n i	n i	n i
Vacuolar proton-translocating pyrophosphatase (AVP-3)	At1g15690	80768	5.1	15	2193	1948	H-PPase	ATP-Dep	21	17	88
Copper transporter family	At5g20650	15774	9.2	2	86	75	CTR2	UNK	n i	n i	58
Expressed protein	At1g73650	32939	9.1	6	194	177	UNC	UNK	n i	n i	68
Nodulin family protein	At5g14120	63108	7.2	12	108	-	UNC	UNK	n i	n i	68
Expressed protein	At1g64650	50625	6.2	11	31	-	UNC	UNK	n i	n i	n i
Expressed protein	At2g20230	29702	5.1	4	-	48			n i	n i	n i
Endomembrane protein 70, putative	At5g10840	74418	8.2	10	103	-	UNC	UNK	n i	n i	n i
Endomembrane protein 70, putative	At4g12650	59670	5.9	10	39	-	UNC	UNK	21	n i	n i
Endomembrane protein 70, putative	At3g13772	74185	8.7	9	59	-	UNC	UNK	n i	n i	n i
Endomembrane protein 70, putative	At2g01970	68005	6.7	9	71	-	UNC	UNK	n i	n i	n i
Transmembrane protein-related (TOM1)	At4g21790	32988	8.7	7	72	73	UNC	UNK	n i	n i	n i
Putative drought-induced protein	At1g53210	63376	5.2	10	703	574	UNC	UNK	28	n i	88
Early-responsive to dehydration stress protein (ERD4)	At1g30360	81883	9.3	10	225	121	UNC	UNK	n i	n i	64
Putative outer envelope protein	At3g46740	89133	8.9	b	151	-	Omp IP	UNK	n i	n i	n i
Porin, putative	At5g67500	29577	8.9	b	155	-	MPP	UNK	n i	n i	n i
Porin, putative	At3g01280	29407	8.8	b	356	-	MPP	UNK	n i	29	103
Porin, putative, Voltage-dependent anion-selective channel protein	At5g15090	29193	7.9	b	464	-	MPP	UNK	n i	35	99
Porin	At3g20000	34250	6.8	b	177	-	MPP	UNK	n i	n i	n i

II.1.2 - Autres protéines

II.1.2.1 - Protéines de types Band 7

Les analyses protéomiques ont également révélé la présence de protéines appartenant à la famille des Band 7. Les membres de cette famille se caractérisent par la présence d'un domaine *Stomatin Prohibitin Flotilin Hbc* (SPFH). De façon très intéressante, 11 d'entre elles, sur 19 annotées dans le génome, ont été identifiées dans la fraction membranaire vacuolaire. La co-purification de ces protéines avec la fraction membranaire après traitement salin (voir Matériels et Méthodes) suggère leur liaison forte à la membrane, ce qui est appuyé par la prédiction d'un domaine transmembranaire ou d'un site de myristoylation pour 9 d'entre elles (Tableau VII). Le domaine SPFH est caractéristique des prohibitines et des stomatines, qui ont un rôle probable dans le cycle cellulaire ou la régulation de canaux ioniques. Ces protéines pourraient aussi contrôler des processus importants au sein de fonctions membranaires diverses, et sont, par exemple, retrouvées au niveau des rafts lipidiques. La présence de plus de 50 % des membres de cette famille dans la fraction membranaire de la vacuole est tout à fait surprenante, et suggère leur aspect fondamental, sans doute dans la régulation d'activités de transport ou de mouvement des membranes.

Tableau VII : Protéines à domaine SPFH identifiées dans la vacuole. Les scores et couvertures obtenues par l'analyse après électrophorèse sont spécifiés, ainsi que les scores de Carter et al. (2004) (*C*) et les couvertures de Shimaoka et al. (2004) (*Sh*). DTM ou MPT : Nombre de domaines transmembranaires ou type de modification post-traductionnelles.

Nom	Locus	DTM ou MPT	Score	Cov (%)	<i>C</i>	<i>Sh</i>
Band 7 family protein	At2g03510	1	328	18	-	-
Band 7 family protein	At3g01290	N-myristoylation	269	23	-	12
Band 7 family protein	At5g51570	N-myristoylation	495	39	298	39
Band 7 family protein	At5g62740	N-myristoylation	641	55	237	29
Band 7 family protein	At1g69840	N-myristoylation	214	18	98	14
Expressed protein	At5g25250	N-myristoylation	183	7	-	-
Prohibitin	At5g40770	N-myristoylation	473	38	109	24
Prohibitin, putative	At4g28510	-	373	30	-	7
Prohibitin, putative	At1g03860	N-myristoylation	305	22	-	8
Prohibitin, putative	At3g27280	-	457	38	-	10

II.1.2.2 - Autres protéines

Plusieurs protéines à domaines transmembranaires dont les fonctions sont inconnues ont été localisées à la vacuole. C'est en particulier le cas de la protéine At1g21680, similaire à la protéine bactérienne tolB. Chez les bactéries gram-négatives, cette dernière a été caractérisée comme étant impliquée dans la stabilité des parois de peptidoglycanes, et la cohésion de celles-ci avec les membranes internes et externes (Lazzaroni *et al.*, 2002). Elle intervient dans un complexe, formé des protéines PAL (membrane externe), TolA (periplasme) et TolR / TolQ (membrane interne), dont on ne connaît pas d'homologues chez *Arabidopsis*. Ce complexe peut également, de façon occasionnelle, servir de porte d'entrée à certaines colicines. La présence de cette protéine dans le tonoplaste pourrait être nécessaire aux processus de remaniement ou de biogenèse de la membrane vacuolaire, souvent décrits dans la littérature mais pour lesquels peu d'acteurs protéiques sont connus. Ce type de processus pourrait également faire intervenir une protéine de type Niemann-Pick C1. Cette glycoprotéine à 13 domaines transmembranaires, initialement identifiée à partir des endosomes de cellules de mammifères, n'a pas de rôle connu, mais pourrait être impliquée dans des activités de transport, et / ou dans des phénomènes de docking ou de fusion membranaire.

II.2 - Localisation *in vivo* de protéines fusionnées à la GFP

Les analyses réalisées par spectrométrie de masse ont abouti à l'identification d'un nombre important de protéines peu caractérisées expérimentalement et dont la présence dans la vacuole n'était pas connue. Afin de confirmer leur localisation *in planta*, 6 protéines ont fait l'objet de constructions de fusion traductionnelle avec la *Green Fluorescent Protein* (GFP) placée en Nter :

- Une aquaporine (témoin de localisation tonoplastique TIP2.1, At3g16240)
- Une protéine à 12 domaines transmembranaires (transporteur de sucre putatif, At1g19450)
- Une lipocaline (At5g58070)
- Une protéine de type Band 7 (At1g69840)
- Une enzyme de la voie de biosynthèse des brassinostéroïdes (DWARF1, At3g19820)
- Une enzyme du catabolisme des caroténoïdes (CCD1, At3g63520)

Ces protéines ont été sélectionnées sur la base de leur disponibilité en système Gateway et de leur diversité fonctionnelle (transport, synthèse et catabolisme). Un second témoin de localisation tonoplastique, constitué de la construction Nramp3::GFP (pNB96, obtenu auprès de Sébastien Thomine, Thomine *et al.*, 2003), a également été utilisé.

II.2.1 - Transformation transitoire de cellules de tabac

La Figure 14-A présente une cellule de tabac exprimant la protéine de fusion NRAMP3::GFP, observée en microscopie confocale (Figure 14-A1) et par microscopie en transmission (Figure 14-A2). La superposition des deux images (Figure 14-A3) permet de constater que la paroi vacuolaire épouse le contour de la cellule, ce qui est cohérent avec la présence d'une vacuole principale, turgescente, pouvant représenter jusqu'à plus de 90% de volume cellulaire.

Les 6 constructions testées ont été exprimées de façon transitoire en cellule de tabac. La fluorescence alors observée marquant les contours des cellules, la localisation des protéines correspondantes pouvait donc être vacuolaire mais également plasmalemmique ou cytosolique, le cytoplasme étant comprimé entre la vacuole et la membrane plasmique. Les profils de fluorescence observés ont alors été comparés aux profils obtenus après transformation de cellules par un témoin de localisation cytosolique Glucuronidase::GFP (GUS::GFP, Figure 15-A). La fluorescence cytosolique est aisément reconnaissable à la présence d'amas de fluorescence plus ou moins importants sur le pourtour de la cellule (Figure 15-A1 et A3 à A5). En outre, la mise au point du focus dans l'épaisseur de la zone de fluorescence permet de deviner les impacts des différents organites dans le cytosol, conduisant à une certaine hétérogénéité de fluorescence (Figure 15-A2) comparé à celle observable dans le cas d'une localisation membranaire, obtenue avec la construction GFP::TIP par exemple (Figure 15-B2). Cette fluorescence particulière a pu être observée pour toutes les constructions, attestant d'un marquage membranaire, et non cytosolique, pour l'ensemble des protéines étudiées (Figure 15-B1 à G1 et B2 à G2).

L'observation des cellules transformées avec la construction Nramp3::GFP (Figure 14) met aussi en évidence, pour les plus grandes d'entre elles, un certain nombre de « segments » qui traversent la vacuole pour relier entre eux deux côtés opposés du tonoplaste. Ceux-ci sont plus facilement visualisables sur des reconstitutions de vacuole entière, réalisées à partir de plusieurs clichés de microscopie confocale (Figure 14-B). La Figure 14-B3, en particulier, correspond à une section d'environ 21 μm d'épaisseur dans la vacuole sur laquelle il est possible d'observer distinctement les travées, représentées plus en détail dans la Figure 14-B4. Ce type de structure est spécifiquement vacuolaire, et a été précédemment décrit (Reisen *et al.*, 2005). Une seconde structure, correspondant à l'empreinte du noyau sur le tonoplaste, confirme encore la localisation tonoplastique de la fluorescence. Cet impact est observable après reconstruction tridimensionnelle (Figure 14-B6 et B7) mais également, bien que dans une moindre mesure, sur les images bidimensionnelles (Figure 14-B8 et B9). Ces motifs particuliers de fluorescence ont été recherchés pour l'ensemble des constructions, et mis en évidence pour 5 d'entre elles : la TIP (Figure 15-B3 à B5), DWF1 (Figure 15-C3 à C5), la protéine de type band 7 (Figure 15-D3 à D5), la lipocaline (Figure 15-F3 à F5) et CCD1 (Figure 15-G3 à G5), excluant une éventuelle localisation à la membrane plasmique pour ces protéines.

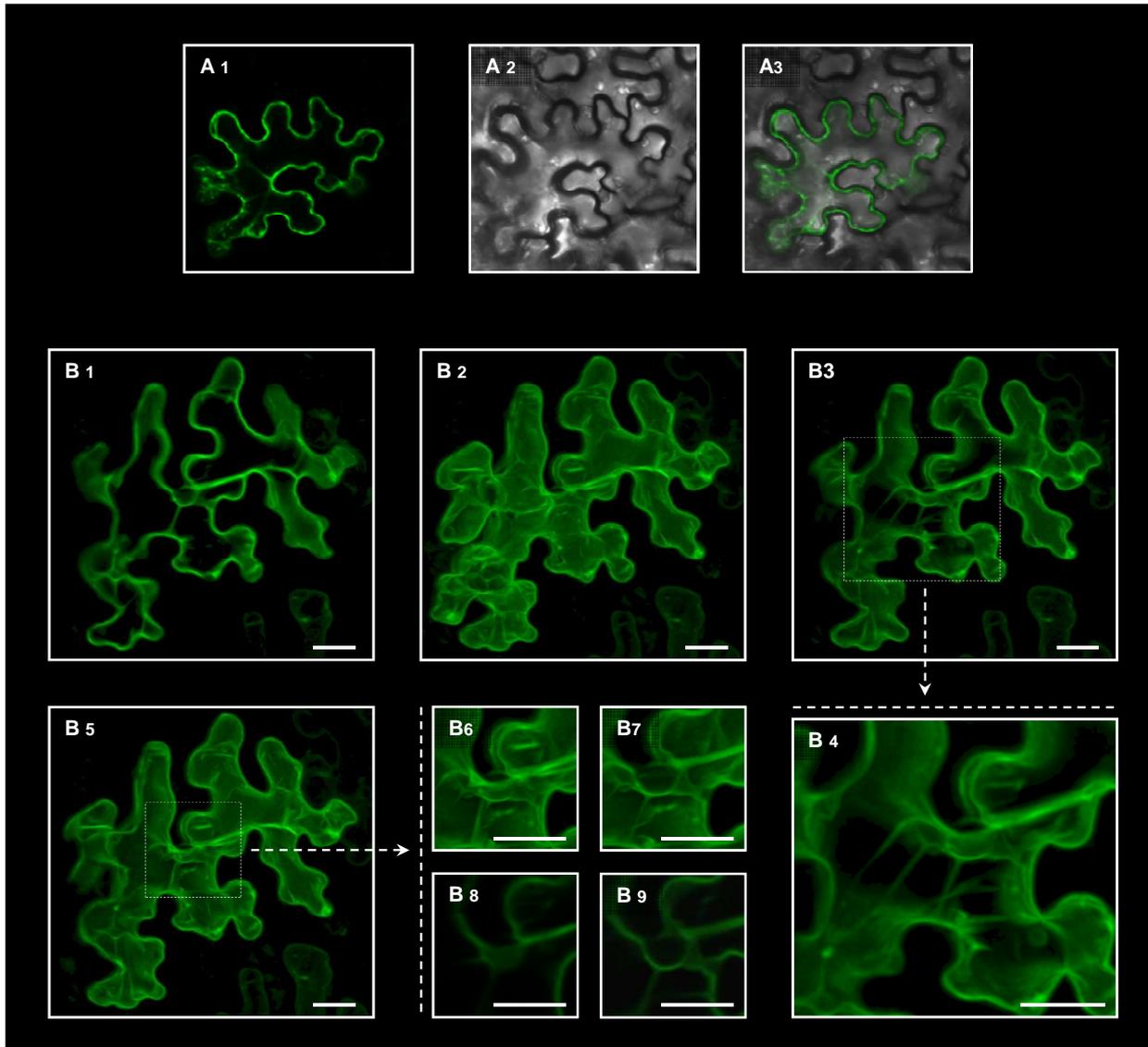


Figure 14 : Cellules épithéliales de tabac transformées de façon transitoire, via *Agrobacterium*, avec la construction *Nramp3::GFP*. (A) : Cellule de tabac observée par microscopie confocale (A1), en transmission (A2), et superposition des images (A3). (B) : Cellule de tabac observée en microscopie confocale. Un total de 39 acquisitions, sur environ 57 μm de hauteur, a été réalisé (B1 : acquisition à $z = 22,6 \mu\text{m}$), et a permis de réaliser une reconstitution tridimensionnelle de la vacuole (B2 à B7). Cette reconstitution permet de visualiser les travées vacuolaires, en particulier lorsque la vacuole est représentée sur une fraction de son épaisseur (B3 : $\Delta z = 21,1 \mu\text{m}$; B4 : détail agrandi de l'image B3). Ce type de représentation permet également d'observer l'empreinte du noyau sur la membrane vacuolaire (B5 à B9), visible en détail sur la représentation 3D (B6 : $\Delta z = 33,1 \mu\text{m}$; B7 : $\Delta z = 28,6 \mu\text{m}$) et, dans une moindre mesure, sur certaines images 2D (B8 : $z = 33,1 \mu\text{m}$; B9 : $z = 28,6 \mu\text{m}$). La barre indique une longueur de 30 μm .

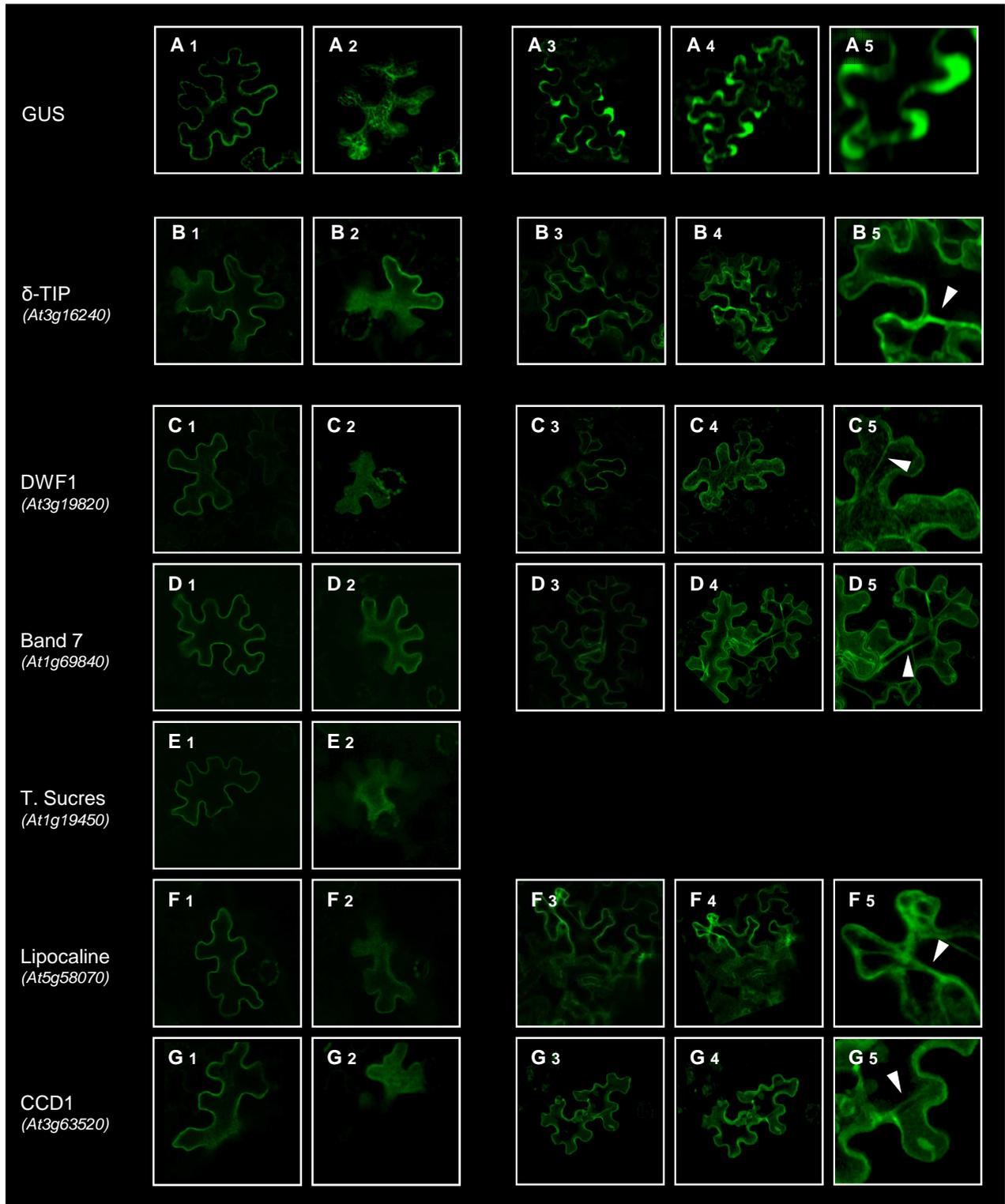


Figure 15 : Cellules épithéliales de tabac transformées de façon transitoire avec les constructions : (A) : *GUS::GFP* (témoin de localisation cytosolique) ; (B) : *GFP::TIP2.1* (At3g16240 – témoin de localisation vacuolaire) ; (C) : *GFP::DWF1* (At3g19820) ; (D) : *GFP::At1g69840* ; (E) : *GFP::At1g19450* ; (F) : *GFP::At5g58070* ; (G) : *GFP::CCD1* (At3g63520), et observées en microscopie confocale. Dans les deux cas de localisation, cytosolique et vacuolaire, le marquage est périphérique (1). Il est toutefois irrégulier dans le cas d'un marquage cytosolique (A1, A3 à A5), et régulier dans le cas d'un marquage vacuolaire (B1) et pour l'ensemble des constructions testées (C1 à G1). Lorsque la mise au point est réalisée dans l'épaisseur de la zone fluorescente (2), la marquage cytosolique (A2) est hétérogène et laisse apparaître les impacts des organites, alors que l'on retrouve un marquage homogène dans le cas d'une localisation tonoplastique des protéines

*chimères (B2), ainsi que pour les 5 constructions testées (C2 à G2). Le marquage tonoplastique fait également apparaître des travées vacuolaires à l'intérieur des plus grosses cellules, visibles pour le témoin de localisation tonoplastique (B3) sur certaines images, et plus distinctement sur les reconstruction 3D réalisées à partir des clichés confocaux (B4 ; B5). Ces structures particulières ont été retrouvées pour quatre constructions testées : GFP::*DWF1* (C3 à C5), GFP::*At1g69840* (D3 à D5), GFP::*At5g58070* (F3 à F5), GFP::*CCD1* (G3 à G5). Les flèches indiquent les travées vacuolaires.*

II.2.2 - Transformation transitoire de protoplastes

De façon surprenante, aucune cellule exprimant la construction GFP::transporteur de sucres putatif (*At1g19450*) n'a présentée de travées vacuolaires. Bien que, en dehors de cette particularité, les profils de fluorescence observés pour cette construction soient tout à fait comparables à ceux obtenus avec les autres constructions, nous avons souhaité confirmer plus avant sa localisation. Pour cela, nous avons procédé à la transformation transitoire de protoplastes de cellules en culture avec le vecteur exprimant GFP::*At1g19450*, mais également avec la construction GFP::lipocaline, pour laquelle nous avons pu noter une certaine hétérogénéité dans les profils de fluorescence observés. La Figure 16-A présente un protoplaste transformé avec le vecteur codant GFP::*At1g19450*, observé en transmission (Figure 16-A1) et en microscopie confocale (Figure 16-A2). La superposition des deux images (Figure 16-A3) confirme sans ambiguïté le marquage du tonoplaste, et donc la localisation vacuolaire de ce transporteur. De façon intéressante, les protoplastes exprimant la construction GFP::lipocaline (Figure 16-B et C) présentent quant à eux un profil de fluorescence qui ne semble pas exclusivement vacuolaire (Figure 16-B1 à B3), l'observation d'une vacuole libérée d'un protoplaste lysé mettant néanmoins en évidence le marquage sans équivoque du tonoplaste (Figure 16-C1 à C3).

II.3 - Conclusion

Le travail d'analyse protéomique que nous avons réalisé a débouché sur l'identification de 420 protéines membranaires ou associées à la membrane de la vacuole (Jaquinod *et al.*, 2007b; Jaquinod *et al.*, 2007a), constituant l'étude la plus complète effectuée à ce jour sur le protéome tonoplastique. Les analyses effectuées par Sazuka *et al.* (2004), Szponarski *et al.* (2004) et Shimaoka *et al.* (2004) avaient débouché, respectivement, sur l'identification de 34, 72 et de 163 protéines dans la fraction membranaire, et les travaux de Carter *et al.* (2006) sur les protéomes membranaires et solubles avaient conduit à l'identification de 402 protéines. Plus récemment, un travail original de localisation sub-cellulaire de protéines membranaires par tag isotopique a permis

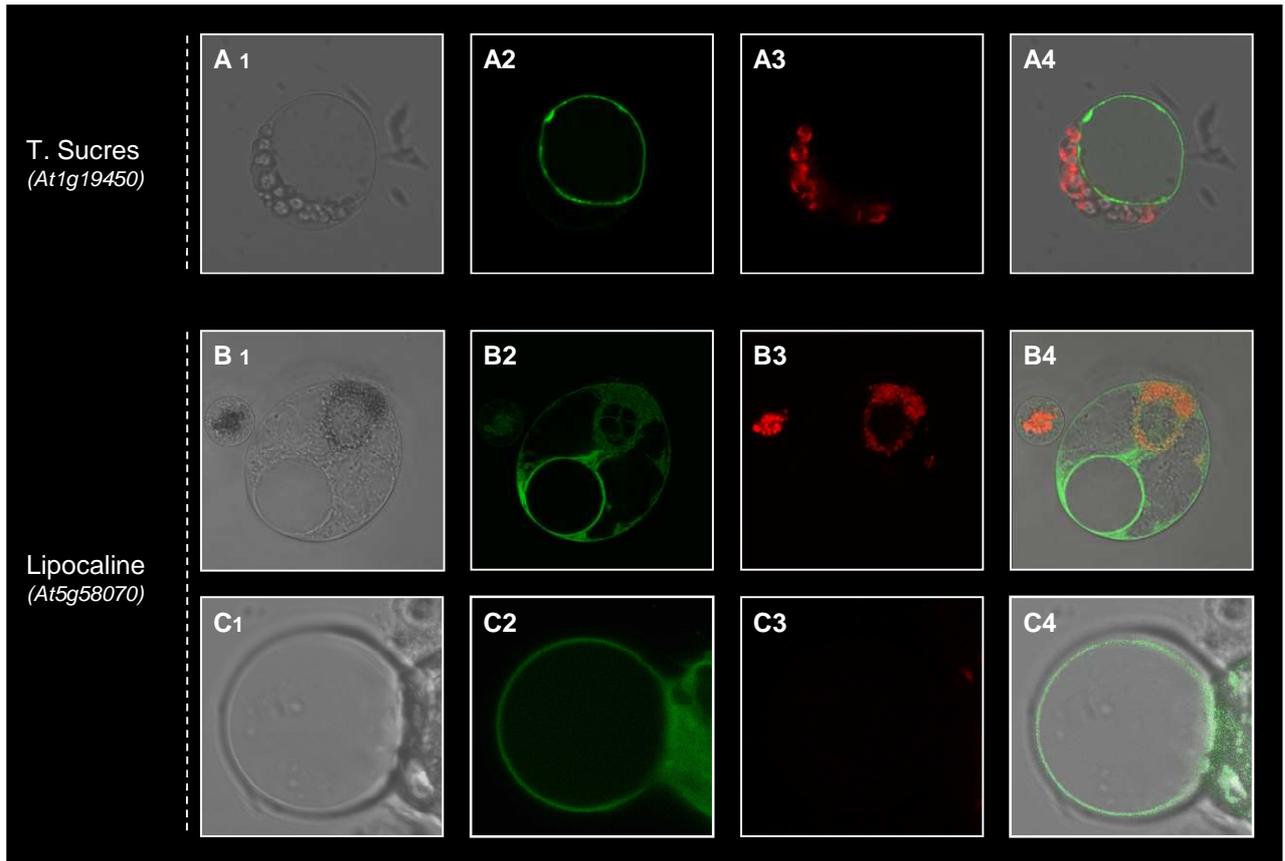


Figure 16 : *Protoplastes de cellules en culture d'Arabidopsis thaliana transformées de façon transitoire observés en microscopie en transmission (1), et en microscopie confocale pour l'observation de la GFP (2) et de la chlorophylle (3) en acquisition séquentielle. (4) : superposition des images. (A) : GFP::At1g19450, (B) : GFP::At5g58070, (C) : GFP::At5g58070 (détail d'une vacuole). Si le marquage est exclusivement tonoplastique pour la construction GFP::At1g19450 (transporteur de sucres putatif ; A4), il semble que ce ne soit pas le cas pour la construction GFP::At5g58070 (lipocaline ; B4), bien que le marquage tonoplastique soit confirmé (C4).*

d'assigner 24 protéines à la vacuole (Dunkley *et al.*, 2006)¹, et deux études réalisées sur des fractions enrichies en tonoplaste d'orge (Endler *et al.*, 2006) et sur des vacuoles intactes de chou-fleur (Schmidt *et al.*, 2007) ont abouti à l'identification de 88 et 316 protéines respectivement.

L'utilisation d'une méthode originale d'oxydation des échantillons protéiques, associée à une analyse des protéines majoritaires directement en solution dans du méthanol, sans fractionnement préalable par électrophorèse sur gel d'acrylamide, ont notamment permis

¹ A l'inverse des autres travaux mentionnés, ceux de Dunkley *et al.* (2006) avaient pour objectif d'identifier la localisation subcellulaire de plusieurs protéines membranaires après séparation de fractions microsomales par ultracentrifugation, et ne constituaient donc pas une étude spécifiquement tonoplastique : Les microsomes, séparés sur gradient d'iodixanol, sont récoltés en plusieurs fractions correspondant à des densités différentes. Les protéines de chaque fraction sont alors digérées à la trypsine, et les peptides résultants marqués avec l'iTRAQ, un réactif présent sous 4 formes (114, 115, 116, 117) isobariques (donc identiques en mode MS), mais différenciables en mode MS/MS. Les fractions, chacune marquée avec une forme différente d'iTRAQ, sont ensuite rassemblées pour en identifier le contenu en une seule analyse, et il est alors possible, pour chaque protéine identifiée, d'en connaître la répartition à travers les fractions. Une analyse statistique en composantes principales permet alors de générer des clusters de protéines, au sein desquels certaines, dont la localisation sub-cellulaire est bien connue, permettent d'affecter une localisation à l'ensemble du cluster (Sadowski *et al.*, 2006).

d'identifier 110 transporteurs, dont 60 n'avaient pas été mis en évidence par les précédentes études. Cette classe de protéines est particulièrement intéressante dans le cadre d'une recherche des éléments impliqués dans la séquestration vacuolaire des métaux lourds, et le fait que nous soyons capable de suivre, par spectrométrie de masse, près de 90 % (110 / 123) des transporteurs localisés au tonoplaste par cette approche est un atout important pour la suite que nous souhaitons donner à ce travail. La confirmation de la localisation *in vivo* d'une part des protéines identifiées est un aspect relativement peu pris en compte dans les études protéomiques vacuolaires publiées puisque seule celle de Schmidt *et al.* (2008) comprend ce type de travail. Nous avons pu confirmer la localisation de 6 protéines identifiées dans la fraction membranaire de la vacuole, l'ensemble de ce premier travail d'analyse validant la méthode de purification de vacuoles qui a été mise en place. Il permet en particulier de confirmer l'absence de contaminations majeures par d'autres organites, les identifications protéiques ne faisant pas apparaître les protéines majoritaires du chloroplaste (protéines de la chaîne de transfert des électrons par exemple), de la mitochondrie (complexes respiratoires), ou du plasmalemma (aquaporine de type PIP, *Plasmalemma Intrinsic Protein*).

Toutefois la mise en évidence de fonctions vacuolaires particulières, reliées à la détoxification métallique ou non, nécessite une vision globale de l'ensemble des protéines de cet organite. Nous avons donc complété le travail effectué sur les fractions membranaires par une analyse de la fraction soluble de la vacuole, regroupant les protéines strictement solubles et les protéines associées de façon transitoire au tonoplaste.

III - Analyse du protéome soluble de la vacuole

Suite à l'identification des protéines majeures de la fraction membranaire des vacuoles purifiées, nous nous sommes intéressés aux constituants de la fraction soluble et associée aux membranes (Figure 17). Cet aspect de la protéomique vacuolaire (fraction soluble) est moins détaillé dans la littérature que l'analyse des protéines tonoplastiques, probablement à cause des difficultés pour obtenir des organites intacts.

L'étude de la composition protéique membranaire, présentée précédemment, a été réalisée sur des fractions de membranes obtenues après « décrochage » des protéines solubles associées (incubation en présence de 500 mM de NaCl). Cette étape de « lavage » a permis de diminuer la complexité protéique de la fraction membranaire, plus délicate à analyser, mais également d'augmenter, dans la fraction soluble, la quantité des protéines en équilibre entre une forme « libre » et une forme « associée au tonoplaste », facilitant l'identification de celles-ci.

Pour leur identification par spectrométrie de masse, les protéines contenues dans la phase soluble ont été soumises à une courte électrophorèse, puis la piste de migration divisée en 15 parties. La digestion trypsique a alors été réalisée comme décrite précédemment, et les peptides résultants chargés sur une colonne chromatographique (nanoLC). L'élution séquentielle de ces

peptides tryptiques vers le spectromètre de masse a alors permis d'identifier les peptides contenus dans chacun des morceaux de gel, conduisant à établir une liste de 371 protéines vacuolaires ou associées aux vacuoles. Ce travail d'identification a été réalisé par Michel Jaquinod et Lauriane Kuhn du Laboratoire d'Etude de la Dynamique des Protéomes du CEA-Grenoble. Les protéines identifiées ont été réparties en 10 catégories fonctionnelles (Figure 18), sur la base de celle proposée par le MIPS (*Munich Information center for Protein Sequences* – <http://mips.gsf.de>).

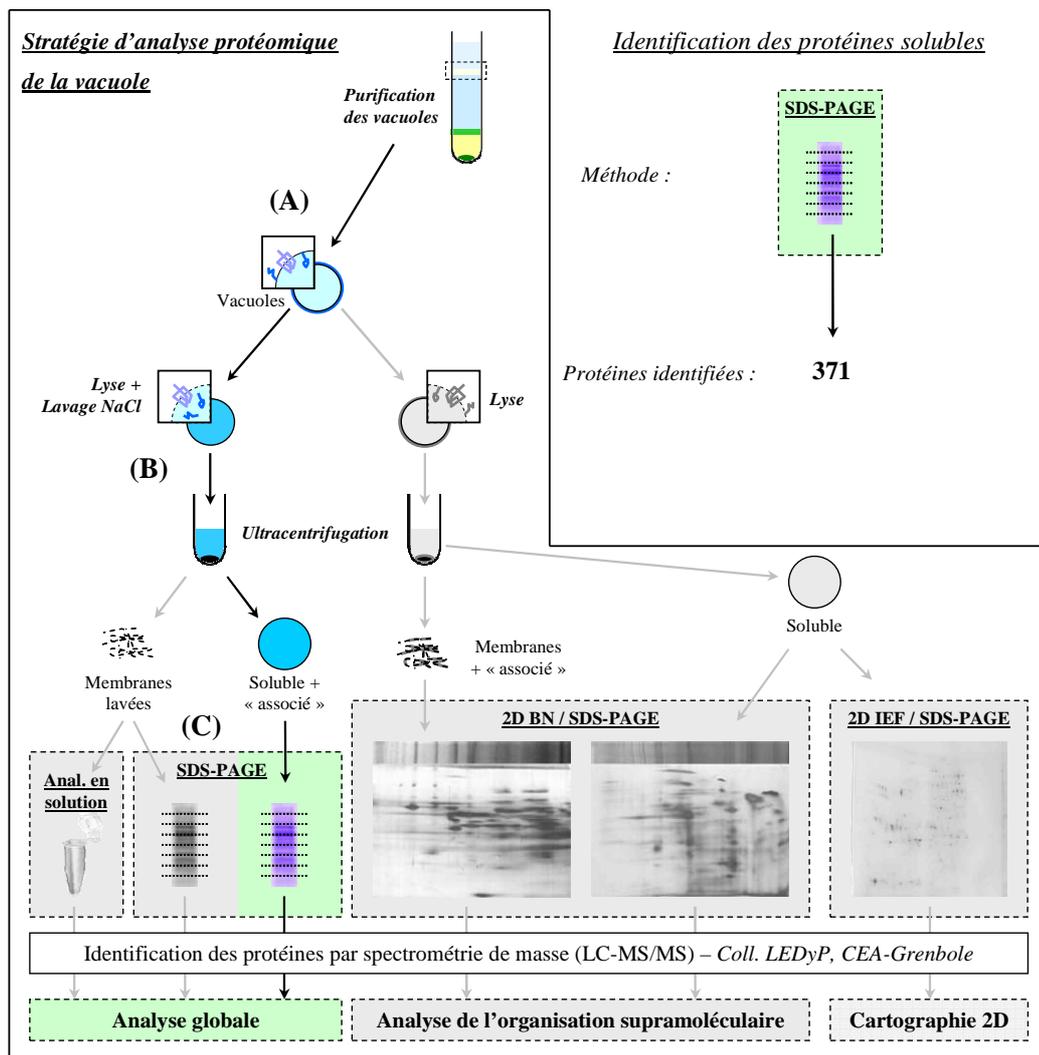


Figure 17 : Analyse par spectrométrie de masse de la composition protéique de la fraction soluble de vacuoles d'*Arabidopsis thaliana*. Les vacuoles purifiées (A) ont été lysées par congélation / décongélation puis centrifugées en présence de 500 mM de NaCl (B). 40 µg de protéines de la fraction soluble ainsi isolée ont alors été séparés par électrophorèse (SDS-PAGE, 12% d'acrylamide, 2,5 cm de migration) puis divisé en 15 fractions analysées chacune par nanoLC-MS/MS. Cette approche a conduit à l'identification de 371 protéines.

Les hydrolases, impliquées dans les processus de dégradation et de recyclage des composés cellulaires, représentent environ un tiers des protéines identifiées, et se répartissent entre protéases, glycosidases, lipases et nucléases. D'autres fonctions cellulaires majeures telles que la réponse au stress / défense contre les pathogènes ou la signalisation cellulaire constituent également une part importante des protéines identifiées (respectivement 13 et 11 % du protéome). Les activités de transport et de stockage, particulièrement mises en évidence dans le protéome membranaire à travers la présence de 110 transporteurs, sont logiquement moins représentées dans le protéome soluble où elles ne concernent que 8 % des identifications (sous-unités de la V-ATPase, protéines de liaison aux métaux : ferritines, protéine de liaison au Zn ...). Le métabolisme primaire (glycolyse, cycle des acides tricarboxyliques et synthèse des acides aminés) est quant à lui relativement présent puisque 60 enzymes de cette catégorie ont été retrouvées dans les analyses effectuées. Certaines enzymes impliquées dans le métabolisme secondaire (synthèses d'alcaloïdes, maintenance de la paroi cellulaire ...) sont également représentées. Enfin, 33 protéines (soit 6 % du protéome soluble) n'ont pas été classées. Une part d'entre elles (13 protéines) correspond aux gènes annotés « expressed protein », qui n'ont ni fonction ni motif structuraux connu à ce jour. D'autres possèdent des domaines particuliers (liaison aux acides nucléiques par exemple) ou un profil d'expression connu (réponse à l'auxine) mais n'ont pas de fonction identifiée.

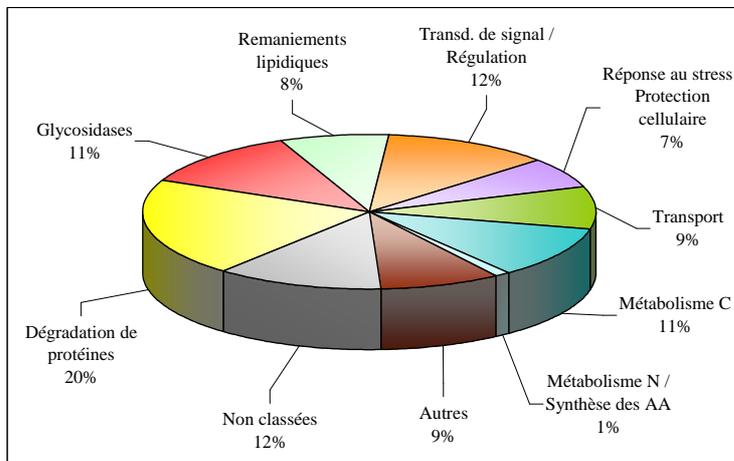


Figure 18 : *Catégories fonctionnelles représentées dans le protéome soluble des vacuoles. La nomenclature est issue du MIPS, la catégorie fonctionnelle de chacune des protéines ayant été ensuite confirmée, et éventuellement modifiée, grâce au site web TAIR.*

III.1 - Protéines à activité hydrolytique

Les enzymes impliquées dans la dégradation des divers composés (peptides, carbohydrates, lipides ou acides nucléiques par exemple) représentent plus de 30% de l'ensemble des protéines identifiées. Elles constituent la catégorie fonctionnelle la plus importante du protéome vacuolaire et mettent particulièrement en évidence la faculté de cet organe à recycler l'ensemble des constituants cellulaires en fonction de la demande physiologique.

III.1.1 - Protéases

Les protéases sont les principales hydrolases de la vacuole. Soixante cinq protéines identifiées peuvent être rattachées à cette catégorie, qu'il s'agisse de protéases (regroupées en plusieurs familles) ou de protéines participant à la régulation des activités protéolytiques (ubiquitine ou inhibiteurs).

L'analyse du génome d'*Arabidopsis* permet de prédire 818 protéases (base de données MEROPS, <http://merops.sanger.ac.uk/>, Rawlings *et al.*, 2008), correspondant à un peu plus de 2,5% du protéome potentiel (*via* l'annotation du génome) de cet organisme. Celles-ci sont classées en fonction de leur site catalytique et réparties en 5 classes majeures : métalloprotéases (M), protéases à acide aspartique (A), protéases à sérine (S), protéases à cystéine (C) et protéases à thréonine (T). Ces 5 catégories sont représentées dans le protéome vacuolaire.

III.1.1.1 - Protéases à acide aspartique (famille A)

Les protéases à acide aspartique sont présentes chez tous les organismes, depuis les vertébrés jusqu'aux virus, en passant par les plantes et les bactéries (Dunn, 2002 ; Davies, 1990 ; Hill & Phylip, 1997). Chez les plantes, ces enzymes possèdent deux résidus aspartiques responsables de leur activité (Rawlings & Barrett, 1995) et un insert spécifique des protéases à aspartate de plantes (*Plant Specific Insert*, PSI). Similaire à certaines saposines (protéines activatrices des lipases), ces PSI n'ont, à ce jour, aucun rôle connu (Simoes & Faro, 2004). Suivant l'espèce considérée, ces enzymes sont actives sous forme simple-chaine (riz, tabac ...) ou double-chaine (maïs, *Arabidopsis* ...), les conditions de cette activation par protéolyse n'ayant toutefois pas été établies. D'une manière générale, les protéases à acide aspartique interviennent dans les mécanismes de maturation et de dégradation des protéines, mais aussi dans les processus de sénescence, de réponse au stress, de mort cellulaire programmée ou encore de reproduction (Simoes & Faro, 2004). Elles sont également connues pour être majoritairement vacuolaires (Ramalho-Santos *et al.*, 1997).

Deux protéases de cette famille, et deux autres putatives, ont été identifiées et sont présentées dans le Tableau VIII. Trois d'entre elles font partie de la sous-famille A1, majoritaire chez les plantes. La quatrième, prédite (At3g13235), présente quant à elle un intérêt tout particulier car elle possède un motif (pfam 001995) qui la rapproche de la sous-famille A2 des protéases à acide aspartique (Figure 19). Connue chez certains virus (VIH par exemple), les bactéries, les champignons et les mammifères, ce type de protéase, également appelée rétropepsine, n'avait jamais été mis en évidence chez les plantes.

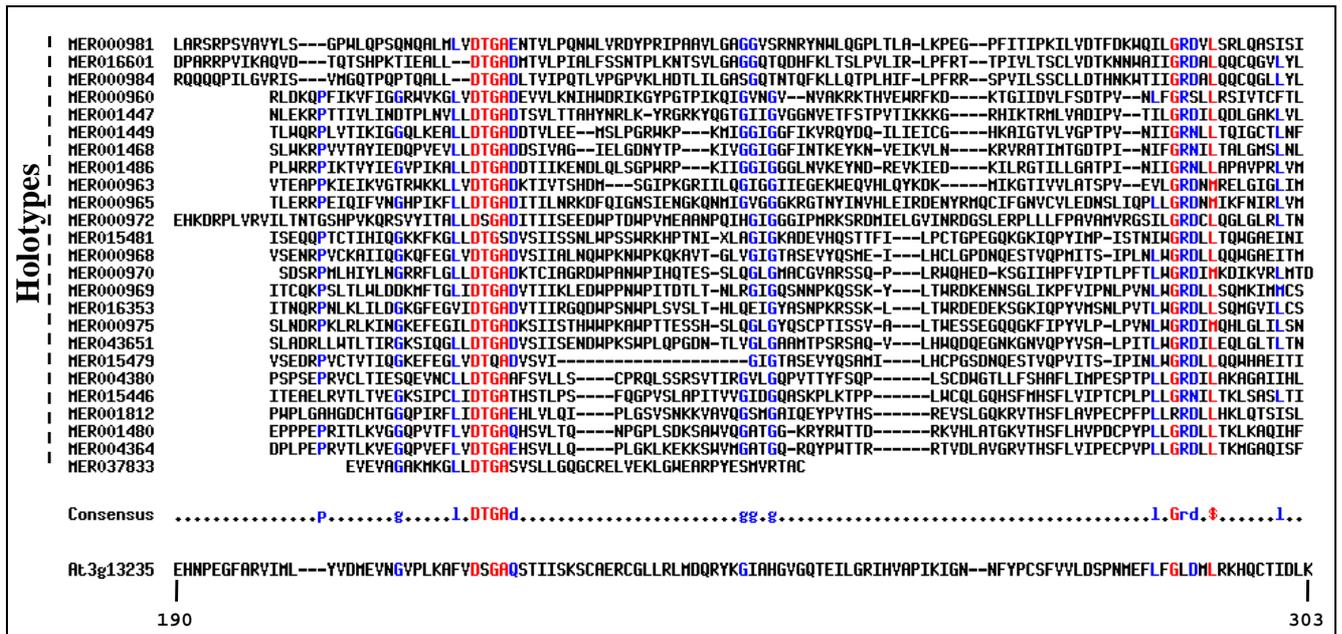


Figure 19 : Identification d'un motif de type A2 (protéases à acide aspartique 2) chez une protéine identifiée dans la vacuole. Les protéines holotypes obtenues à partir de la base de données MEROPS permettent d'établir une séquence consensus caractéristique des peptidases A2, retrouvée en grande partie chez la protéine At3g13235. Cette protéine serait la seule protéase de type A2 identifiée à ce jour chez les plantes.

III.1.1.2 - Protéases à sérine (famille S)

Contrairement aux protéases à acide aspartique ou aux métalloprotéases, les protéases à sérine (de même que les protéases à cystéine) forment un complexe covalent enzyme-substrat lors de l'hydrolyse des peptides. Ubiquitaires, elles ont été identifiées dans les racines, les feuilles, les graines ou les fruits, et interviennent dans des fonctions physiologiques très diverses : *turnover* des protéines, sporogénèse, développement des stomates, sénescence, vascularisation, réponse au stress ou encore symbiose (Antao & Malcata, 2005). La famille la plus représentée dans nos extraits est la famille 10, correspondant aux Serine CarboxyPeptidase-Like (SCPL). Six d'entre elles, sur 51 prédites dans le génome d'Arabidopsis, ont été identifiées dans la fraction vacuolaire soluble. Ces protéases sont très souvent impliquées dans la production de métabolites secondaires dédiés à la protection de la plante contre les herbivores ou les UV (Lehfeldt *et al.*, 2000), et possèdent des profils d'expression assez spécifiques des différents tissus de la plante (Fraser *et al.*, 2005). De façon intéressante, trois des six protéines de cette famille identifiées (SCPL3, SCPL 29 et SCPL 49) présentent un niveau d'accumulation d'ARNm, évalué par RT-PCR (Fraser *et al.*, 2005), quasiment indétectable quelque soit le tissu considéré, alors que leur score MASCOT sont relativement importants (respectivement 37, 129 et 140, Tableau VIII).

Une autre catégorie de protéases fortement représentée est la famille des *Subtilisin-like Serine Proteases*, ou subtilases, dont 3 (sur 56 codées dans le génome, Rautengarten *et al.*, 2005) ont été identifiées au cours de notre travail. Ces protéines possèdent également des fonctions très diverses, et l'une d'entre elles, ARA12, a été décrite comme étant réprimée par les stress, notamment le stress cadmium (Gollack *et al.*, 2003). La raison physiologique de cette régulation n'est pas connue mais les auteurs suggèrent qu'elle pourrait prendre part à la cascade de signalisation via l'hydrolyse d'un peptide signal. Ce type de réponse est d'ailleurs décrit chez la tomate, où la libération de la systémine est due à l'action d'une subtilase (Schaller & Ryan, 1994). Une autre subtilase, la TriPeptidylPeptidase II (TPPII, At4g20850), peut quant à elle être associée au protéasome, et joue un rôle dans la dégradation des protéines (Book *et al.*, 2005). L'identification de cette protéine est particulièrement intéressante. Décrite pour être cytosolique, elle a été identifiée ici avec un score MASCOT très important (4786, soit le plus haut score associé à une protéine dans nos analyses), ce qui soulève la question d'une éventuelle contamination des vacuoles par des protéines cytosoliques, associées de façon non spécifique au tonoplaste. Cependant, considérant le score MASCOT considérable associé à cette protéine, il est également probable que celle-ci soit spécifiquement associée au tonoplaste, suggérant un mécanisme, inédit chez *Arabidopsis thaliana*, de coopération directe entre une peptidase cytosolique et la vacuole.

III.1.1.3 - Métalloprotéases (famille M)

Le génome d'*Arabidopsis* compte 81 gènes prédits ou connus pour coder des métalloprotéases, dont le site catalytique est constitué d'un ou plusieurs atomes métalliques. Ces enzymes, exo ou endopeptidases, sont peu caractérisées, notamment du point de vue de leur localisation. Ce travail en assigne 11 à la vacuole. Parmi celles-ci, 6 coordonnent un ou plusieurs atomes de zinc (familles M1, M3, M14, M16, M28), les autres n'ayant pas de site catalytique connu, à l'exception de la famille M24 dont certains représentants bactériens ont un site catalytique constitué de deux atomes de cobalt ou de manganèse.

Parmi les métalloprotéases les plus abondantes (estimation d'après le score MASCOT), les leucine-aminopeptidases (LAP - famille M17) catalysent l'hydrolyse d'un résidu leucine en position amino-terminale d'une protéine. Cette sous-famille dont la fonction est particulièrement liée à la défense cellulaire (Matsui *et al.*, 2006), se caractérise par l'existence de deux types de protéines qui se distinguent par leur point isoélectrique : neutre ou acide (LAP-N et LAP-A, respectivement ; Gu *et al.*, 1996). Seules des protéases de type LAP-N ont été retrouvées dans nos extraits (LAP1 et LAP3, Tableau VIII), la troisième protéine de cette sous-famille (LAP2) n'ayant pas été identifiée. Prédites pour être cytosoliques, les LAP1 et 3 ont été assignées, par des analyses par spectrométrie de masse, à d'autres compartiments tels que la membrane plasmique (LAP1 - Alexandersson *et al.*, 2004) et le plaste (LAP3 - Zybailov *et al.*, 2008). Il est toutefois intéressant de noter que les travaux

de Shimaoka *et al.* (2004) ont également conduit à leur identification dans la vacuole, avec des couvertures relativement importantes (respectivement 25 % pour LAP1 et 12 % pour LAP3).

III.1.1.4 - Protéases à thréonine (famille T)

Sur les 14 protéases à thréonine identifiées, 13 sont des sous-unités du protéasome. Huit isoformes de la sous-unité alpha et 5 de la sous-unité beta ont été retrouvées dans la fraction soluble de la vacuole, indiquant une co-purification de ce complexe protéolytique avec les vacuoles. L'identification de deux protéines liées à la famille des ubiquitines (une ubiquitine : At1g31340, et une protéine de fusion à l'ubiquitine : At2g21270, Tableau VIII) est particulièrement intéressante. Elle pourrait confirmer que certains processus de la voie de dégradation ubiquitine-protéasome pourraient être associés à la vacuole.

Une autre protéase de cette famille, At4g29210, a également été identifiée. Il s'agit d'une *gamma*Glutamyl Transpeptidase (GGT4), dont quatre représentants sont codés dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* (TAIR). Ces enzymes sont connues pour être impliquées dans la dégradation des conjugués du glutathion, et sont décrites pour travailler conjointement avec la phytochélatine synthase dans la dégradation de GSH *S*-conjugués en Cys *S*-conjugués, (premières étapes de la dégradation du conjugué ; Blum *et al.*, 2007). De façon intéressante, GGT4 a récemment été localisée à la vacuole par des expériences de fusions traductionnelles (Grzam *et al.*, 2007), les auteurs démontrant également que la présence de cette enzyme est fondamentale dans l'initiation des étapes de dégradation des GSH *S*-conjugués

III.1.1.5 - Protéases à cystéine (famille C)

Cette famille de peptidases est principalement impliquée dans la maintenance cellulaire, et participe par exemple à la dégradation des protéines anormales ou mal repliées. Elles sont également connues pour contribuer aux activités protéolytiques des vacuoles digestives des protozoaires et des lysosomes des mammifères et sont impliquées dans la maturation de protéines, leur dégradation ou leur reconstruction suite à différents stimuli extérieurs (tels qu'un déficit hydrique par exemple). Dans certaines conditions, les protéases à cystéine peuvent contribuer pour plus de 90% à l'activité protéolytique totale.

Douze protéines de cette famille ont été identifiées dans la vacuole par nos analyses (Tableau VIII). Trois sont de type RD21 ou RD21-like (At1g47128, At5g43060 et At3g19390), et semblent particulièrement abondantes dans la fraction soluble. RD21A est connue pour être impliquée dans la réponse cellulaire au stress osmotique (Koizumi *et al.*, 1993), et présente un profil d'expression similaire à celui de γ -VPE (Vacuolar Processing Enzyme) lors de certains stress (blessures : Hatsugai *et al.*, 2004 ; Hayashi *et al.*, 2001). Cette dernière, identifiée par nos travaux (At4g32940), appartient aussi à la famille des Cys-protéases et a été décrite comme étant impliquée

dans la maturation des protéines dans les vacuoles de stockage des graines (Tamura *et al.*, 2003) ainsi que dans le programme de mort cellulaire (PCD) intervenant lors de la réponse hypersensible (Kuroyanagi *et al.*, 2005).

D'autres protéases sont connues pour leur rôle dans des processus particuliers, tels que les mécanismes protéolytiques intervenant lors de la vascularisation (XCP2 : Xylem Cystein Proteinase 2, At1g20850 - Kupper *et al.*, 2000) ou dans le métabolisme du folate. Concernant ce dernier cas, les 3 gammaGlutamyl Hydrolases (GGH) connues chez *Arabidopsis* ont été identifiées par nos travaux (At1g78660, At1g78680, At1g78670). Ces enzymes sont responsables de l'hydrolyse des queues polyglutamate du folate (Folyl-polyglutamate ou vitamine B9) et du *p*-aminobenzoyl-polyglutamate. Une telle activité a déjà été identifiée dans les vacuoles des feuilles de pois et des racines de betterave (Orsomando *et al.*, 2005). La vacuole est en effet un site connu de stockage du folate et du methyl-tetrahydrofolate (methyl-THF), correspondant respectivement à 20 et 38 % du total cellulaire. De façon surprenante, la moitié du methyl-THF vacuolaire est sous forme polyglutamylées, alors que l'activité GGH mesurée est suffisamment importante pour hydrolyser la totalité du pool vacuolaire en 7 secondes (feuilles de pois, Orsomando *et al.*, 2005). Ceci sous-entend que l'activité de ces protéases doit être finement régulées.

III.1.1.6 - Inhibiteurs protéiques de peptidases

La régulation de l'activité protéolytique, et notamment de l'activité GGH mentionnée précédemment, pourrait être le fait d'inhibiteurs de protéases, notamment de type protéique. Quatre d'entre eux ont été identifiés dans les extraits analysés (Tableau VIII) : 2 inhibiteurs de protéases à cystéine (At4g16500, Cystatin1 : At5g12140), 1 inhibiteur de protéase à sérine (Serp1, *serine protease inhibitor 1*: At1g47710) et un dernier (At1g73260) appartenant à la famille des inhibiteurs de type Kunitz, susceptibles d'agir sur les deux types de protéases (ser- et cys-protéases). Deux de ces inhibiteurs (cystatin1 et serpin1) présentent une activité inhibitrice du programme de mort cellulaire (Belenghi *et al.*, 2003 ; Vercammen *et al.*, 2006), la serpin1 ayant même présenté, de façon surprenante, une activité inhibitrice sur la métacaspase 9 d'*Arabidopsis*, une protéase à cystéine (Vercammen *et al.*, 2006).

Tableau VIII : Protéases et protéines régulatrices d'activité protéasique identifiées dans la fraction soluble de la vacuole. Les scores MASCOT, ainsi que les couvertures (en pourcentage) et le nombre de peptides identifiés (entre parenthèses), sont mentionnés (PI = protease inhibitor).

Locus	Description	Famille	Score	Couverture (#pep)
Protéases à acide aspartique				
At1g62290	Aspartyl protease family protein	A1	68,83	4,48 (2)
At1g11910	Aspartyl protease family protein (similar to pepsin A)	A1	411,80	25,89 (8)
At1g03220	Extracellular dermal glycoprotein, putative / EDGP	A1, putative	301,04	14,09 (5)
At3g13235	Ubiquitin family protein, has aspartic-type endopeptidase activity	A2, putative	36,05	3,38 (1)
Protéases à serine				
At3g14067	Subtilase family protein, similar to cucumisin-like serine protease AtSBT1.4	S8 (subtilase)	1164,06	27,67 (15)
At4g20850	Subtilase family protein, tripeptidyl-aminopeptidase II (TPP-II) AtSBT6.2	S8 (subtilase)	4786,87	57,97 (70)
At5g67360	Cucumisin-like serine protease, subtilisin-like protease (ARA12)	S8 (subtilase)	194,07	5,02 (3)
At1g71950	Subtilase, putative	S8 (subtilase)	192,85	23,53 (3)
At4g14570	Acylaminoacyl-peptidase-related (Acyl-peptide hydrolase)	S9	890,39	20,42 (13)
At1g50380	Prolyl oligopeptidase family protein, similar to oligopeptidase B	S9	978,88	32,54 (18)
At1g76140	Prolyl oligopeptidase, putative / prolyl endopeptidase, putative	S9	104,59	2,89 (2)
At1g73280	Serine carboxypeptidase-like 3 (SCPL3, Clade IA)	S10	37,75	3,40 (1)
At3g10450	Serine carboxypeptidase-like 7 (SCPL7, Clade IA)	S10	447,22	21,97 (8)
At2g35780	Serine carboxypeptidase-like 26 (SCPL26, CladeII)	S10	92,73	4,20 (2)
At4g30810	Serine carboxypeptidase-like 29 (SCPL29, CladeII)	S10	129,74	6,26 (2)
At3g10410	Serine carboxypeptidase-like 49 (SCPL49)	S10	140,18	6,98 (4)
At1g15000	Serine carboxypeptidase-like 50 (SCPL50)	S10	202,64	10,81 (5)
At4g36190	Serine carboxypeptidase S28 family protein	S28	496,50	14,40 (8)
At2g18080	Serine carboxypeptidase S28 family protein (EDA2)	S28	161,11	8,22 (3)
At4g36195	Serine carboxypeptidase S28 family protein, similar to EDA2	S28	999,35	38,57 (15)
At5g65760	Serine carboxypeptidase S28 family protein, similar prolylcarboxypeptidase	S28	455,59	18,83 (8)
At4g36190	Serine carboxypeptidase S28 family protein	S28	496,50	14,40 (8)
At3g61540	Peptidase family protein, prolyl aminopeptidase (proline iminopeptidase)	S33	554,72	27,77 (10)
Protéases à cystéine				
At4g01610	Cathepsin B-like cysteine protease, putative	C1	368,50	16,99 (6)
At1g02305	Cathepsin B-like cysteine protease, putative	C1	116,39	14,09 (3)
At1g47128	Cysteine proteinase (RD21A)	C1	557,28	17,53 (8)
At3g19400	Cysteine proteinase, putative	C1	149,11	13,10 (2)
At3g19390	Cysteine proteinase, putative / thiol protease, contains similarity to RD21A	C1	254,29	9,96 (4)
At5g43060	Cysteine proteinase, putative, similar to RD21A	C1	475,46	13,39 (7)
At1g20850	Cysteine endopeptidase, papain-type (XCP2)	C1A	45,94	3,65 (1)
At4g32940	Gamma vacuolar processing enzyme (gamma-VPE)	C13	114,34	4,86 (2)
At1g56700	Pyrrolidone-carboxylate peptidase family protein (pyroglutamyl-peptidase I)	C15	39,04	5,94 (1)
At1g78660	Gamma-glutamyl hydrolase (AtGGH1)	C26	53,31	3,45 (1)
At1g78680	Gamma-glutamyl hydrolase (AtGGH2)	C26	324,10	23,34 (6)
At1g78670	Gamma-glutamyl hydrolase(AtGGH3)	C26	221,67	16,48 (5)
Métalloprotéases				
At1g63770	Alanyl aminopeptidase	M1 (Zn)	143,00	5,66 (3)
At4g33090	Aminopeptidase M, a ortholog of mouse microsomal AP	M1 (Zn)	261,27	5,23 (4)
At5g65620	Thimet oligopeptidase family protein	M3 (Zn)	284,88	9,23 (6)

At1g71696	Carboxypeptidase D, putative	M14 (Zn)	34,53	2,37 (1)
At2g41790	Pitriylsin family, insulinase family protein	M16 (Zn)	37,96	1,13 (1)
At2g24200	Leucine aminopeptidase 1 (LAP1)	M17	1335,28	54,42 (19)
At4g30920	Leucine aminopeptidase 3 (LAP3)	M17	742,42	24,36 (10)
At5g60160	Aspartyl aminopeptidase	M18	1121,75	47,80 (18)
At5g04710	Aspartyl aminopeptidase, putative	M18	92,35	4,75 (2)
At4g36760	Aminopeptidase P, similar to Xaa-Pro aminopeptidase 2	M24 (Co / Mn)	635,83	20,66 (10)
At5g19740	Peptidase M28 family protein (similar to AMP1)	M28 (Zn)	79,65	3,38 (2)
Protéases à thréonine				
At5g35590	20S proteasome alpha subunit A1 (PAA1) (PRC1)	T1	150,64	21,54 (3)
At2g05840	20S proteasome alpha subunit A2 (PAA2)	T1	128,28	15,85 (2)
At1g16470	20S proteasome alpha subunit B (PAB1) (PRC3)	T1	5,0	4,3 (1)
At3g22110	20S proteasome alpha subunit C (PAC1) (PRC9)	T1	86,30	10,00 (2)
At3g51260	20S proteasome alpha subunit D (PAD1)	T1	169,30	21,60 (4)
At1g53850	20S proteasome alpha subunit E1 (PAE1)	T1	78,95	10,97 (2)
At1g47250	20S proteasome alpha subunit F2 (PAF2) (PRC2B) (PRS1)	T1	42,24	4,33 (1)
At2g27020	20S proteasome alpha subunit G (PAG1) (PRC8)	T1	57,81	4,82 (1)
At4g31300	20S proteasome beta subunit A (PBA1) (PRCD)	T1	201,18	15,45 (3)
At1g77440	20S proteasome beta subunit C (PBC2)	T1	81,0	6,9 (1)
At1g21720	20S proteasome beta subunit C1 (PBC1) (PRCT)	T1	120,44	11,76 (2)
At3g22630	20S proteasome beta subunit D (PBD1) (PRGB)	T1	101,53	12,75 (2)
At3g60820	20S proteasome beta subunit F1 (PBF1)	T1	176,10	21,97 (4)
At4g29210	Gamma-glutamyl transpeptidase family protein (GGT4)	T3	480,83	14,13 (8)
Régulateurs d'activité				
At5g12140	Cysteine protease inhibitor (Cystatin-1)	Cys - PI	97,95	15,84 (1)
At4g16500	Cysteine protease inhibitor family protein / cystatin family protein	Cys - PI	143,74	24,79 (3)
At1g47710	Serine protease inhibitor (Serpin1)	Ser - PI	182,04	11,51 (4)
At1g73260	Trypsin and protease inhibitor family protein / Kunitz family protein	Cys/Ser - PI	62,0	6,5 (1)
At1g31340	Ubiquitin family protein (RUB1)		334,27	39,10 (6)
At2g21270	Ubiquitin fusion degradation UFD1 family protein		60,58	5,64 (2)

III.1.2 - Glycosidases

Les glycosidases, ou glycosyl hydrolases (GH), sont des enzymes impliquées dans la dégradation des carbohydrates en hydrolysant une liaison covalente entre deux carbohydrates ou entre un carbohydrate et une autre molécule (peptide par exemple). Elles jouent un rôle primordial dans un grand nombre de processus physiologiques tels que les métabolismes de la paroi cellulaire, la défense contre les pathogènes, le métabolisme secondaire ou encore la signalisation (Minic, 2008). La base de données CAZy (*Carbohydrate Active Enzyme*, <http://www.cazy.org/>, Henrissat, 1991) répertorie 393 glycosidases dans le génome d'*Arabidopsis thaliana*, réparties en 34 familles.

Nos travaux permettent d'identifier 36 enzymes, représentant 20 familles qui couvrent un large spectre des activités cellulaires (Tableau IX). De façon intéressante, seulement 6 glycosidases sont identifiées en commun par les travaux de Shimaoka *et al.* (2004) (8 identifiées au total) et de

Carter *et al.* (2004) (25 identifiées). Deux d'entre elles (α -mannosidase, famille 38 – At3g26720 et At5g13980) sont les glycosidases les plus représentées dans nos extraits protéiques, sur la base du score MASCOT qui leur est associé (scores respectifs de 1637 et 1198, avec 23 et 21 peptides identifiés). Ces enzymes sont responsables de la dégradation des protéines *N*-glycosylées dans la vacuole ou dans les corps protéiques. L'hydrolyse des *N*-glycanes pourrait également impliquer une β -*N*-acetylhexosaminidase (At3g55260, HEXO1, famille 20), qui catalyserait la libération de résidus GlcNAc conduisant à la synthèse de *N*-glycanes paucimannosidiques (paucimannose = Man₃₋₅GlcNAc₂Fuc₂₋₄), un composant majeur des protéines glycosylées chez les plantes. Les 3 isoformes HEXO1, 2 et 3 ont été récemment clonées, et en accord avec nos résultats l'isoforme 1 a été assignée à la vacuole par des expériences de fusion traductionnelle avec la GFP (Strasser *et al.*, 2007).

Les polysaccharides de la paroi cellulaire sont les composés organiques les plus abondants sur terre, ont une biogenèse qui dépend en grande partie de glycosidases (Minic, 2008). Ils correspondent à 90 % de la paroi cellulaire et se divisent en 3 groupes : cellulose, hémicellulose et pectine. Six pectinases (famille 28) ont été identifiées dans nos travaux, dont 5 sont prédites pour participer à la dégradation de la paroi (Minic & Jouanin, 2006). Huit autres glycosidases sont également potentiellement impliquées dans le métabolisme de la paroi cellulaire : une β -xylosidase (At5g10560, GH3), une β -glucanase (At4g16260, GH17), deux α -galactosidases (At3g26380 et At3g56310, GH27), une α -glucosidase (At5g11720, GH31), deux β -galactosidases (At1g72990 et At2g32810, GH35) et une α -L-arabinofuranosidase (At3g10740, GH51).

Trois chitinases (GH19) ont également été identifiées. Initialement décrites pour être, chez les plantes, impliquées principalement dans la défense contre les pathogènes (Collinge *et al.*, 1993), les chitinases sont aujourd'hui rattachées à un nombre croissant de processus cellulaires autres que celui-ci (Kasprzewska, 2003). Bien que l'importance de ces enzymes dans la réponse cellulaire contre les pathogènes soit reconnue (Bishop *et al.*, 2000), certaines chitinases sont aujourd'hui connues pour être impliquées dans l'embryogenèse et le programme de mort cellulaire, en particulier ATCHITIV (At3g54420), identifiée au cours de nos analyses (Passarinho *et al.*, 2001).

Tableau IX : Glycosyl hydrolases identifiées dans la fraction soluble de la vacuole. Les scores, ainsi que les couvertures (en pourcentage) et le nombre de peptides identifiés (entre parenthèses), sont mentionnés.

Locus	Description	Famille	Score	Couverture (#pep)
At3g60130	GH family 01 protein, beta-glucosidase	1	293,04	15,37 (6)
At3g54440	GH family 02 protein	2	40,51	0,81 (1)
At1g09010	GH family 02 protein, mannosylglycoprotein endo-beta-mannosidase	2	770,36	17,69 (13)

At3g47040	GH family 03 protein, beta-D-glucan exohydrolase	3	473,21	11,16 (6)
At5g10560	GH family 03 protein, beta-xylosidase	3	876,20	20,20 (14)
At4g15210	GH family 14 protein, beta-amylase (BMY1), 4-alpha-D-glucan maltohydrolase	14	54,25	1,61 (1)
At4g16260	GH family 17 protein, beta-1,3-glucanase class 1	17	311,64	18,95 (4)
At3g12500	GH family 19 protein, basic endochitinase B	19	589,59	35,40 (8)
At2g43570	GH family 19 protein, chitinase,	19	75,18	7,94 (2)
At3g54420	GH family 19 protein, class IV chitinase (CHIV)	19	51,41	4,40 (1)
At1g05590	GH family 20 protein, beta-hexosaminidase (HEXO2)	20	66,31	2,93 (2)
At3g55260	GH family 20 protein, beta-N-acetylhexosaminidase 1 (HEXO1)	20	711,61	22,92 (12)
At3g26380	GH family 27 protein, alpha-galactosidase family protein, melibiase family protein	27	274,60	10,66 (6)
At3g56310	GH family 27 protein, alpha-galactosidase-like protein	27	435,03	21,28 (7)
At1g80170	GH family 28 protein, polygalacturonase (pectinase) family protein	28	101,84	8,11 (2)
At3g06770	GH family 28 protein, polygalacturonase (pectinase) family protein	28	104,40	5,04 (2)
At3g16850	GH family 28 protein, polygalacturonase (pectinase) family protein	28	598,11	25,93 (8)
At3g57790	GH family 28 protein, polygalacturonase (pectinase) family protein	28	373,73	13,27 (5)
At3g62110	GH family 28 protein, polygalacturonase (pectinase) family protein	28	324,46	12,10 (4)
At5g49215	GH family 28 protein, polygalacturonase (pectinase) family protein	28	250,87	10,02 (4)
At2g28100	GH family 29 protein, alpha-L-fucosidase	29	500,67	17,39 (8)
At5g11720	GH family 31 protein, alpha-glucosidase I (AGLU1)	31	760,19	16,08 (14)
At5g63840	GH family 31 protein, alpha-glucosidase II alpha-subunit	31	361,41	8,58 (7)
At1g72990	GH family 35 protein, beta-galactosidase (BGAL3)	35	41,33	1,72 (1)
At2g32810	GH family 35 protein, beta-galactosidase (BGAL9)	35	789,23	22,66 (13)
At4g24040	GH family 37 protein, trehalase	37	80,60	3,04 (2)
At3g26720	GH family 38 protein, alpha-mannosidase	38	1637,36	29,34 (23)
At5g13980	GH family 38 protein, alpha-mannosidase	38	1198,45	21,48 (21)
At5g66150	GH family 38 protein, alpha-mannosidase	38	62,22	1,91 (2)
At3g21160	GH family 47 protein, 1,2-alpha-mannosidase-like protein	47	417,62	13,11 (7)
At1g30000	GH family 47 protein, alpha-mannosidase, putative	47	147,82	7,37 (3)
At3g10740	GH family 51 protein, alpha-L-arabinofuranosidase	51	659,06	22,71 (11)
At2g40840	GH family 77 protein, 4-alpha-glucanotransferase	77	63,82	2,62 (2)
At5g07830	GH family 79 protein, similar to beta-glucuronidase, heparanase-like protein	79	69,66	2,58 (1)
At5g05460	GH family 85 protein, similarity to endo-beta-N-acetylglucosaminidase	85	145,62	5,15 (3)
At5g13690	GH family 89 protein, alpha-N-acetylglucosaminidase family / NAGLU family	89	343,30	11,79 (8)

III.1.3 - Autres hydrolases

Le recyclage des éléments cellulaires dans la vacuole implique la présence dans cet organe d'un ensemble d'enzymes susceptibles de dégrader un large spectre de composés : protéines, carbohydrates, mais également lipides et acides nucléiques par exemple.

Les lipides sont une composante majeure de la cellule, non seulement parce qu'ils constituent les membranes de la cellule et des organites, mais également parce qu'ils jouent un rôle important dans la production d'énergie, et dans la signalisation cellulaire en tant que messagers secondaires. Leur dégradation, *via* des estérases/thioestérases/lipases, doit donc être particulièrement régulée. Six protéines de ce type ont pu être identifiées dans le protéome soluble de

la vacuole. Trois d'entre elles appartiennent à la sous-famille des lipases dont le site catalytique, Glu-Asp-Ser-Leu (GDSL), diffère du motif GxSxG caractéristique de la plupart des autres lipases (Akoh *et al.*, 2004). La présence dans la vacuole de plusieurs lipases suggère qu'elles puissent intervenir dans des processus différents, leur activité pouvant être en outre régulée par des effecteurs tels que des protéines à domaine saposine (activateur de lipases, Munford *et al.*, 1995), certaines ayant d'ailleurs été identifiées dans ce travail (protéine à domaine saposine B : At3g51730, *Plant Specific Insert* des protéases à acides aspartique). Toutefois, les spécificités relatives de ces différentes lipases, en particulier entre celles à motif GDSL et les autres, ne sont pas connues.

Une protéine appartenant à la famille des LCAT (*Lecithin : Cholesterol AcylTransferase*) a également été détectée. Identifiée depuis peu chez la plante, le rôle de cette famille, dont 6 représentants ont été retrouvés dans le génome d'*Arabidopsis* (Banas *et al.*, 2005), n'est pas précisément connu. Cette enzyme semble être impliquée dans une voie de synthèse des triglycérides alternative à la voie acyl-CoA dépendante, et qui utiliserait les phospholipides (PL) comme précurseurs des triglycérides (Dahlqvist *et al.*, 2000). Elle serait également impliquée dans l'acylation, à partir de PL, de stérols et/ou de stéryl-glycosides. La présence de cette protéine dans nos extraits est cohérente avec la teneur élevée en stéryl-glucosides acylés du tonoplaste (7,4 % des lipides totaux, Yoshida & Uemura, 1986 ; Moreau *et al.*, 1998). Les stéryl-glucosides acylés sont aussi impliqués dans les processus de signalisation lors de stress biotiques et abiotiques : rayons gamma, O₃, pathogènes, mais aussi métaux lourds (Potocka & Zimowski, 2008).

Les activités liées aux modifications lipidiques dans le cadre de la réponse au stress et de la défense contre les pathogènes sont également représentées par une phospholipase D (At3g15730 ; Shah, 2005).

Parmi les hydrolases d'intérêt, 3 nucléases (une endoribonucléase de type L-PSP, une ribonucléase 2 (RNS2) et une nucléase bifonctionnelle putative) ont été répertoriées. L'une d'entre elles, RNS2, est homologue à une famille de nucléases identifiées pour leur rôle dans l'incompatibilité gamétique chez certaines plantes allogames obligatoires (Haring *et al.*, 1990). La présence de cette protéine chez *Arabidopsis* (plante autogame) semble plutôt reliée aux processus de sénescence (Taylor *et al.*, 1993). Par contre, les endoribonucléases de la famille L-PSP (*Liver Perchloric acid-Soluble Protein*, identifiées chez le rat) sont de façon générale impliquées dans la régulation traductionnelle de certaines protéines *via* la dégradation de leur ARN messager (Morishita *et al.*, 1999).

III.2 - Protection cellulaire et signalisation

III.2.1 - Protéines de la réponse aux stress

Certains aspects de défense de la cellule lors de stress biotiques (herbivores, microorganismes ...) ont déjà pu être évoqués, notamment avec l'identification de chitinases, d'une phospholipase D ou encore d'une LCAT. De nombreuses autres protéines impliquées dans ces mécanismes ont été identifiées, et confirment le rôle déterminant de la vacuole dans la protection contre les sous-produits nocifs du métabolisme (espèces actives de l'oxygène ...), les éléments abiotiques (métaux lourds, UV ...) ou les pathogènes.

La défense contre les pathogènes est par exemple représentée par des protéines de type *myrosinase-associated* (2 identifiées), les myrosinases étant des enzymes intervenant dans la protection contre les herbivores en hydrolysant des cyanoglucosides, et par des inhibiteurs de polygalacturonases, une enzyme de dégradation de la paroi cellulaire sécrétée par de nombreux pathogènes (*Botrytis cinerea* par exemple, Juge, 2006). La forte représentation de l'une de ces *Polygalacturonase Inhibiting Protein* (PIP2 : score de 603), est d'ailleurs intéressante et l'emploi de cellulase / pectolyase lors de la purification des organites pourrait provoquer une induction de cette protéine lors de cette étape.

Douze peroxydases et catalases, impliquées notamment dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, ont été identifiées, certaines avec un score important (PerX 34 : score de 887). La protection contre l'oxydation des protéines est également représentée par des thioredoxines, *thioredoxin-related* et glutathionine, et par un certain nombre d'enzymes impliquées dans la lutte contre le stress oxydant (thioredoxine reductase ou ascorbate reductase par exemple). L'identification de 8 HSP (*Heat Shock Protein*) est aussi à relier à la protection des protéines lors de certains stress.

La présence de telles protéines dans la fraction soluble de la vacuole soulève une fois encore la question d'une éventuelle contamination des vacuoles par des protéines d'autres compartiments cellulaires. C'est en effet majoritairement dans le cytosol et dans les peroxysomes qu'ont été décrites ces enzymes, bien que certains auteurs suggèrent l'existence de peroxydases dans la vacuole, participant à la protection contre les espèces actives de l'oxygène (Yamasaki *et al.*, 1997) et à certaines synthèses (cf. Analyse Bibliographique).

D'autres éléments identifiés sont connus pour intervenir lors des processus de détoxification de sous-produits toxiques du métabolisme. Il s'agit par exemple d'une *S-formylglutathione hydrolase* (SFGH, At2g41530), impliquée dans la détoxification du formaldéhyde ou de certains xénobiotiques (Kordic *et al.*, 2002), d'une glyoxalase putative (At1g11840), qui serait nécessaire à

la détoxification du méthylglyoxal ou d'une 2-alkénal reductase (At5g16970) impliquée dans la lutte contre les effets cytotoxiques des composés de dégradation des lipides peroxydés (Mano *et al.*, 2005). Enfin, plusieurs protéines participent à la réponse de la plante aux stress abiotiques : UV (At5g63860), stress hydrique (At2g26740, Kiyosue *et al.*, 1994), xénobiotiques (At3g48690) et métaux lourds (At5g20230, Ezaki *et al.*, 2005 ; At4g14030, Dutilleul *et al.*, 2008).

III.2.2 - Composantes de la signalisation cellulaire

La capacité de la vacuole à subvenir aux besoins de la cellule et à intervenir dans le cadre de la réponse à différents stress dépend d'un réseau de signalisation impliquant cet organelle. Relativement peu étudiés dans un contexte vacuolaire, les composantes de ce réseau sont pourtant fortement représentées dans notre analyse et correspondent à plus de 10 % du protéome.

III.2.2.1 - 14-3-3, phosphatases, kinases et protéines G

Une famille particulièrement intéressante, celle des 14-3-3, est également très représentée dans le protéome strictement vacuolaire ou associé à la vacuole. Les protéines de ce type ont été identifiées comme interagissant avec un grand nombre de cibles afin de réguler la transmission d'un signal ou l'activité d'une enzyme (Dougherty & Morrison, 2004). Chez *Arabidopsis*, 13 membres de cette famille ont été retrouvés dans le génome, 2 autres putatifs étant plutôt qualifiés de *14-3-3-like protein*. Neuf 14-3-3 ont été identifiés dans la fraction soluble analysée, deux d'entre elles, dont une *14-3-3-like*, ayant également été retrouvées dans la fraction membranaire. La présence dans la vacuole, ou associée à la vacuole, de plus de la moitié des protéines 14-3-3 codées par le génome est extrêmement intéressante, et ouvre des perspectives dans l'identification des partenaires de ces protéines, dont un petit nombre seulement est connu chez les plantes, en regard de la centaine identifiée chez les mammifères. Certaines de ces protéines ont été mises en évidence dans la régulation de processus particuliers tels que la réponse aux brassinostéroïdes (Gampala *et al.*, 2007 ; de Vries, 2007), ou dans la régulation de mécanismes vacuolaires, notamment l'ouverture de canaux ioniques (Ca²⁺ : van den Wijngaard *et al.*, 2001 ; K⁺ : Latz *et al.*, 2007). L'interaction des 14-3-3 avec leur cible peut en outre être soumise à une régulation particulière *via* la phosphorylation des sites de liaison. La *Protein Phosphatase 2A* (PP2A), également identifiée dans nos analyses (At1g25490), a été par exemple mise en évidence dans des complexes PP2A-14-3-3 (Sung *et al.*, 2005), et décrite comme ayant un rôle dans la modulation de l'interaction entre une 14-3-3 et son partenaire (Ory *et al.*, 2003). A l'inverse, certains auteurs décrivent une inhibition de la déphosphorylation de certaines protéines grâce à la protection du site par une 14-3-3 (Gampala *et al.*, 2007). De façon très intéressante, l'action conjointe des 14-3-3 et de PP2A décrite par Ory *et al.* (2003) affecte la transmission d'un signal par une protéine de type Ras (*Rat Sarcoma*). Cette famille

de protéines est une sous-classe de protéines G, bien connues pour leur fonction dans la cascade de signalisation cellulaire. L'identification dans la fraction soluble de 5 protéines *Ras-related*, avec celle de sept 14-3-3, de 3 kinases et de 12 phosphatases, suggère là encore l'existence d'un réseau complexe de régulation des mécanismes vacuolaires faisant intervenir des intermédiaires variés et de nombreux éléments de modulation de la signalisation.

III.2.2.2 - Récepteurs de type LRR K

Six kinases de type LRR (*Leucine Rich Repeat*) ont été identifiées. Ces récepteurs comptent parmi les intermédiaires les plus importants de la cascade de signalisation cellulaire. Ils se composent d'un domaine de liaison à un ligand (stéroïde, peptide ou protéine par exemple), d'un segment transmembranaire et d'un domaine kinase, induisant l'activation d'une composante de la cascade de signalisation (Torii, 2004). Environ 222 de ces protéines, qui interviennent dans des processus tels que le développement (Bishop & Koncz, 2002) ou la réponse au stress, ont été annotées dans le génome d'*Arabidopsis*.

III.2.2.3 - Autres protéines de la signalisation cellulaire

D'autres acteurs de la cascade de signalisation ont été retrouvés dans la fraction soluble de la vacuole, notamment 2 protéines de liaison au calcium (une calmoduline, CAM4, et une calréticuline, CRT2), potentiellement impliquées dans les mécanismes de signalisation calcique. Une nouvelle fois, une protéine (CRT2), reprend l'hypothèse de la présence de contaminants dans les organites purifiés. Décrite pour être localisée dans le réticulum endoplasmique (RE), elle est identifiée avec un score MASCOT peu important (58) par nos analyses. De façon intéressante, son homologue CRT1, également localisée dans le RE (Christensen *et al.*, 2008), a aussi été identifié dans la fraction membranaire de nos préparations de vacuoles (score MASCOT de 186). La présence de protéines du RE avait déjà été mise en évidence au cours des analyses par western blot de la pureté des vacuoles (Figure 6), et semble se confirmer ici. Il s'agit toutefois de protéines majoritaires du RE (Dunkley *et al.*, 2006), et leur identification avec un score MASCOT relativement peu élevé suggère la faible importance de la contamination, probablement due à la présence dans le tonoplaste de fragments membranaires résiduels du trafic RE – Vacuole, ou à la co-purification des vésicules impliquées dans ce trafic (Herman & Schmidt, 2004).

Une formaldéhyde / alcool déshydrogénase (At5g43940), protéine présentant une activité *S-nitrosoglutathione reductase* a également été identifiée. Le *S-nitrosoglutathione* (GSNO) est considéré comme une forme de stockage d'oxyde nitrique (NO), une molécule signal essentielle chez les plantes (Besson-Bard *et al.*, 2008). L'enzyme identifiée, capable d'hydrolyser la liaison GS-NO, est alors susceptible d'induire un signal par libération d'oxyde nitrique. Ce type de

signalisation a d'ailleurs été mis en évidence chez le pois, en réponse à un traitement au cadmium (Barroso *et al.*, 2006), et est maintenant connu pour interagir avec d'autres composantes de la signalisation cellulaire : kinases et Ca^{2+} par exemple (Courtois *et al.*, 2008).

III.3 - Autres protéines

Le métabolisme primaire est relativement bien représenté dans le protéome soluble vacuolaire, ou associé à la vacuole. Les processus de dégradation des sucres, déjà évoqués à travers la présence de nombreuses glycosyl hydrolases, sont également représentés par des enzymes de la glycolyse (fructose-bisphosphate aldolase, triosephosphate isomerase, enolase ...). Des enzymes du cycle des l'acides tricarboxyliques (isocitrate déshydrogénase, malate déshydrogénase, aconitate hydratase ...) sont aussi présentes.

L'assimilation de l'azote et son incorporation dans le métabolisme, *via* la synthèse des acides aminés notamment, sont là encore relativement bien représentés dans le protéome vacuolaire (9 % des protéines identifiées). Deux nitrilases (impliquées dans l'hydrolyse de liaison C-N non-peptidiques, Pace & Brenner, 2001) ont été identifiées, de même qu'une farnesylcysteine lyase (Atg63910, seule connue du génome d'*Arabidopsis*), une enzyme probablement impliquée dans le recyclage de la farnesylcysteine, l'un des principaux type de prénylation des protéines (Crowell *et al.*, 2007).

Un certain nombre de fonctions importantes du cycle cellulaire, en dehors des voies métaboliques, connues, semblent aussi faire intervenir la vacuole. La synthèse de la paroi cellulaire par exemple requiert la présence de protéines de type RGP (*Reversibly Glycosylated Polypeptides*), dont quatre représentants ont été identifiés, parfois avec de très haut scores MASCOT (RGP1 : 896, RGP2 : 531) ; Une pectine méthylestérase (At1g11580, score MASCOT de 1775) est aussi très représentée, et pourrait être impliquée dans la maintenance de la paroi. Six protéines rattachées aux mouvements de membrane / trafic cellulaire ont aussi été identifiées. Il s'agit d'une profiline (liaison au cytosquelette), de 2 protéines de la famille des lectines (liaison aux mannoses), ou encore d'une protéine de la famille des SNARE (*Soluble NSF Attachment protein Receptor*), connues pour réguler la fusion des vésicules (Uemura *et al.*, 2002). La protéine CIP1 (*COP1-Interactive Protein*, score MASCOT de 1061), liée au cytosquelette et capable d'interagir avec COP1 (Matsui *et al.*, 1995), a également pu être identifiée.

III.4 - Conclusion

Si l'analyse du protéome membranaire de la vacuole a permis de mettre en évidence un grand nombre de transporteurs contrôlant les activités de stockage et de libération des constituants vacuolaires, l'identification des protéines de la fraction soluble souligne d'autres aspects majeurs des fonctions de cet organite. Les hydrolases (protéases, glycosydases, estérases / lipases et nucléases) par exemple constituent à elles seules près du tiers des protéines listées. La vacuole montre ici un potentiel important de dégradation et de recyclage d'un très large spectre d'éléments cellulaires, dont la régulation est assurée par un certain nombre de protéines inhibitrices (Cystatin, Serpin ...) ou activatrices (protéines *ubiquitin-related*). Certaines de ces hydrolases (chitinasés, protéases du programme de mort cellulaire ...) ont été également présentées comme des acteurs de la défense cellulaire. Ce second aspect des fonctions vacuolaires est en effet, lui aussi, relativement représenté, notamment à travers la présence de protéines spécialisées dans la réponse au stress oxydant (peroxydases ...) ou dans la défense contre les pathogènes (protéines associées aux myrosinases, inhibiteurs des polygalacturonases ...).

La présence dans la vacuole de protéines potentiellement dangereuses telles que les hydrolases, et de protéines de réponse à différents types de stress nécessite l'intégration de cet organite au sein d'un réseau de signalisation cellulaire capable de réguler les activités mises en évidence. Un tel réseau se compose d'intermédiaires de signalisation et de régulateurs d'activité protéique, dont un nombre important de représentants a été identifié. Les 47 protéines de ce type (récepteurs, protéines impliquées dans transduction de signal, régulation d'activité protéiques, inhibiteurs de protéases ...) constituent sans doute la catégorie la plus intéressante de la vacuole. Elles révèlent un aspect inhabituel de cet organite, et le présente réellement comme un acteur majeur, finement régulé, des activités métaboliques cellulaires.

IV - Conclusion générale

Les analyses protéomiques de la vacuole réalisées au cours de ce travail ont débouché sur l'identification de 371 protéines à partir des extraits solubles, et de 420 protéines à partir des extraits membranaires, soit 689 protéines non redondantes. Les classes fonctionnelles mises en évidence dans la vacuole sont variées, et couvrent l'ensemble des fonctions physiologiques cellulaires. Elles concernent notamment le transport de métabolites, la signalisation, la réponse au stress, ou encore les processus de dégradation et de recyclage, et elles présentent la vacuole comme un organite complexe, particulièrement intégré au métabolisme cellulaire. Mais ces analyses font également ressortir un certain nombre de protéines généralement associées à d'autres compartiments cellulaires, principalement le cytosol. Plusieurs de ces protéines sont même

identifiées avec un score important, ce qui est en particulier le cas de la subtilase TPPII, ou de plusieurs protéines du métabolisme primaire. Le protéasome, par exemple, est aussi étonnement bien représenté, à travers 8 sous-unités α et 5 sous-unités β différentes. L'identification de ces protéines est relativement surprenante et pourrait dans un premier temps être assimilée à du matériel contaminant. Cependant, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ce phénomène. La copurification d'organites contaminants, tels que la mitochondrie ou le chloroplaste par exemple, sur les gradients utilisés est possible, mais semble néanmoins peu probable. Les identifications réalisées à partir de la fraction membranaire se sont en effet révélées particulièrement adaptées aux protéines hydrophobes, et l'absence de transporteurs majeurs mitochondriaux ou chloroplastiques a pu être soulignée précédemment. Cette observation est également confortée par l'absence de contaminations d'origine mitochondriale, plasmalemmique et chloroplastiques lors des analyses par western-blot, les marqueurs recherchés étant tous membranaires (Figure 6). C'est essentiellement dans les identifications faites à partir de la fraction soluble que le plus grand nombre de protéines connues pour être localisées dans d'autres compartiments apparaissent, ce déséquilibre suggérant l'absence de contaminants correspondant à des organites entiers. Le cas du réticulum endoplasmique peut-être toutefois différent. Plusieurs protéines connues pour appartenir à cet organite (calréticulines CRT1 et CRT2 par exemple) ont été retrouvées, et leur identification pourrait être reliée à la présence de compartiments prévacuolaires d'origine endoplasmique dans les extraits, comme en témoigne par exemple la détection d'une protéine à motif HDEL, par western-blot, dans les échantillons vacuolaires (Figure 6).

La présence de nombreuses protéines cytosoliques telles que les sous-unités du protéasome suggère par contre que les contaminants observés puissent être associés à la vacuole du côté cytosolique, et co-purifiés avec les organites lors de leur isolement. Il est en effet possible que des protéines majoritaires du cytosol soient liées au tonoplaste de façon transitoire et non spécifique, *via* des interactions hydrophobes par exemple. Mais ces associations peuvent également correspondre à une nécessité physiologique, et à des interactions spécifiques entre certaines protéines cytosoliques et des composants vacuolaires (membranes ou protéines). La subtilase TPPII, par exemple, est connue chez les mammifères pour son rôle dans les processus de présentation de l'antigène. Elle est en interaction fréquente avec un transporteur ABC, TAP2, qui permet la translocation des peptides qu'elle génère vers la machinerie de synthèse du Complexe Majeur d'Histocompatibilité I (Kloetzel, 2004). L'homologue végétal de ce transporteur ayant été identifié par nos analyses, il est très probable que son interaction potentielle avec TPPII et avec le protéasome explique la présence de ces protéines dans nos extraits (Figure 20).

Enfin la présence de ces protéines pourrait résulter de processus autophagiques, qui conduisent à l'internalisation dans la vacuole de fractions entières de cytoplasme, ces protéines étant alors en cours de dégradation par les protéases vacuolaires.

Afin de caractériser plus avant le protéome de la vacuole et éventuellement de répondre aux questions soulevées, nous avons mis en place une évaluation protéique semi-quantitative de la fraction soluble des vacuoles pour en identifier les constituants majeurs. Nous souhaitons également comparer la composition protéique vacuolaire avec celle du cytosol et analyser l'organisation supramoléculaire des protéines de la vacuole. Ces aspects de la caractérisation protéique de la vacuole, très peu décrits dans la littérature, sont susceptibles de fournir de nouvelles pistes dans l'étude des processus vacuolaires du métabolisme de la cellule végétale.

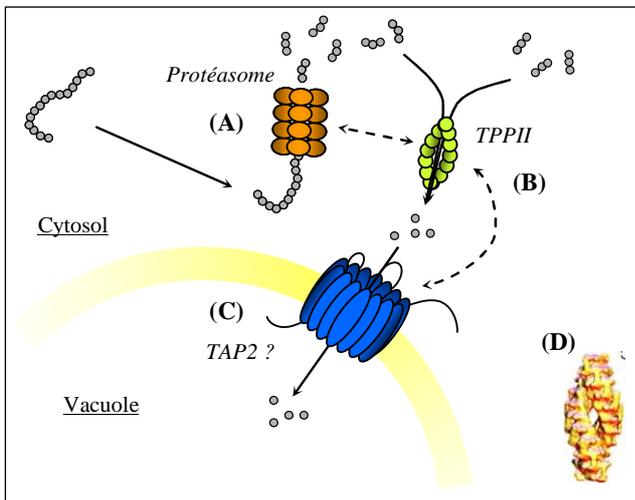


Figure 20 : Schéma organisationnel et fonctionnel possible du protéasome et de la subtilase TPPII (tripeptidylpeptidase II) chez *Arabidopsis thaliana*. La copurification de ces protéines (TPPII et certaines sous-unités du protéasome) suggère leur interaction avec la membrane vacuolaire, probablement via leur liaison à des transporteurs du tonoplaste. Chez les mammifères, lors des processus conduisant à l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité 1, le protéasome est décrit pour être impliqué dans la première étape de dégradation des protéines intra-cellulaires en peptides de tailles réduites (A). Ceux-ci sont ensuite pris en charge par TPPII qui les hydrolyse plus avant (B) afin qu'ils soient pris en charge par TAP2 (C), un transporteur ABC localisé au réticulum endoplasmique. Un tel mécanisme de dégradation protéique pourrait également intervenir chez les plantes et impliquer la vacuole, le transporteur TAP2 ayant été identifié dans les fractions membranaires de nos échantillons. L'interaction potentielle entre les différents partenaires (flèches en pointillés) expliquerait alors la présence de sous-unités du protéasome et de TPPII dans nos échantillons. (D) : structure de la TPPII de drosophile, établie par Rockel et al., 2005.

Chapitre II

*Aspects quantitatifs et
organisationels du protéome
vacuolaire*

Chapitre II : Aspects quantitatifs et organisationnels du protéome vacuolaire

I - Cartographie du protéome soluble vacuolaire par électrophorèse bidimensionnelle

L'étude du protéome de la vacuole telle que nous souhaitons la réaliser est axée sur des analyses qualitatives, mais également quantitatives de ses constituants. Concernant le protéome membranaire, ces aspects ont pu être abordés à travers la réalisation d'une identification protéique directement en solution, sur l'échantillon complet. Cette méthode permettait non seulement d'identifier certaines protéines inaccessibles après l'électrophorèse, mais aussi de privilégier l'identification des protéines majoritaires de l'échantillon. Une méthode complémentaire a été mise en place pour l'aspect quantitatif de l'analyse du protéome soluble de la vacuole, qui a consisté en une séparation des échantillons protéiques par électrophorèse bidimensionnelle de type IEF/SDS-PAGE. Pour ce faire, des échantillons vacuolaires ont fait l'objet d'une séparation des fractions membranaires et solubles par centrifugation en absence de traitement salin. Les protéines solubles de plusieurs préparations (26 préparations) ont alors été regroupées en 3 échantillons de 175 µg de protéines. Les constituants de chacun ont ensuite été séparés, dans un premier temps, selon leur point isoélectrique sur un gradient de pH 3 - 6,75 (IEF-PAGE), puis dans une deuxième dimension en fonction de leur masse moléculaire (SDS-PAGE) dans le cadre d'une collaboration avec Thierry Rabilloud (BBSI, CEA-Grenoble) (Figure 21). Les protéines ainsi individualisées en spots ont alors pu être identifiées par spectrométrie de masse (MS/MS, coll. Lauriane Kuhn, LEDyP, CEA-Grenoble).

La coloration des gels au bleu de Coomassie G250 a permis de résoudre 152 spots (Figure 23), majoritairement répartis sur une échelle de pI comprise entre 3,5 et 6. Leur analyse a conduit à l'identification de 92 protéines, dont 20 n'avaient pas été identifiées par les travaux de protéomique après séparation par électrophorèse 1D (cf. chapitre précédent), ce qui a alors porté la liste des protéines vacuolaires identifiées par nos travaux à 709.

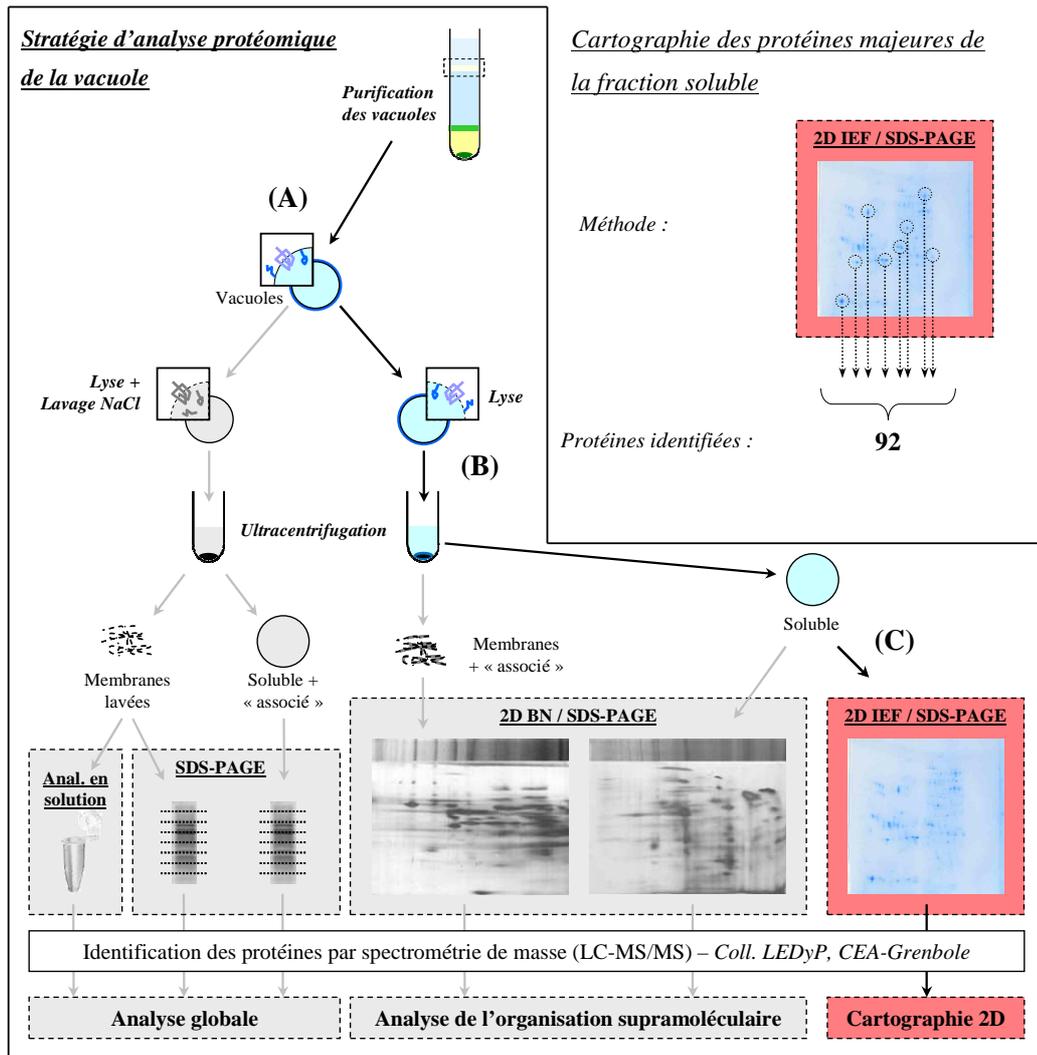


Figure 21 : Analyse par électrophorèse bidimensionnelle et par spectrométrie de masse des protéines majeures de la fraction soluble de vacuoles d'*Arabidopsis thaliana*. Les vacuoles purifiées (A) ont été lysées par congélation / décongélation puis centrifugées (B). La fraction soluble ainsi isolée a pu faire l'objet d'une électrophorèse bidimensionnelle IEF / SDS-PAGE, et les protéines révélées par coloration au bleu de Coomassie G250. Les spots majoritaires ont été excisés du gel et analysés par spectrométrie de masse (nanoLC-MS/MS)

De façon intéressante, toutes les catégories fonctionnelles identifiées précédemment ont été retrouvées, mais leurs proportions relatives ont évolué (Figure 22), des classes regroupant des protéines connues pour être strictement solubles étant par exemple mieux représentées (protéases : 20 %, glycosidases : 11 %).

La classe fonctionnelle la plus représentée est d'ailleurs celle des protéases pour laquelle 19 protéines ont été identifiées. Parmi celles-ci deux nouvelles ont été ajoutées à la liste précédemment établie, dont XCP1 (*Xyleme Cysteine Protease 1* ; Kupper *et al.*, 2000), impliquée dans la vascularisation et dont l'homologue XCP2 a été précédemment identifié. Les glycosidases (11

protéines identifiées) ou la signalisation cellulaire / régulation métabolique (11 identifiées) sont aussi parmi les catégories fonctionnelles majeures du protéome soluble. Cette dernière catégorie (signalisation cellulaire / régulation métabolique) comprend 5 protéines nouvellement identifiées : 2 phosphatases de type calcineurine (dont CBL2, récemment cristallisée ; Akaboshi *et al.*, 2008), une phosphodiesterase, et deux protéines G : ARA5 et ARA6. Les transporteurs / protéines de liaison (8 identifiés) sont essentiellement constitués des sous-unités de la V-ATPase. Six d'entre eux ont été identifiées (VHA-A, B2, B3, C, D, E1), tous appartenant au domaine V1 (soluble) du complexe protéique. A l'inverse, certaines classes fonctionnelles sont particulièrement peu représentées au sein des identifications. Les protéines de la réponse au stress et de la protection cellulaire, par exemple, ne constituent que 7 % des identifications à partir du gel 2D, alors qu'elles représentaient 13 % du protéome soluble présenté au chapitre précédent (Figure 18). Cette observation est surprenante, et suggère que, si les protéines intervenant dans les processus de protection cellulaire sont relativement variées, elles restent sans doute peu exprimées. Ceci est d'ailleurs suggéré lors des identifications présentées précédemment par un score MASCOT moyen pour cette catégorie (203) inférieur à celui de toutes les autres (355 ou 390, par exemple, pour respectivement les protéases et les glycosidases). Cette catégorie fonctionnelle, l'une des majoritaires en terme de nombre de représentants, pourrait donc être une catégorie minoritaire en termes de masse protéique. Ceci se traduirait par une faible quantité de spots protéiques visibles lui correspondant sur le gel 2D, cette méthode de séparation étant connue pour privilégier l'observation des protéines majoritaires. Cette hypothèse est par ailleurs supportée par le fait que, parmi les 7 protéines principales de la catégorie (sur la base du score MASCOT associé à leur identification lors des travaux précédents), 4 ont été retrouvées sur le gel 2D, sur 5 identifiées sur l'ensemble des spots.

Cette notion de quantification relative est particulièrement intéressante, et permet de mieux appréhender le fonctionnement du protéome vacuolaire *via* l'identification des classes protéiques majeures de cet organelle. Elle est d'ailleurs applicable à l'échelle de la protéine, à travers la quantification de l'intensité des spots présents sur le gel. Cette méthode est basée sur la mesure de la densité optique et de la surface de chacun des spots, extrapolés ensuite en une valeur volumique proportionnelle à la quantité de protéines les constituant. Le logiciel PDQuest (BioRad, USA) est capable de réaliser une telle analyse, et nous a permis d'établir une classification des spots protéiques en fonction de leur quantité, relative à l'ensemble des spots résolus. Le Tableau X présente la liste des 20 spots majoritaires du gel réalisé (spots identifiés en rouge, Figure 23), ainsi que les valeurs de leur quantification et les protéines identifiées. L'ensemble de ces 20 spots représente 24 protéines différentes, certaines étant individualisées (spots 1, 29, 10 ...) et d'autres associées dans un même spot (spots 17, 9, 36 ...), certaines protéines pouvant être identifiées dans plusieurs d'entre eux (*SOUL Heme-Binding protein*, spots 10 et 8). Une classe de protéines semble très majoritaire : les protéases (7 identifiées dans 8 spots), dont la plupart (4) sont des protéases à cystéine. Les glycosidases, les phosphatases / phosphodiesterases et les sous-unités de la V-ATPase

sont aussi des classes prépondérantes, représentées chacune par 3 protéines différentes. On retrouve notamment une α -mannosidase (At3g26720). Comme suggéré précédemment, les protéines de la réponse au stress ne sont représentées que par une peroxydase (PER54), quoique celle-ci semble être la seconde protéine la plus abondante du protéome soluble (plus de 5,3 % des protéines résolues) derrière At4g39730. Cette dernière protéine a attiré notre attention pour son niveau d'accumulation très élevé, correspondant à environ 7,6 % des protéines détectées sur le gel. Elle possède un domaine PLAT/LH2 (*Polycystin-1, Lipoxygenase, Alpha-Toxin / Lipoxygenase Homology*), et n'a pas de rôle bien déterminé au sein de la cellule. Elle pourrait toutefois intervenir dans un grand nombre de processus cellulaires, notamment au travers de la production d'oxylipines, des molécules signales importantes dont la première étape de synthèse fait intervenir des lipoxygénases (Blee, 2002).

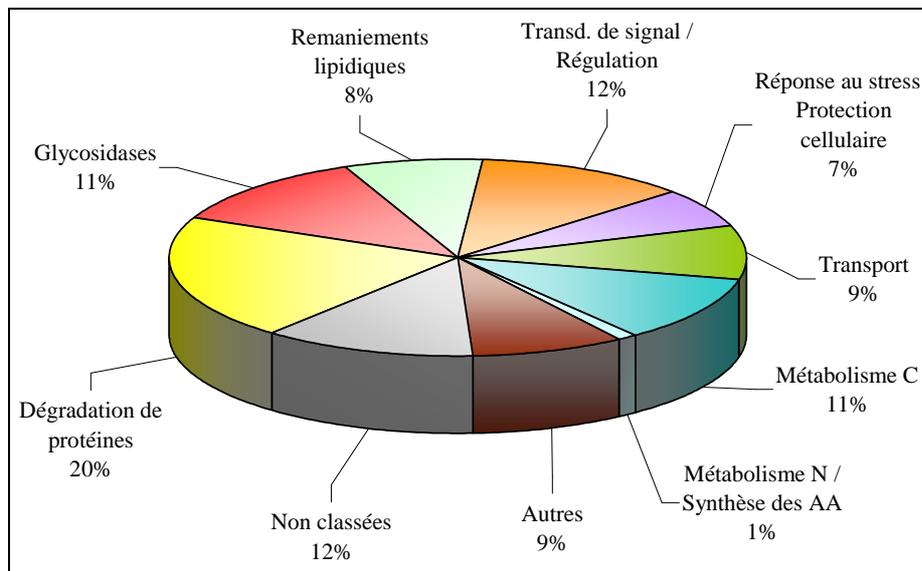


Figure 22 : Répartition des catégories fonctionnelles des protéines identifiées à partir des électrophorèses bidimensionnelles. Toutes les classes fonctionnelles précédemment mises en évidence dans la fraction soluble ont été retrouvées parmi les protéines identifiées à partir des électrophorèses bidimensionnelles. Leurs proportions relatives sont toutefois différentes, la classe principale restant néanmoins celle des protéases.

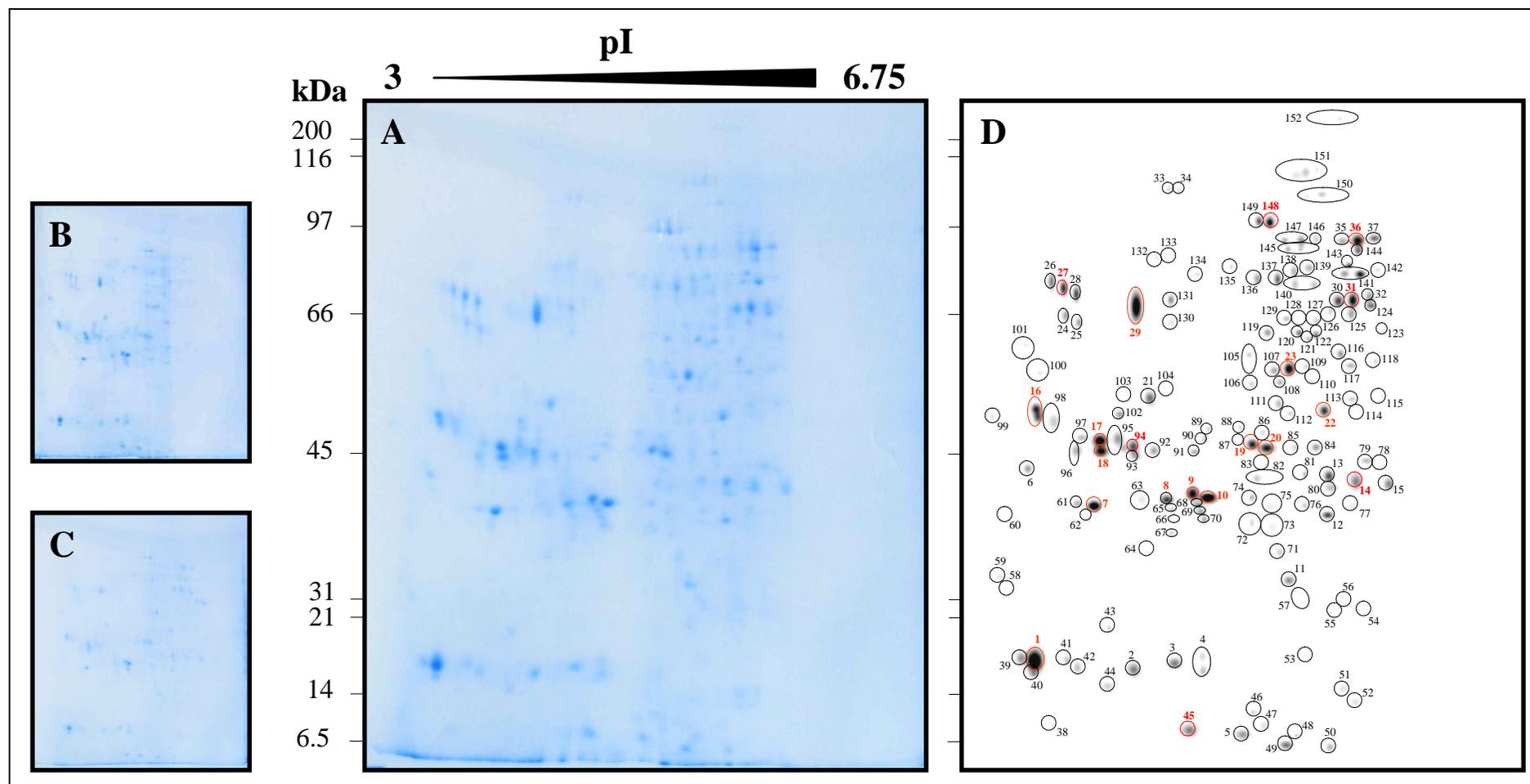


Figure 23 : Séparation des protéines solubles de la vacuole par électrophorèse bidimensionnelle IEF/SDS-PAGE. 175 µg de protéines ont été séparés en fonction de leur point isoélectrique sur une bande de gel (ou strip) de gradient de pH 3 – 6,75, qui a alors été placée au sommet d’un gel de type SDS-PAGE afin de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire dans un deuxième temps. Trois gels (A, B, C) ont été réalisés. L’un d’eux a pu ensuite faire l’objet d’une analyse quantitative à l’aide du logiciel d’analyse d’image PDQuest, qui a permis de réaliser un gel virtuel in silico (D) à partir de la quantification des intensités relatives des spots de protéines. Les 20 protéines majoritaires sont numérotées en rouge, et présentées dans le Tableau X. L’identité de l’ensemble des spots est précisée en annexe I (p. 183).

Tableau X : Spots majeurs (20 plus intenses) des cartographies réalisées par IEF / SDS-PAGE sur les protéines solubles de la vacuole (Figure 23). Pour chaque spot sont précisés l'intensité relative du spot considéré par rapport à l'ensemble des spots résolus, les protéines identifiées et le score MASCOT associés. Les sous-unités de la V-ATPase (α) et les protéases(*) sont mises en évidence.

Spot	Intensité relative (%)	Locus	Description	Score
1	7,59	At4g39730	Lipid-associated family protein, contains PLAT/LH2domain	645,11
29	5,28	At5g06730	Peroxidase (PER54)	436,25
10	3,36	At1g17100	SOUL heme-binding family protein	359,82
17	2,97	At1g47128	* Cysteine proteinase (RD21A)	174,50
		At5g43060	* Cysteine proteinase, putative	56,71
7	2,46	At4g29260	Phosphatase acide (classe B)	334,63
9	2,31	At5g60360	* Cysteine proteinase, putative	50,49
		At4g29260	Phosphatase acide (classe B)	88,91
36	2,16	At3g55260	β -N-acetylhexosaminidase 1 (GH, famille 20)	290,14
		At3g14067	* Subtilase	247,64
31	2,10	At4g29680	Phosphodiesterase	224,29
		At1g78900	α VHA-A	175,51
18	2,09	At1g47128	* Cysteine proteinase (RD21A)	179,18
23	2,00	At3g26720	α -mannosidase (GH, famille 38)	279,24
		At1g78900	α VHA-A	261,66
		At3g48700	Expressed protein	248,67
20	1,92	At4g01610	* Cysteine protease, putative	228,01
		At1g11910	* Aspartyl protease family protein (similar to pepsin A)	126,38
		At3g60340	Thioesterase	88,43
94	1,65	At5g43060	* Cysteine proteinase, putative	161,54
14	1,59	At1g14210	Ribonuclease (famille t2)	346,99
		At3g50440	Esterase, putative	70,84
		At5g34850	Calcineurin-like phosphoesterase	35,71
45	1,52	At1g55265	Expressed protein	46,99
19	1,49	At1g20260	α VHA-B3	218,01
		At4g38510	α VHA-B2	174,26
8	1,41	At1g17100	SOUL heme-binding family protein	403,75
27	1,40	At3g56310	α -galactosidase (GH, famille 27)	226,65
		At5g06730	Peroxidase, putative	169,68
148	1,37	At1g78900	α VHA-A	799,96
16	1,32	At1g47128	* Cysteine proteinase (RD21A)	197,38
22	1,32	At4g30810	* Serine carboxypeptidase (famille S10)	110,85

II - Evaluation de la proportion et de l'origine des contaminations potentielles observées dans la vacuole

Au fil de la présentation des résultats de protéomique (Chapitres I et II), certaines protéines ont été mentionnées comme ayant été décrites pour leur localisation autre que vacuolaire. C'est notamment le cas de plusieurs protéases (sous-unités du protéasome, subtilase TPPII ...), de protéines de la réponse au stress (GST, peroxydases ...), de protéines de la signalisation (14-3-3 ...), ou encore de protéines du métabolisme (cycle des acides tricarboxyliques ...). Leur présence soulève la question d'une éventuelle contamination par d'autres compartiments cellulaires, bien que les analyses par Western-blot aient clairement démontré l'absence de mitochondrie, de chloroplaste et de plasmalemme dans nos échantillons (Figure 6). Ces analyses ont été réalisées dans le but de mettre en évidence des protéines spécifiques de ces organites, et il se trouve que c'est, de façon arbitraire, uniquement des protéines membranaires qui ont été recherchées (transporteur mitochondrial, protéines de l'enveloppe du chloroplaste et de la membrane du thylacoïde, ATPase de la membrane plasmique). Or les contaminants potentiels mis en évidence ont été principalement identifiés dans la fraction soluble des vacuoles. L'analyse de la fraction membranaire n'a en effet pas mis en évidence de protéines majeures d'autres compartiments, au contraire de certaines équipes qui ont notamment retrouvé des aquaporines plasmalemmiques (protéines PIP (*Plasmalem Intrinsic Protein*), Carter *et al.*, 2004). Cette prépondérance de protéines solubles au sein des éventuels contaminants suggère que ce n'est probablement pas *via* la co-purification d'organites autres que les vacuoles que s'est effectuée la contamination. Cette contamination pourrait alors provenir de la co-purification avec les vacuoles de protéines solubles majoritaires du cytosol, associées de façon non-spécifique à la membrane.

Afin d'évaluer la part de contaminants cytosoliques dans les fractions vacuolaires et de connaître les raisons de leur présence, nous avons souhaité comparer nos résultats au protéome du cytosol des cellules d'*Arabidopsis thaliana*. A notre connaissance, aucune d'analyse par spectrométrie de masse des protéines du cytosol n'ayant été réalisée à ce jour, nous avons initié une caractérisation protéomique de la fraction cytosolique de cellules en culture d'*Arabidopsis thaliana*, destinée à identifier les protéines majeures de ce compartiment (Figure 24).

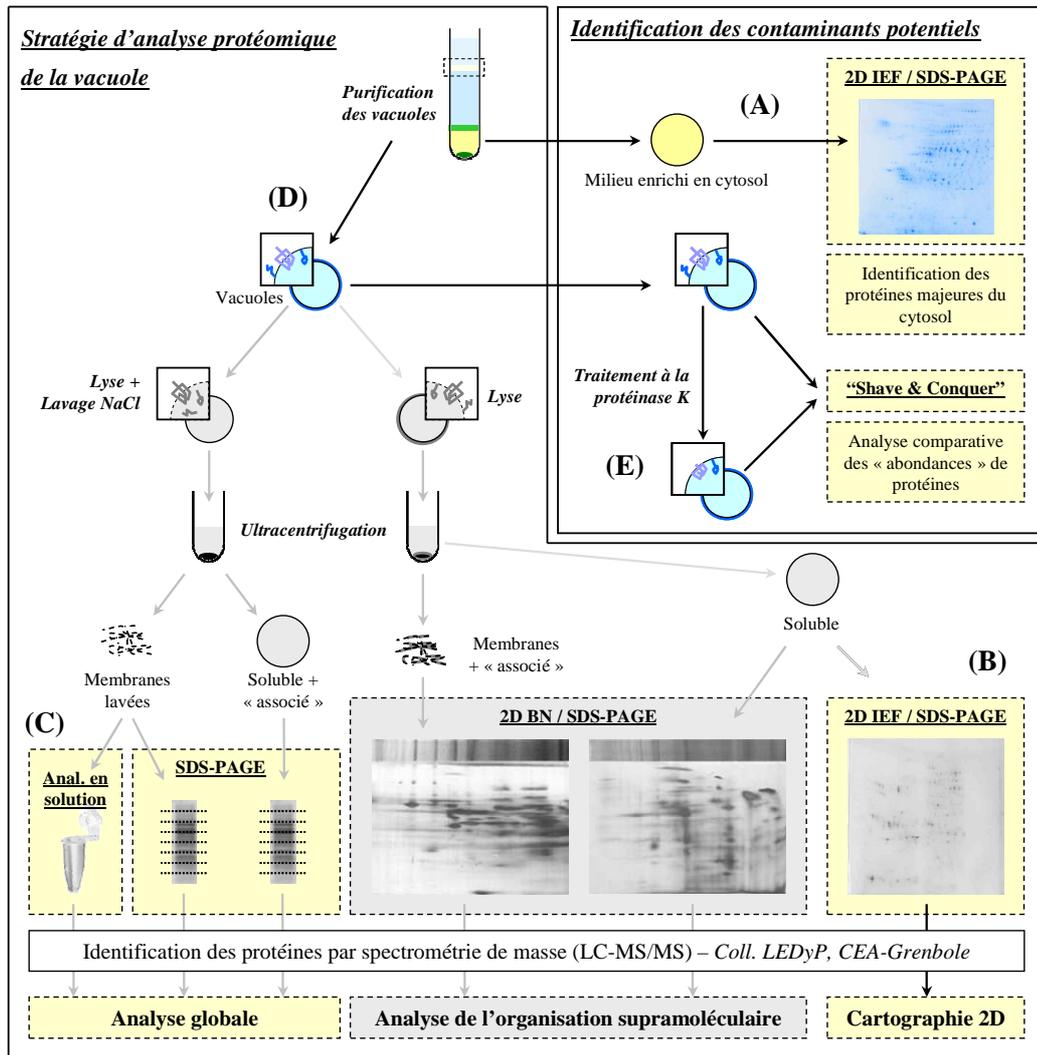


Figure 24 : Stratégie d'identification des protéines cytosoliques co-purifiées avec les vacuoles. (A) : Des fractions enrichies en cytosol ont été prélevées sur les gradients de purification de vacuoles, et soumises à une électrophorèse bidimensionnelle IEF / SDS-PAGE. Les protéines majeures ont alors été identifiées par spectrométrie de masse, et les résultats ont été comparés aux identifications réalisées sur le protéome vacuolaire (B, C). (D) : Après purification de vacuoles intactes, les organites ont été exposés à l'action de la protéinase K (E), puis analysés par spectrométrie de masse. Les identifications réalisées à partir de vacuoles traitées ont alors pu être comparées à celles obtenues à partir de vacuoles « contrôles » et la disparition ou l'enrichissement des protéines, suite au traitement, a pu être évalué.

II.1 - Analyse des protéines cytosoliques majeures après séparation par électrophorèse 2D (IEF / SDS-PAGE) et identification par spectrométrie de masse

La purification de vacuoles nécessite de réaliser une lyse cellulaire ménagée, afin de préserver l'intégrité des vacuoles. Le lysat réalisé est alors placé en première couche d'un gradient de densité de Ficoll constitué de 3 couches, et les constituants de cette fraction « lourde » sont séparés par centrifugation. Les vacuoles, qui sont les composants les plus légers, remontent par flottaison et traversent la couche intermédiaire. Les protoplastes non lysés se localisent entre les couches lourde et intermédiaire, tandis que les organites sédimentent au fond du tube (Figure 5). Après centrifugation, le lysat cellulaire est donc débarrassé des organites et des cellules en suspension présents avant la séparation, et est très enrichi en protéines cytosoliques. Cette partie du gradient a été prélevée, puis soumise à deux nouvelles centrifugations : à 20 000 g (15 min) afin d'éliminer les éventuels organites restants, puis à 100 000 g (30 min) pour éliminer les débris membranaires (cf. Matériels et Méthodes, p. 46).

Cette fraction, enrichie en cytosol, a été utilisée afin d'identifier les protéines cytosoliques majeures des cellules d'*Arabidopsis thaliana*. Trois gels d'électrophorèse bidimensionnelle IEF / SDS-PAGE ont été réalisés, permettant de résoudre 256 spots, analysés par spectrométrie de masse. Les 199 analyses réalisées (de 1 spot ou de plusieurs simultanément) ont abouti à l'identification de 153 protéines. La Figure 25 présente la cartographie protéique, ainsi que les spots analysés. L'ensemble des 153 protéines identifiées est détaillé en annexe II (p. 196), de même que les classes fonctionnelles auxquelles celles-ci peuvent être rattachées.

Cette répartition des protéines cytosoliques à travers les différentes catégories fonctionnelles est très hétérogène (Figure 26), et diffère totalement du « profil protéique » de la fraction soluble de la vacuole (Figure 18 ; Figure 22). La principale classe est constituée des enzymes du métabolisme (carboné ou azoté), dont 45 sont présentes. En particulier, de nombreuses enzymes de la glycolyse et de la voie des pentosephosphates sont représentées (triosephosphate isomérase, fructose bisphosphate aldolase), ainsi que plusieurs enzymes de la voie de biosynthèse de la pyridoxine (vitamine B6), connues pour être cytosoliques notamment grâce à des expériences de fusions traductionnelles (PDX1, PDX1.1, A37 : Tambasco-Studart *et al.*, 2005). De nombreuses protéines impliquées dans la défense contre les pathogènes, la réponse aux stress et la protection cellulaire sont également bien représentées. Sur 22 protéines appartenant à cette catégorie fonctionnelle, 6 sont des HSP (*Heat Shock Protein*), et 2 sont des glutathion S-transférases (GST). Les glycosidases, à l'inverse, sont très peu présentes, une seule ayant été identifiée (At2g40840), de même que les protéines impliquées dans les remaniements lipidiques (phospholipase D uniquement). Les enzymes de la dégradation protéique sont également peu représentées, et presque exclusivement constituées

de sous-unités du protéasome 20S. Cinq d'entre elles sont des sous-unités alpha (PAA1, PAA2, PAC1, PAE1, PAG1) et 3 sont des sous-unités beta (PBA1, PBD1, PBF1), une sous-unité régulatrice du protéasome 26S ayant aussi été identifiée. Les protéines de la régulation et de la signalisation cellulaire ne sont représentées que par 10 protéines, mais de façon intéressante 7 d'entre elles sont de type 14-3-3. Cette famille de protéines, déjà mentionnée pour sa présence importante dans les vacuoles isolées (p. 104), semble être également prépondérante dans les fractions cytosoliques. Enfin, plusieurs protéines d'autres voies cellulaires et métaboliques sont aussi représentées telles que les protéines impliquées dans la liaison au cytosquelette (profilin 1 et 2), ou des composantes de la synthèse protéique (facteurs d'élongation, facteur de traduction).

Afin d'identifier plus précisément les proportions relatives de ces constituants, l'un des gels a été numérisé, puis analysé *via* le logiciel PDQuest (BioRad, USA). Celui-ci a permis d'établir une cartographie virtuelle à partir de laquelle les intensités relatives des spots ont pu être déterminées (normalisées par rapport à l'intensité de l'ensemble des spots reportés sur le gel). Pour des raisons de temps d'utilisation des spectromètres de masse, certains spots ont été excisés et analysés ensemble. Cette analyse a pu aboutir à l'identification d'une ou de plusieurs protéines, et les identifications réalisées sur les groupes de spots les plus intenses (notés en rouge sur la Figure 25) sont reportées dans le Tableau XI. Dans le cas d'une analyse simultanée de plusieurs spots d'un même groupe, les intensités mentionnées sont les intensités cumulées de l'ensemble des spots qu'il contient. Cette évaluation de l'abondance relative des protéines majoritaires permet de mettre en évidence des protéines particulièrement exprimées dans le cytosol. D'une manière générale, les enzymes impliquées dans la glycolyse, les HSP, les 14-3-3, les GST constituent les protéines majoritaires de ce compartiment. En particulier, une triose-phosphate-isomérase est présente dans les spots 17 et 18, et correspond à environ 3,49 % du total des protéines résolues sur le gel. La présence dans le cytosol d'une superoxyde dismutase (SOD), décrite pour être chloroplastique (Ferro *et al.*, 2003 ; Peltier *et al.*, 2002), est plus étonnante. L'absence notable de la RuBisCO, enzyme soluble très majoritaire du chloroplaste, semble infirmer l'hypothèse d'une contamination par le stroma de plastes lysés, mais nous ne pouvons pas l'exclure. L'annexine 1 est également l'une des principales protéines des fractions enrichies en cytosol (spots 24 et 25, intensité relative de 3,46 %), de même que la fructose biphosphate aldolase (spots N° 27 et 28, intensité relative supérieure à 3,84 %) ou la malate deshydrogénase (spot 28b, intensité relative de 1,92 %).

Cette étude a permis d'identifier les protéines majeures du cytosol, et a révélé un « profil » des catégories fonctionnelles de ces protéines totalement différent de celui obtenu pour le protéome de la vacuole. Ces résultats constituent une référence importante, utile pour poursuivre la caractérisation du protéome vacuolaire, notamment en permettant l'identification de contaminants potentiels et l'évaluation de leur origine.

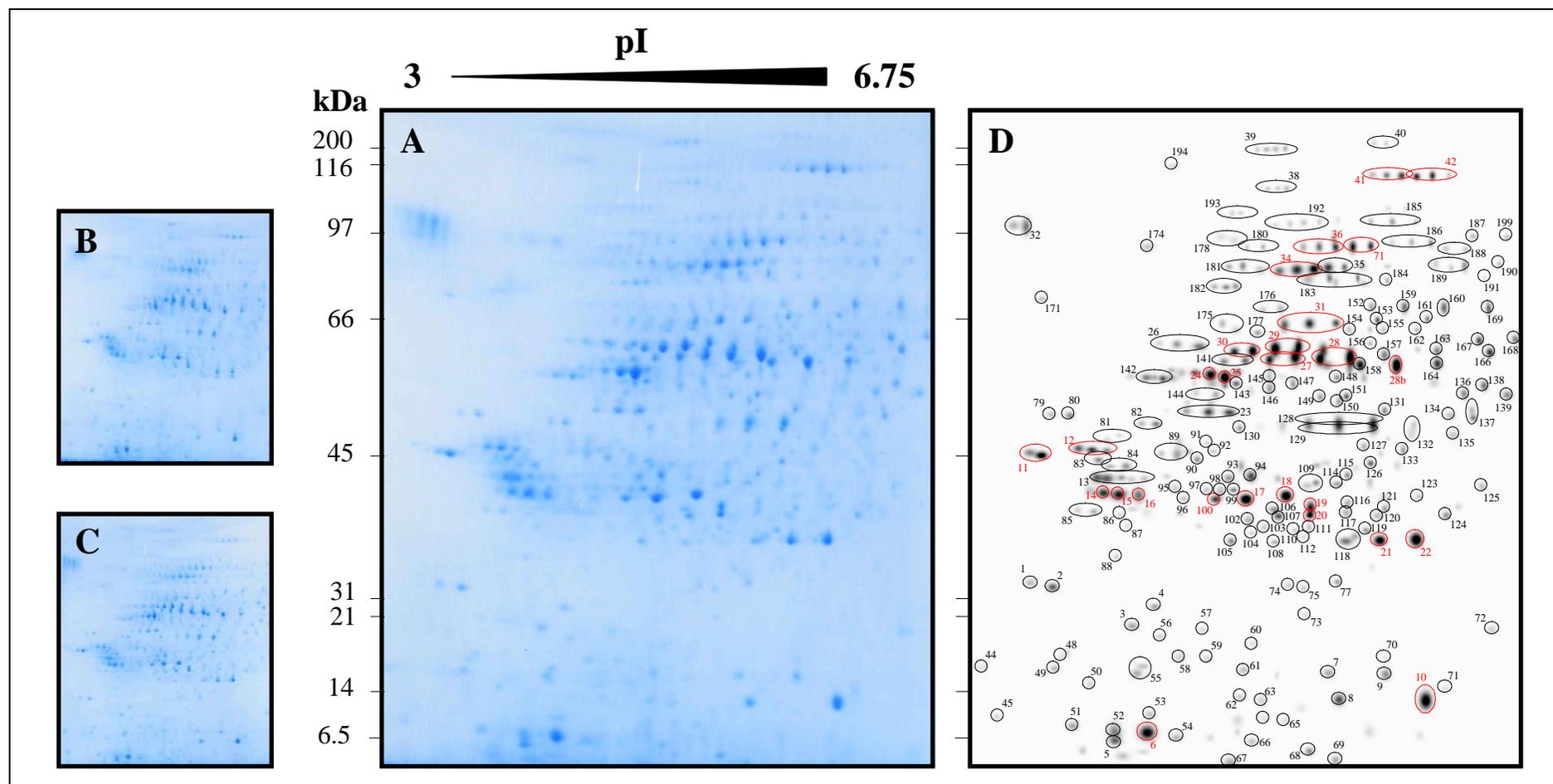


Figure 25 : Séparation des protéines de la fraction enrichie en cytosol par électrophorèse bidimensionnelle IEF/SDS-PAGE. 175 µg de protéines ont été séparées en fonction de leur point isoélectrique sur une bande de gel (ou strip) de gradient de pH 3 – 6,75, qui a alors été placée au sommet d'un gel de type SDS-PAGE afin de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire dans un deuxième temps. Trois gels (A, B, C) ont été réalisés. L'un d'eux a pu ensuite faire l'objet d'une analyse quantitative à l'aide du logiciel d'analyse d'image PDQuest, qui a permis de réaliser un gel virtuel in silico (D) à partir de la quantification des intensités relatives des spots de protéines. Les protéines identifiées sont présentées en annexe II (p. 196) et les identifications réalisées à partir des 27 groupes de spots principaux (notés en rouge) sont détaillées dans le Tableau XI.

Tableau XI : Groupes de spots majeurs de la fraction enrichie en cytosol de cellules en culture d'*Arabidopsis thaliana*. 175 µg de protéines ont été utilisées pour réaliser des gels bidimensionnels IEF / SDS-PAGE, à partir desquels les protéines majoritaires de cette fraction ont été identifiées par spectrométrie de masse. Les 27 groupes de spots principaux sont présentés ici avec l'intensité relative cumulée des spots les composants, ainsi que les identifications associées (score MASCOT, pourcentage de couverture de la protéine, nombre de peptides identifiés).

N° Analyse	Intensité cumulée	Protéine		Score	Couverture (%)	Nb peptides
		Description	Locus			
6	2,11	Thioredoxin H-type 3 (TRX-H-3)	At5g42980	356,74	58,82	6
10	2,71	Nucleoside diphosphate kinase 1 (NDK1)	At4g09320	409,51	30,00	6
11	1,47	Heat shock protein 81-2 (HSP81-2)	At5g56030	462,03	10,18	7
12	1,52	14-3-3 protein GF14 psi (GRF3)	At5g38480	177,68	13,90	3
		heat shock cognate (HSC70-1)	At5g02500	202,37	8,64	3
		Serpin (serine protease inhibitor)	At1g47710	122,42	5,68	2
		Heat shock protein 81-1 (HSP81-1)	At5g52640	119,77	3,26	2
14	0,95	14-3-3-like protein GF14 chi (GRF1)	At4g09000	328,30	28,78	6
		14-3-3 protein GF14 lambda (GRF6)	At5g10450	359,02	26,38	6
		heat shock cognate (HSC70-3)	At3g09440	144,94	3,87	3
15	1,44	14-3-3-like protein GF14 chi (GRF1)	At4g09000	257,53	18,82	4
		14-3-3 protein GF14 lambda (GRF6)	At5g10450	244,43	20,08	4
		heat shock cognate (HSC70-3)	At3g09440	121,88	3,87	2
16	0,77	14-3-3 protein GF14 epsilon (GRF10)	At1g22300	277,25	22,90	5
		14-3-3 protein GF14 kappa (GRF8)	At5g65430	214,20	20,08	4
17	1,66	Triosephosphate isomerase	At3g55440	288,77	20,73	4
18	1,83	Triosephosphate isomerase	At3g55440	262,84	20,73	4
19	1,20	Glutathione S-transferase	At2g30870	343,56	28,18	5
		Glutathione S-transferase	At1g78380	108,41	9,01	2
20	0,45	Glutathione S-transferase	At1g78380	320,35	26,61	6
		Glutathione S-transferase	At2g30870	124,41	10,45	2
21	1,36	Superoxide dismutase (Fe)	At4g25100	62,66	5,09	1
22	1,94	Superoxide dismutase (Fe)	At4g25100	345,81	23,61	5
24	1,26	Annexin 1 (ANN1)	At1g35720	482,89	27,74	7
25	2,20	Annexin 1 (ANN1)	At1g35720	412,85	23,78	6
27	2,69	Reversibly glycosylated polypeptide-1 (RGP1)	At3g02230	190,78	9,76	3
		Fructose-bisphosphate aldolase	At3g52930	204,92	6,29	3
28	3,84	Fructose-bisphosphate aldolase	At3g52930	530,96	29,43	7
28b	1,98	Malate dehydrogenase, cytosolic	At1g04410	366,49	19,20	5
29	2,45	Phosphoglycerate kinase	At1g79550	534,65	25,44	7
		ATMETS	At5g17920	171,69	4,05	3
30	1,79	Phosphoglycerate kinase	At1g79550	358,56	17,71	5
31	1,76	heat shock cognate (HSC70-1)	At5g02500	729,73	17,13	11
34	2,49	Cytosol aminopeptidase	At2g24200	677,24	24,04	11
		SAM Hydrolase	At4g13940	413,54	13,43	7
36	0,96	Pyrophosphate-fructose-6-phosphate	At1g12000	127,64	5,38	2
		Pyruvate decarboxylase putative	At5g54960	91,63	3,79	2
41	0,72	ATMETS	At5g17920	550,70	15,27	10
42	1,01	ATMETS	At5g17920	480,33	11,75	8
71	1,18	Ubiquitin-conjugating enzyme	At1g16890	99,71	17,95	2
100	0,66	pfkB-type carbohydrate kinase	At2g31390	257,58	12,50	5

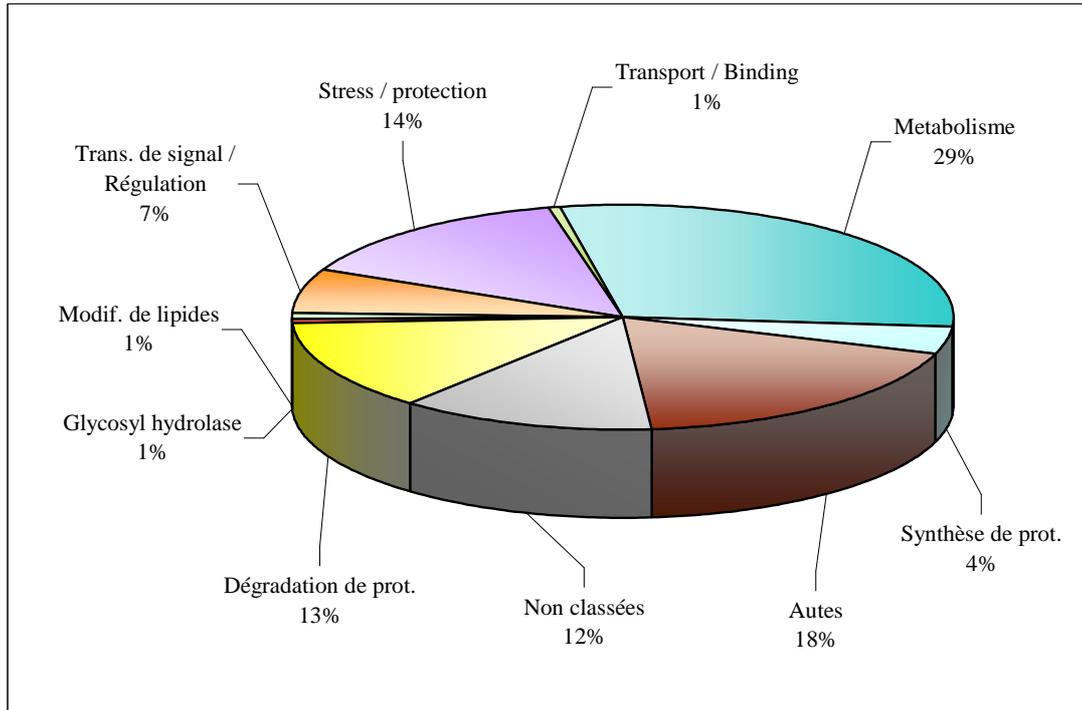


Figure 26 : *Catégories fonctionnelles représentées dans la fraction enrichie en cytosol. Toutes les classes fonctionnelles précédemment mises en évidence dans la fraction soluble de la vacuole ont été retrouvées parmi les protéines identifiées à partir des électrophorèses bidimensionnelles. Les proportions relatives sont toutefois très différentes, certaines catégories principales de la vacuole (transporteurs, glycosidases) étant très minoritaires dans le cytosol.*

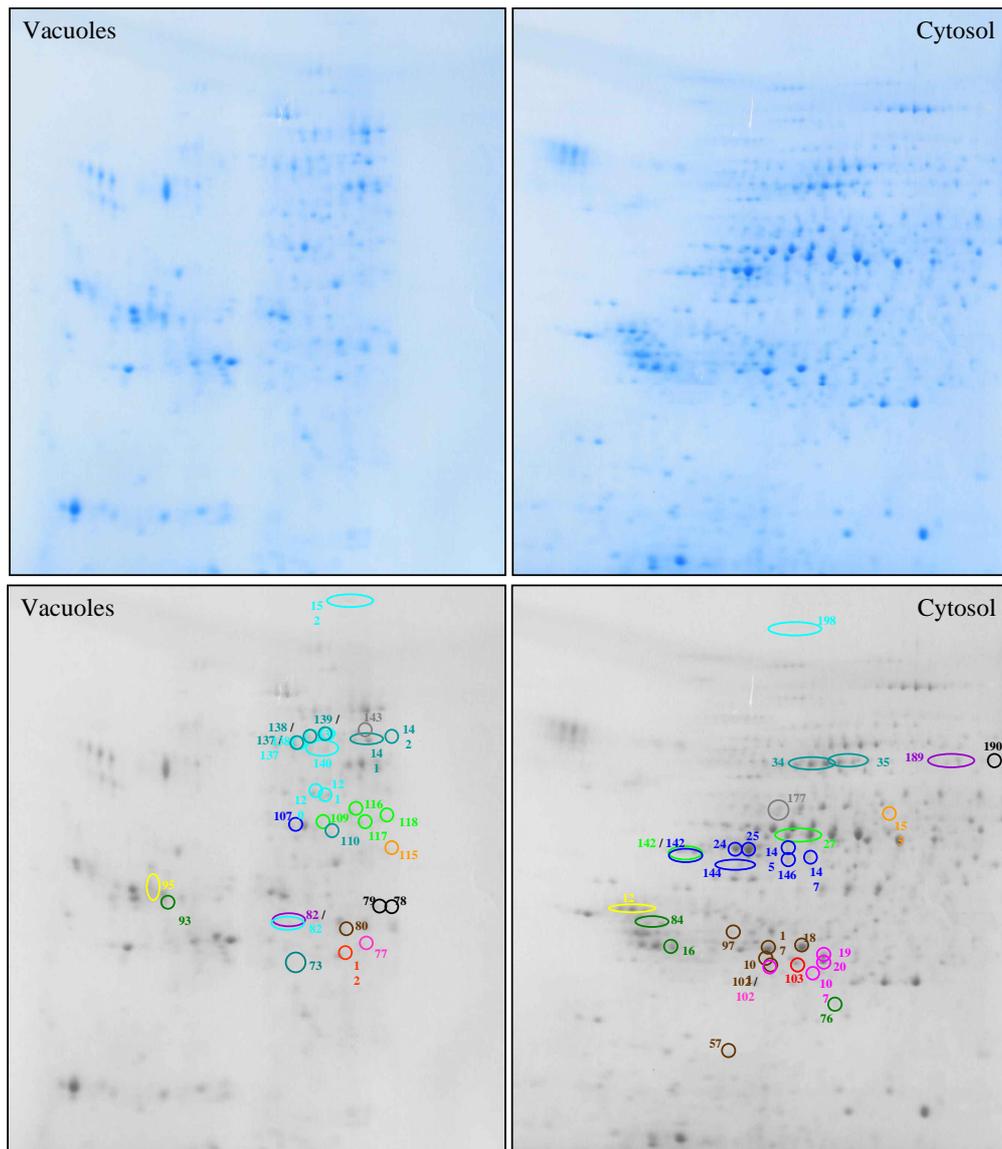
II.2 - Comparaison des protéines majeures du cytosol et de la vacuole

Dans le but de déterminer l'origine des protéines présentes dans notre fraction enrichie en cytosole et identifiées dans la fraction soluble de la vacuole, les cartographies des protéomes solubles de la vacuole (Figure 23) et du cytosol (Figure 25) ont été comparées (Figure 27). Cette analyse montre clairement que les deux profils protéiques sont totalement différents, et la comparaison des spots identifiés montre que les protéines communes aux deux cartographies sont au nombre de 13 seulement. Peu d'entre elles figurent parmi les plus abondantes de la fraction cytosolique. On retrouve toutefois l'Annexine 1 (spot N° 107 de la cartographie du protéome soluble de la vacuole), très représentée dans le cytosol (spots N° 24, 25, 142, 144 à 147), une triosephosphate isomérase, peu présente dans la vacuole (spot N° 80), mais abondante dans la fraction cytosolique (spots N° 17, 18, 57, 97, 101, 102) ou encore une glutathion S-transférase (vacuoles : spot N° 77 ; cytosol : spots N° 19, 20, 102, 107). A l'inverse, la plupart ne correspond pas à des spots majoritaires de la cartographie du cytosol. C'est par exemple le cas de RGP1

(*Reversibly Glycosilated Polypeptide*), identifiée dans les spots N° 27 et 142 de la cartographie du protéome cytosolique, et dans les spots 109, 116, 117 et 118 de l'analyse de la vacuole par IEF / SDS-PAGE. Une protéine de type 14-3-3 (vacuoles : spot N° 93 ; cytosol : spots N° 16, 76, 84), ou encore d'une aspartyl aminopeptidase (vacuoles : spot N° 190 ; cytosol : spots N° 78, 79) sont également très minoritaires dans le protéome cytosolique. Certaines protéines du cytosol semblent même être enrichies dans la vacuole. C'est tout particulièrement le cas de la subtilase TPPII (At4g20850), identifiée dans le spot N° 198 de la cartographie du cytosol (score MASCOT de 233, 5 peptides identifiés), et dans les spots N° 82, 120, 121, 137, 138, 139, 140 de la cartographie du protéome soluble de la vacuole (score MASCOT allant jusqu'à 661, 12 peptides retrouvés).

De manière générale, la plupart des spots majoritaires du cytosol ne sont pas présents dans la cartographie du protéome vacuolaire. Or si les vacuoles étaient contaminées de manière non spécifique par des protéines cytosoliques, la plupart des protéines majoritaires de la cartographie du cytosol devrait être retrouvée sur celle du protéome soluble de la vacuole. Ces résultats montrent sans équivoque que ce n'est pas le cas. Ils suggèrent à l'inverse d'autres explications quant à la présence de protéines cytosoliques dans les fractions vacuolaires : certaines des protéines communes aux deux cartographies sont connues pour interagir avec les membranes (annexine), quelques fois de façon spécifique par l'intermédiaire d'un récepteur ou d'un transporteur par exemple (protéines de type 14-3-3 ; Roberts, 2003). Certaines protéines pourraient alors être spécifiquement liées au tonoplaste, leur présence correspondant à une fonction physiologique impliquant des aspects cytosoliques et vacuolaires. De façon intéressante, la présence de Glutathion S-Transférases associées au tonoplaste a une réalité physiologique et correspond à une voie métabolique associant la conjugaison de toxiques au glutathion à leur transport dans la vacuole. De la même manière, la présence de la subtilase TPPII et du protéasome dans les extraits protéiques vacuolaires a été discutée précédemment (Figure 20). Mais les cartographies mettent également en évidence quelques protéines qui semblent en cours de dégradation dans la vacuole. Situées à des poids moléculaires plus faibles et des points isoélectriques différents d'une cartographie à l'autre, 2 protéines (cytosol aminopeptidase et dihydrolipoamide déshydrogénase) semblent illustrer les fonctions, connues, de dégradation vacuolaires de certaines protéines.

Afin d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes conduisant à la présence de contaminants cytosoliques dans la vacuole, des travaux supplémentaires visant à identifier les protéines associées à la vacuole du côté cytosolique du tonoplaste ont été initiés. Ceux-ci consistent à réaliser une digestion par la protéinase K de vacuoles intactes afin de dégrader les protéines de la face externe des organites (Expérience de « *Shave and Conquer* »). Les vacuoles ainsi « rasées » sont alors purifiées une nouvelle fois sur gradient de densité afin d'éliminer les peptides externes protéolysés, puis analysées par spectrométrie de masse. Les résultats sont alors comparés avec ceux obtenus à partir d'échantillons vacuolaires non soumis à l'action de la protéinase K.



<u>Vacuole</u>	<u>Protéine</u>	<u>Cytosol</u>
12	▶ AT1G19570 : Dehydroascorbate reductase	103
93	▶ AT1G19570 : Dehydroascorbate reductase	16, 76, 84
107	▶ AT1G35720 : Annexin I (ANN1)	24, 25, 142, 144, 145, 146, 147
95	▶ AT1G47710 : Serpin (serine protease inhibitor) putative	12
82	▶ AT1G48030 : Dihydroliipoamide dehydrogenase 1	189
115	▶ AT1G77120 : Alcool dehydrogenase	155
137, 138, 139, 141, 142	▶ AT2G24200 : Cytosol aminopeptidase	34, 35
77	▶ AT2G30870 : Glutathione S-transferase	19, 20, 102, 107
143	▶ AT2G36530 : Enolase	177
109, 116, 117, 118	▶ AT3G02230 : Reversibly glycosylated polypeptide-1 (RGP1)	27, 142
80	▶ AT3G55440 : Triosephosphate isomerase	17, 18, 57, 97, 101, 102
82, 120, 121, 152, 137, 138, 139, 140	▶ AT4G20850 : Subtilase (Tripeptidyl-peptidase II)	198
78, 79	▶ AT5G60160 : Aspartyl aminopeptidase	190

Figure 27 : Comparaison des cartographies des protéomes de la fraction soluble de la vacuole et de la fraction enrichie en cytosol. Les 13 protéines communes aux deux analyses ont été reportées dans le tableau, et les spots dans lesquels elles ont été identifiées sont précisés dans le tableau et sur la figure.

Des analyses préliminaires, réalisées avec Nolwenn Jarno (LPCV, CEA-Grenoble), ont conduit à l'établissement d'une liste de protéines présentes dans les fractions solubles et membranaires de chacun des échantillons de vacuoles (traitées ou non à la protéinase K). Cette analyse, moins exhaustive que celle réalisée précédemment, a été faite de manière à favoriser l'identification des protéines majeures, et a mis en évidence la « disparition » ou l'enrichissement de protéines suite à l'incubation des organites intacts avec la protéase. Cette première étude de protection à la protéinase K nécessite d'être confirmée, mais elle permet d'ores et déjà de mettre en évidence quelques aspects de l'organisation des protéines dans, ou associées à, la vacuole. Trois cent sept protéines précédemment identifiées dans la vacuole ont été retrouvées dans chacun des deux échantillons, dont 221 sont communes aux deux analyses. Chaque échantillon comprend donc 86 protéines suffisamment majoritaires pour être identifiées, mais absentes (non identifiées) de la contrepartie. L'identification dans le contrôle de 5 sous-unités de la V-ATPase (VHA-B1, VHA-E, VHA-F, VHA-G1, VHA-G2), « absentes » des vacuoles traitées à la protéinase K, confirme la digestion des protéines tonoplastiques situées du côté cytosolique de la membrane. D'autres transporteurs, présentant des domaines cytosoliques, sont également « absents » des vacuoles soumises à l'action de la protéinase K. C'est particulièrement le cas de 5 transporteurs de type ABC (MRP2, MRP3, MRP4, MRP6, TAP2). A l'inverse, les glycosidases, intravacuolaires, sont légèrement enrichies suite au traitement, et deux nouvelles protéines ont été identifiées. Leur présence dans les vacuoles traitées confirme que la protéinase K ne traverse pas le tonoplaste. L'enrichissement relativement faible de ces protéines suite à la protéolyse suggère que celles-ci sont des protéines majeures de la vacuole, identifiées par spectrométrie de masse même en présence des protéines du tonoplaste. De façon très intéressante, les protéines de type 14-3-3 sont considérablement dégradées par l'action de la protéinase K (7 identifiées dans le témoin ; 2 identifiées dans le traité), ce qui démontre que ces protéines sont liées au tonoplaste du côté cytosolique. De façon identique, 3 sous-unités du protéasome (sur 4 identifiées dans le contrôle) ne sont plus retrouvées après traitement à la protéase. Ces protéines, cytosoliques, semblent donc bien associées à la vacuole sur la face externe du tonoplaste, très probablement de façon spécifique puisqu'elles sont considérablement enrichies lors de la purification des organites. La subtilase TPPII est par contre, de façon surprenante, toujours présente dans les extraits protéiques après exposition des vacuoles intacts à la protéinase K. Cette protéine très majoritaire est probablement digérée partiellement : le score MASCOT associé à son identification étant très inférieur, après traitement à la protéase, à celui du contrôle puisque 41 peptides sont identifiés dans le témoin (score de 2584), et seulement 27 peptides sont identifiés après traitement à la protéase (score de 1742). Cependant nous ne pouvons pas exclure la présence de cette protéine à l'intérieur de la vacuole, sachant que dans les analyses d'électrophorèses bidimensionnelles on observe la présence de produits de dégradation (Figure 27, spots N° 82, 110, 120, 121). Ces processus lytiques sont

également mis en évidence par un certain nombre de protéines vacuolaires qui semblent être enrichies après le traitement à la protéinase K, et notamment celles de la glycolyse. Si certaines enzymes sont identifiées dans les vacuoles non traitées (glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogénase, 1 peptide identifié) et dans les vacuoles traitées (5 peptides identifiés), la plupart est trop peu représentée pour être identifiée sans dégradation protéolytique des protéines tonoplastiques extra-vacuolaires (phosphoglycérate kinase : 3 peptides identifiés après traitement, fructose-bisphosphate aldolase, 1 peptide identifié ...). Deux enzymes de la voie de synthèse de la méthionine (AT3G03780 et AT5G17920), et une alanine aminotransférase, dont la localisation cytosolique a pu être confirmée par des expériences de fusion traductionnelles avec la GFP (Ravanel *et al.*, 2004 ; Igarashi *et al.*, 2003), sont également identifiées uniquement dans les échantillons vacuolaires exposés à l'action de la protéinase K. Ces résultats suggèrent que ces protéines « cytosoliques » sont sans doute à l'intérieur de la vacuole, en cours de dégradation.

Suite à l'identification de protéines du cytosol dans la vacuole, la comparaison des cartographies des protéomes solubles cytosoliques et vacuolaires a permis de montrer que la présence de telles protéines n'est pas due principalement à une contamination aspécifique par les protéines majeures du cytosol. Les expériences de protection à la protéinase K suggèrent qu'un certain nombre de protéines cytosoliques sont situées dans le suc vacuolaire, et sont certainement en cours de dégradation. Ces observations, illustrant le caractère protéolytique de la vacuole, ont également été réalisées dans le cas de l'analyse protéomique de la vacuole de *Saccharomyces cerevisiae* (Sarry *et al.*, 2007). Mais ces analyses de « *Shave and Conquer* » permettent également d'observer l'association de la plupart des protéines de type 14-3-3, du protéasome et de TPPII avec la face extérieure de la vacuole, suggérant que leur forte représentation dans le protéome vacuolaire est très probablement liée à des activités métaboliques impliquant la vacuole. Des expériences supplémentaires sont toutefois nécessaires pour confirmer ces hypothèses.

La mise en évidence de ces interactions entre certaines protéines cytosoliques et le tonoplaste est particulièrement intéressante, et il est probable qu'un certain nombre de fonctions vacuolaires soit assuré par des complexes protéiques. Afin de compléter la caractérisation protéomique des vacuoles végétales, nous avons souhaité évaluer la présence de tels complexes dans les fractions solubles et membranaires des vacuoles.

III - Evaluation de l'organisation supramoléculaire du protéome vacuolaire

Dans le but d'approfondir la caractérisation protéomique de la vacuole, nous avons initié un travail visant à identifier les complexes protéiques majeurs des fractions solubles et membranaires de cet organite. Cette étude préliminaire avait également pour objectif de définir des conditions d'analyse des complexes protéiques, en particulier dans l'optique d'observer la dynamique du protéome de la vacuole à l'échelle supramoléculaire lors d'un stress. La Figure 29 résume le travail réalisé.

Publiée pour la première fois en 1991, la technique du *Blue-Native PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* (BN-PAGE) a permis de séparer et de caractériser les différents complexes de la chaîne respiratoire de la mitochondrie sans en dissocier les sous-unités (Schagger & von Jagow, 1991). Depuis, cette technique a été également utilisée pour isoler les complexes du chloroplaste (Neff & Dencher, 1999 ; Heinemeyer *et al.*, 2004) et de la mitochondrie végétale (Jansch *et al.*, 1996 ; Heazlewood *et al.*, 2003), mais n'a jamais été appliquée à l'analyse du protéome vacuolaire, ni de plante ni de levure. Elle exploite la propriété de liaison aux protéines du bleu de Coomassie qui, chargé négativement, leur permet ensuite de migrer dans un champ électrique. Dans une matrice constituée d'un gradient d'acrylamide, les complexes se séparent en fonction de leur masse moléculaire. La piste de migration peut alors être placée au sommet d'un second gel, de type SDS-PAGE afin de séparer les protéines associées dans une seconde dimension.

III.1 - Evolution de la méthode de préparation de vacuoles

Le protocole de purification de vacuoles mis en place initialement s'est trouvé être particulièrement adapté aux premières analyses d'identification, présentées dans le chapitre précédent. La spectrométrie de masse, et notamment la LC-MS/MS, est une technique extrêmement sensible et l'analyse de 150 ng d'un extrait protéique complexe permet l'identification de plusieurs centaines de protéines. Toutefois, l'analyse des complexes protéiques de la vacuole par BN-PAGE nécessite une quantité relativement importante de protéines, de l'ordre de 100 à 200 µg, et nous nous sommes rapidement trouvés limités par le faible rendement du protocole initialement mis en place. Une méthode alternative a alors été utilisée, comprenant dans un premier temps une étape d'enrichissement des vacuoles. Ces fractions de vacuoles enrichies, contaminées par d'autres organites, pouvaient être ensuite rassemblées dans un minimum de tubes pour leur purification, limitant les pertes éventuelles lors de leur prélèvement final. Cette étape d'enrichissement a consisté

en une première « purification » sur gradient de Ficoll identique à celle décrite précédemment, à l'exception de la densité de la couche intermédiaire des gradients, ne contenant plus 3,3 % mais 5 % de Ficoll (Figure 28). Les échantillons alors obtenus, légèrement contaminés, ont été rassemblés et placés dans un nouveau gradient de densité, dont la couche intermédiaire était cette fois de 3,3 % de Ficoll. Cette méthode nous a alors permis d'obtenir des vacuoles de pureté identique à celles initialement purifiées, le facteur d'enrichissement (43,4) étant tout à fait comparable au premier. Mais le rassemblement des vacuoles enrichies sur 2 gradients au lieu de 6, limitant les pertes au moment de leur collecte, a permis d'améliorer le rendement (de 18 % environ). En outre, cette méthode permettait en quelques occasions de récolter les vacuoles immédiatement après enrichissement sur les premiers gradients (contenant 5 % de Ficoll). Le rendement très important de ces « purifications » nous a notamment permis de réaliser une analyse sur des vacuoles non congelées (cf. plus loin), malgré leur contamination par des chloroplastes (facteur d'enrichissement de 34,3 environ).

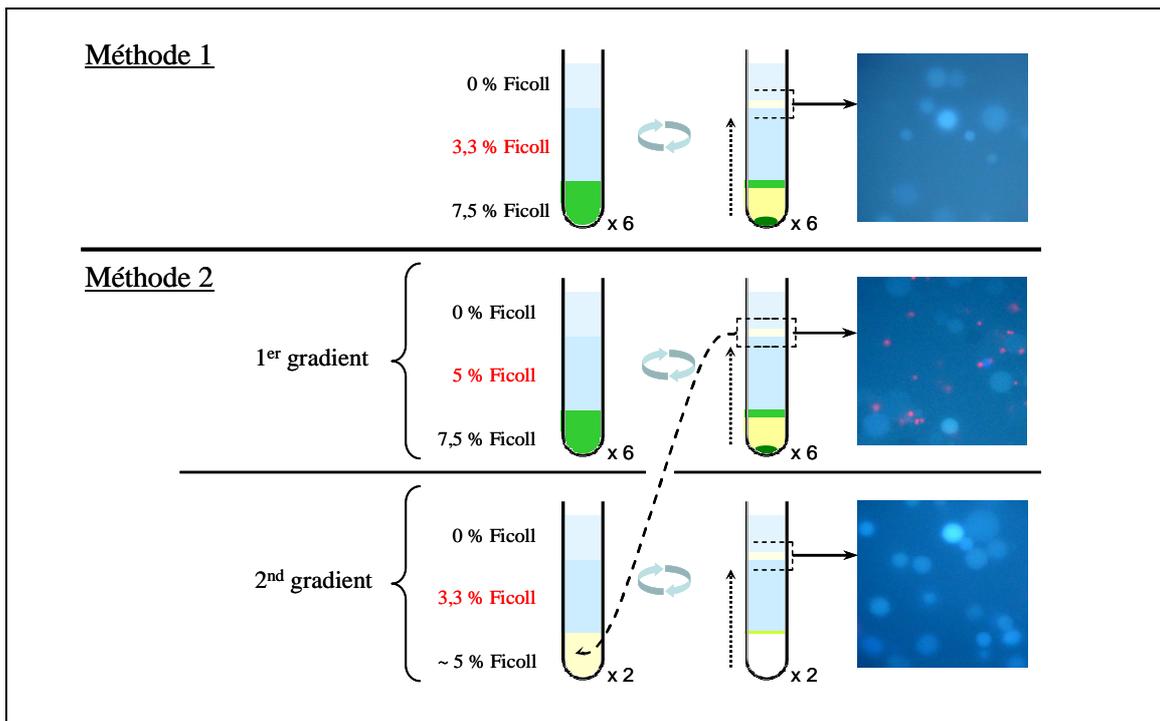


Figure 28 : Méthodes d'isolement des vacuoles, à partir du lysat protoplastique, utilisées lors de ce travail. La méthode 1 consiste à utiliser 6 gradients de densité (7,5 – 3,3 – 0 % de Ficoll), et permet d'obtenir des vacuoles pures, mais peu nombreuses. La méthode 2 consiste à « purifier » les vacuoles sur 6 gradients de densité (7,5 – 5 – 0 % de Ficoll) afin d'obtenir une fraction fortement enrichie en vacuoles. Cette fraction peut alors être purifiée plus avant sur 2 gradients de densité (~ 5 – 3,3 – 0 % de Ficoll) afin d'obtenir des vacuoles de pureté identique à celles de la première méthode, mais réparties sur 2 et non plus 6 gradients. Alternativement, les vacuoles de cette fraction ont pu être utilisées telles quelles lors de la mise au point de certaines expérimentations, ou lorsqu'il était nécessaire de travailler avec des extraits non congelés.

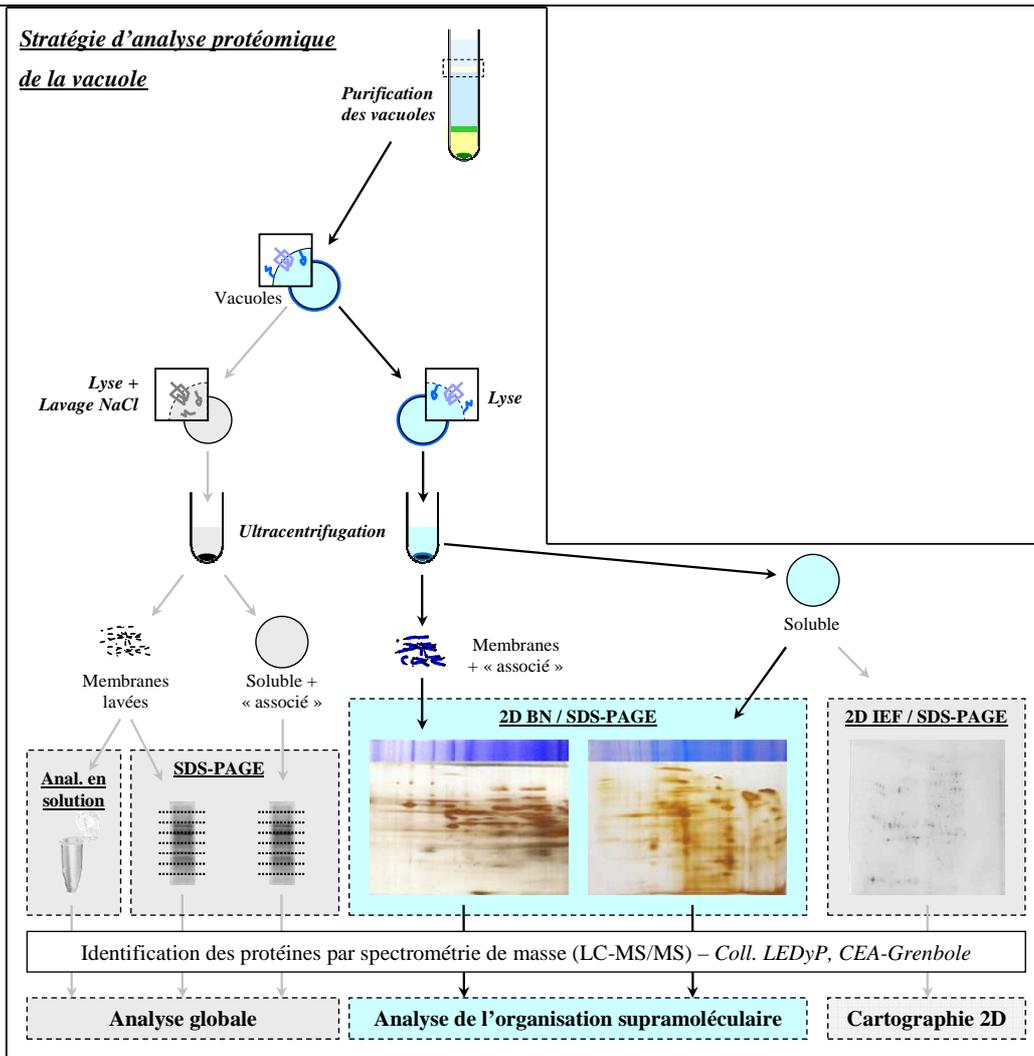


Figure 29 : *Stratégie d'analyse de l'organisation supramoléculaire du protéome de la vacuole d'Arabidopsis thaliana. Des vacuoles ont été purifiées, puis lysées par congélation / décongélation. Les fractions membranaires et solubles ont été séparées par centrifugation, et chacune a fait l'objet d'une électrophorèse en conditions non dénaturantes dans une première dimension, puis en présence de SDS dans une seconde dimension.*

III.2 - Evaluation de l'organisation supramoléculaire du protéome soluble de la vacuole

Après la purification des vacuoles, les organites ont fait l'objet d'une lyse par congélation / décongélation, suivie d'une étape de centrifugation à haute vitesse afin de séparer les fractions solubles et membranaires (Figure 28). La fraction soluble a alors pu être concentrée par

ultrafiltration (système Vivaspin, « cut off » de la membrane = 3 kDa), pour atteindre une concentration finale de 1 µg / mL de protéines. Environ 100 µg de ces échantillons protéiques ont alors été déposés au sommet d'un gel de gradient d'acrylamide, et une électrophorèse en conditions non dénaturantes, en présence de bleu de Coomassie, a permis de séparer les complexes d'une taille variant entre 50 et 1000 kDa. La Figure 30 présente un gel d'électrophorèse de type BN-PAGE, et trois gels de type BN / SDS-PAGE, illustrant l'évolution de la résolution au fur et à mesure de la mise en place du protocole. La comparaison de ces électrophorèses montre que, si la résolution est variable d'une expérience à l'autre, le profil protéique reste quant à lui constant, la plupart des spots étant présents sur l'ensemble des gels réalisés. Cette méthode nous a permis de mettre en évidence un certain nombre de complexes putatifs, probablement impliqués dans des fonctions vacuolaires majeures.

La Figure 30–A présente le profil électrophorétique en conditions non dénaturantes de la fraction soluble de la vacuole, fixé dans un bain éthanol / acide acétique et recoloré au bleu de Coomassie R250. Ce profil fait apparaître clairement une série de bandes, de masses moléculaires allant jusqu'à environ 800 kDa, qui correspondent à des associations protéiques et dont certaines ont pu être analysées par spectrométrie de masse. Parmi celles-ci, quatre, d'une taille supérieure à 500 kDa, sont composés des mêmes protéines, leur présence sous forme de multiples bandes étant très probablement due à un degré d'oligomérisation différent d'un complexe à l'autre. Ces complexes potentiels sont particulièrement intéressants, car ils semblent associer des protéines de type différents : protéases (subtilases et protéines à domaine « Meprin & TRAF » notamment), glycosidases (RGP1), et inhibiteurs de glycosidases (PGIP1 et PGIP2). La présence de ces protéines au sein d'un même complexe est bien entendu à confirmer par des analyses plus ciblées, mais l'identification systématique de ces protéines dans des bandes nettes de la première dimension rend peu probable la présence de plusieurs complexes indépendants.

Deux autres bandes, d'environ 250 et 500 kDa, contiennent deux isoformes de l' α -mannosidase (AT3G26720 et AT5G13980). Connue pour s'associer en multimères (Hutchins & Klionsky, 2001) chez *Saccharomyces cerevisiae*, ces complexes putatifs sont très probablement les formes dimérique et tétramérique de l'enzyme et nous confirmons ici sa structure oligomérique chez la plante. Toutefois, la séparation des protéines en conditions dénaturantes, dans une seconde dimension, permet d'observer un spot majeur de 250 kDa correspondant aux deux α -mannosidases (Figure 30, complexe I), et il apparaît alors que cette protéine se répartit en réalité sur une large échelle de masses après la première dimension (250 à 500 kDa), ce qui pourrait suggérer que ce complexe, en grande quantité dans le protéome soluble, soit relativement labile et se dissocie lors de la préparation des échantillons. La forme dimérique (homo ou hétérodimère), de 250 kDa, serait par contre très stable puisqu'elle résiste à la dénaturation en présence de SDS. Mais nous ne pouvons pas exclure que plusieurs associations protéiques comprenant le dimère d' α -mannosidase

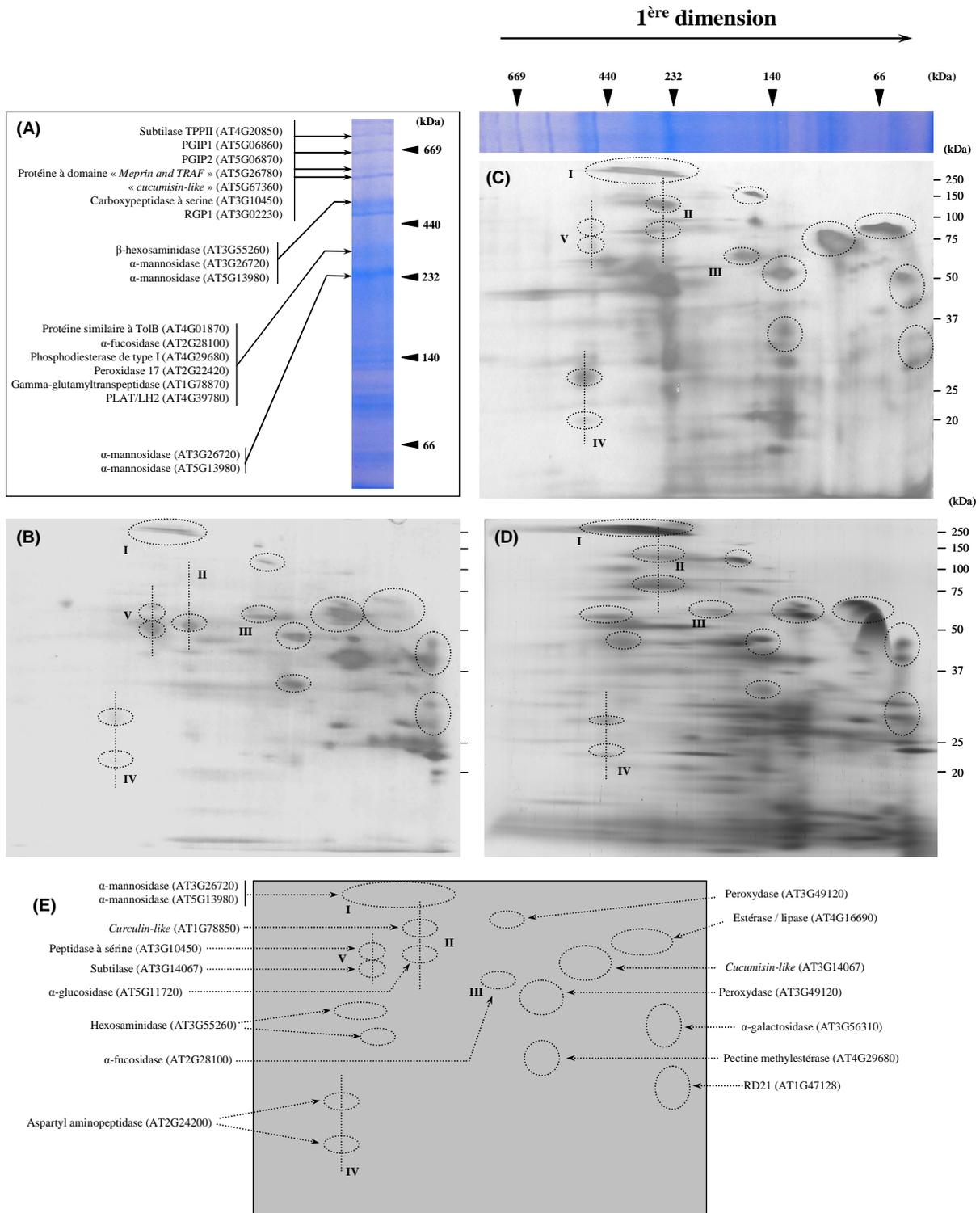


Figure 30 : Mise en évidence des complexes majeurs du protéome soluble par BN-PAGE et BN / SDS-PAGE. (A) : Les échantillons (100 µg) ont fait l'objet, dans un premier temps, d'une électrophorèse en conditions non-dénaturantes sur gradient d'acrylamide (5 % - 13 %). Les complexes protéiques de l'échantillon, préservés, se séparent et il est alors possible d'analyser le contenu protéique des « bandes » obtenues lors de la première dimension. (B à D) : Alternativement, la piste de migration a pu être placée au sommet d'un gel de type SDS-PAGE afin de dissocier les protéines impliquées dans les complexes séparés lors de la première dimension, révélée ensuite par coloration à l'argent. Il est alors quelques fois possible de reconstituer de visu les complexes initiaux. (E) : spots qui ont pu être identifiés.

soient également possibles, composant ainsi un ensemble de différents complexes qui se répartiraient selon les masses moléculaires comprises entre 250 à 500 kDa. Ceux-ci seraient alors composés d'un (ou plusieurs) « noyau(x) » constitué(s) de 2 α -mannosidases, sur le(s)quel(s) viendraient éventuellement s'ajouter diverses protéines. En effet, l'hypothèse d'un tel complexe, modulaire, est notamment soutenue par l'identification systématique, dans la première dimension, des 2 isoformes de l' α -mannosidase dans les mêmes bandes, éventuellement accompagnées d'autres glycosidases, suggérant là encore une association des α -mannosidases entre elles, et parfois avec d'autres hydrolases. Une hexosaminidase (AT3G55260), en particulier, est détectée avec les 2 α -mannosidases dans l'une des bandes de la première dimension, et retrouvée dans la seconde dimension sous formes de deux spots.

D'autres complexes, probablement plus minoritaires, pourraient également faire intervenir des glycosidases. On retrouve notamment une association potentielle entre une α -glucosidase (famille 5, AT5G11720) et une protéine de type lectine (*curculin-like*, AT1G78850) (Figure 30, complexe II). Les lectines sont capables de lier certains sucres, et l'association d'une telle protéine avec une glycosidase pourrait former un complexe protéique dont une sous-unité (la lectine) lierait le substrat, tandis que l'autre (la glucosidase) l'hydrolyserait. Enfin, une α -fucosidase (glycosidase de la famille 29), est également identifiée dans un spot de la seconde dimension (Figure 30, complexe III). La migration de cette protéine lors de l'électrophorèse en conditions non-dénaturantes semble correspondre à celle d'une protéine d'environ 200 kDa. D'une taille de 57 kDa (cohérente avec la valeur estimée à partir de la seconde migration), elle serait présente sous forme trimérique ou tétramérique dans la vacuole, aucune protéine n'étant identifiée sur la même ligne de migration dans la seconde dimension.

Certaines protéases du protéome soluble (ou associées à la membrane) de la vacuole semblent également être présentes sous forme multimérique. Une aspartyl aminopeptidase (AT5G60160), par exemple, est identifiée dans la première dimension à une masse moléculaire d'environ 440 kDa (Figure 30, complexe IV). Cette protéine de 52 kDa est connue pour former des complexes protéiques, et il semble qu'elle soit effectivement associée sous forme d'octamères dans nos échantillons. Mais de façon très intéressante, cette protéine est, dans la seconde dimension, présente dans 2 spots, où elle est identifiée seule. Ces spots correspondent à des protéines d'environ 30 et 22 kDa, ce qui suggère un clivage de la protéine de 52 kDa en 2 peptides, associés en un oligomère (16mère) comparable à l'octamère de la protéine non clivée. Décrite comme étant cytosolique, elle est présente dans les deux cartographies des protéomes solubles cytosolique et vacuolaire. Si sa taille dans le cytosol est effectivement d'environ 52 kDa (Figure 25), la cartographie du protéome vacuolaire confirme sa présence sous une forme, tronquée, d'environ 30 kDa (Figure 23, la protéine de 22 kDa n'ayant pas été identifiée sur ce gel). La présence de cette métalloprotéase dans le protéome soluble vacuolaire n'est donc probablement pas due à sa

dégradation, tel que cela avait été suggéré à l'issue de la comparaison des cartographies, mais plus probablement à son association avec le tonoplaste, ou éventuellement à sa localisation à l'intérieur de la vacuole, les expériences de « *Shave & Conquer* » ne permettant pas de trancher (données non montrées). Cette forme « vacuolaire » différencierait de la forme cytosolique par une maturation *via* un clivage de la protéine, les deux fragments restant liés l'un à l'autre, à l'intérieur de complexes de type 16mère. Un autre complexe potentiel (Figure 30, complexe V) faisant intervenir des protéases est constitué d'une subtilase (AT3G14067) et d'une peptidase à serine (AT3G10450).

Ces analyses préliminaires ont permis d'évaluer l'organisation supramoléculaire du protéome soluble de la vacuole et ont abouti à la mise en évidence de quelques complexes putatifs. Ceux-ci semblent souvent associer différentes protéines d'une même famille (glycosidases ou protéases), suggérant que des complexes enzymatiques à la fois relativement spécialisés (protéolytique ou glycolytique) et multipotentiels (plusieurs enzymes aux substrats différents) puissent assurer une partie des activités hydrolytiques connues de la vacuole. Toutefois un complexe majeur, dont le nombre de sous unité semble variable, pourrait rassembler différentes activités de protéolyse (Subtilase, protéine à domaine Meprin & TRAF) et de glycolyse (RGP1) au sein d'une même structure protéique.

III.3 - Evaluation de l'organisation supramoléculaire du protéome membranaire de la vacuole

La préparation d'échantillons membranaires en vue de réaliser l'identification des complexes protéiques nécessite de mettre au point les conditions de solubilisation des protéines membranaires. La première étape vers l'identification des complexes protéiques tonoplastiques a été de définir les meilleures conditions de préparation des membranes, permettant d'extraire le plus de protéines possibles sans toutefois dissocier les complexes. Deux détergents ont été employés : le dodécyl-maltoside (DDM) et la digitonine. Nous avons, dans un premier temps, déterminé la quantité de détergent nécessaire à la solubilisation des protéines. Plusieurs concentrations de détergent et de protéines ont été testées, de même que différents rapports détergent / protéines. La Figure 31 présente deux gels d'électrophorèse bidimensionnelles BN / SDS-PAGE, réalisés à partir d'échantillons membranaires solubilisés dans des concentrations de détergent différentes (DDM : (A) : 5 % ; (B) : 10 %) pour une même concentration protéique (2, 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

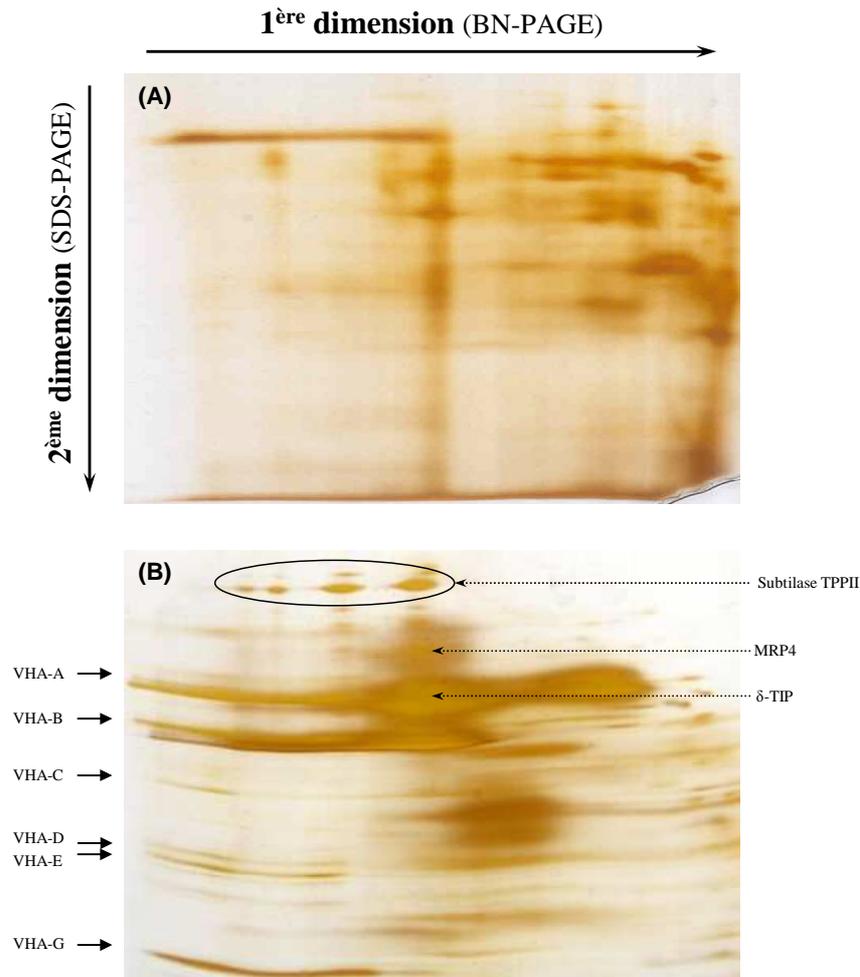


Figure 31 : Premières électrophorèses de type BN / SDS-PAGE, réalisées à partir de 150 μ g de protéines tonoplastiques. Les protéines membranaires ont été reprises à une concentration finale de 2,5 mg.mL⁻¹, et solubilisées dans (A) : 5 % [p/v] de dodécyl-maltoside ou (B) : 10 % [p/v] de dodécyl-maltoside. Leur électrophorèse en conditions non dénaturantes sur un gradient d'acrylamide (5 % - 13 %) a permis de résoudre les complexes majeurs, et une seconde dimension, en présence de SDS, a permis de visualiser les protéines après coloration à l'argent.

La solubilisation des membranes dans 10 % de DDM paraît plus efficace que dans 5 % de détergent, et laisse apparaître quelques complexes potentiels de haut poids moléculaires impliquant une même protéine, la subtilase TPPII. Cette protéase semble une fois de plus particulièrement importante dans le protéome vacuolaire (ou associée à cet organelle), et pourrait être présente sous forme multimérique, à différents degrés d'oligomérisation. Ces structures protéiques semblent être les seules à être bien résolues dans la première dimension. D'autres transporteurs, particulièrement intéressants pour certains, sont en effet majoritairement identifiés dans des traînées, notamment un transporteur de type ABC, MRP4, probablement présent dans un complexe d'environ 250 à 300 kDa. Quelques sous-unités de l'ATPase vacuolaire ont également pu être identifiées (principalement les sous-unités du domaine V1 : VHA-A, VHA-B, VHA-C, VHA-D, VHA-E et

VHA-G). Mais, quoique relativement bien résolues dans la seconde dimension, ces protéines se répartissent sur une large gamme de poids moléculaires dans la première dimension, et illustrent le manque de résolution de l'électrophorèse en conditions non dénaturantes. Nous avons alors cherché à optimiser plus encore les conditions de préparation des échantillons. La composition des tampons initialement utilisés (Imidazole principalement, cf. Matériels et méthodes) a alors été modifiée, et des électrophorèses de type BN-PAGE ont été réalisées dans des milieux constitués de Bis-Tris (Atteia *et al.*, 2003). Cette méthode a permis d'améliorer considérablement la résolution de la première dimension, et des bandes nettes, correspondant à des complexes putatifs de masses moléculaires supérieures à 500 kDa, ont pu être observées. Elles ont alors pu être analysées par spectrométrie de masse, ou utilisées pour réaliser une seconde dimension en conditions dénaturantes (Figure 32).

Peu de complexes différents semblent présents dans le tonoplaste dans ces conditions d'analyse. Sept bandes majeures sont observables sur la première dimension entre 500 et 1000 kDa, contenant toutes la subtilase TPPII, éventuellement accompagnée d'autres protéines. La présence de TPPII sous une forme multimérique chez *Arabidopsis thaliana* a déjà été démontrée, les auteurs ayant estimé la masse moléculaire du complexe à 5 à 9 MDa (Book *et al.*, 2005). Nous l'identifions ici dans des complexes probables de plus faible masse moléculaire, pouvant notamment impliquer des protéines de type HSP60. Il est à ce sujet intéressant de noter que Book *et al.* (2005) mentionnent une contamination de leurs purifications de TPPII par une protéine de type HSP60. Deux protéines de type Band7 (AT5G62740, AT2G03510), de petite taille (30 à 40 kDa), sont aussi présentes dans certains des complexes putatifs analysés (Figure 32) et suggèrent des processus de régulation de l'activité protéolytique de la subtilase. Cette interaction potentielle entre des multimères de TPPII et des protéines de type Band7 n'a jamais été décrite et la présence potentielle de ces deux protéines dans des complexes incluant TPPII met également en évidence un aspect inattendu du protéome vacuolaire. Si l'une de ces protéines Band7 est probablement associée à la face cytosolique du tonoplaste (résultats de l'expérience de *Shave & conquer* (non montré) : protéine absente des échantillons traités à la protéinase K), l'autre semble être au contraire à l'intérieur de la vacuole, l'identification de cette dernière étant meilleure dans les échantillons traités à la protéinase K. Ces résultats, préliminaires, suggéreraient de nouveau que la subtilase puisse être localisée sur les deux faces du tonoplaste, expliquant alors la digestion partielle de cette protéine par la protéinase K. De plus, la seconde dimension a permis d'identifier TPPII dans deux séries différentes de spots, l'une correspondant à la taille prédite de cette enzyme (150 kDa environ), et la seconde, minoritaire, à une protéine de 90 kDa environ. Ce clivage de la protéine, qui n'a jamais été décrit dans la littérature, suggère quant à lui l'existence d'une maturation partielle de cette enzyme, les deux formes de TPPII se retrouvant ensemble dans les mêmes complexes identifiés.

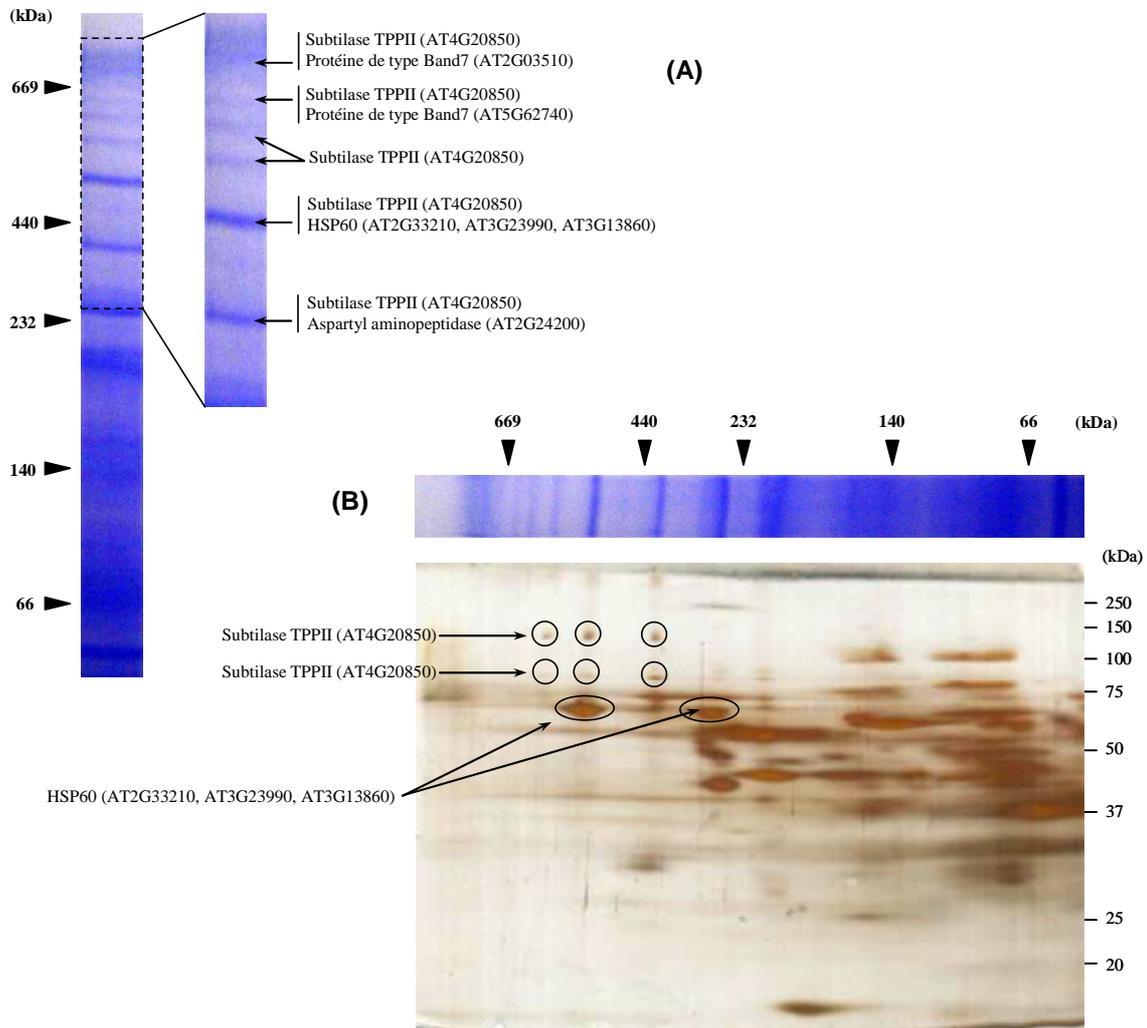


Figure 32 : *Electrophorèse bidimensionnelle de type BN / SDS-PAGE réalisées avec des échantillons membranaires de vacuoles. (A) : la première dimension, consistant en une électrophorèse en conditions non dénaturantes, permet d'observer des bandes de hauts poids moléculaires (supérieures à 500 kDa), relativement bien résolues et séparées les unes des autres. Leur analyse, par spectrométrie de masse, a permis d'identifier la subtilase TPPII dans chacune des bandes, éventuellement associées à d'autres protéines telles que des chaperonnes (HSP60) ou des protéines de type Band7. (B) : la seconde dimension, en conditions dénaturantes, permet de séparer les constituants protéiques des complexes et révèle la présence de 2 isoformes de TPPII, à des poids moléculaires différents.*

L'ATPase vacuolaire, à l'inverse de TPPII, est très faiblement représentée dans les analyses des complexes de la fraction membranaire. Quelques sous-unités ont pu être toutefois identifiées, et sont présentes dans des traînées, de la taille attendue dans la seconde dimension, mais évoquant une dissociation (ou une dégradation) des complexes dans la première dimension. Cette observation a alors posé la question de l'exhaustivité de l'analyse effectuée. Si cette dernière n'a pas pour but

d'établir la liste complète des complexes protéiques de la vacuole, elle doit néanmoins permettre de visualiser la majeure partie de ceux-ci. L'absence d'une bande nette dans la première dimension, correspondant à l'un des complexes les plus représentés de la vacuole, la V-ATPase, nous a alors incité à réaliser une analyse des protéines vacuolaires sans fractionnement préalable des échantillons solubles et membranaires, et sans congélation avant électrophorèse. Ceci a été réalisé dans le but de préserver au maximum l'intégrité des complexes avant leur migration. Pour cela, des vacuoles purifiées sur un gradient de Ficoll composé de trois couches contenant 7,5 ; 5 et 0 % de Ficoll ont été directement utilisées. Cette purification, moins stringente que celle habituellement

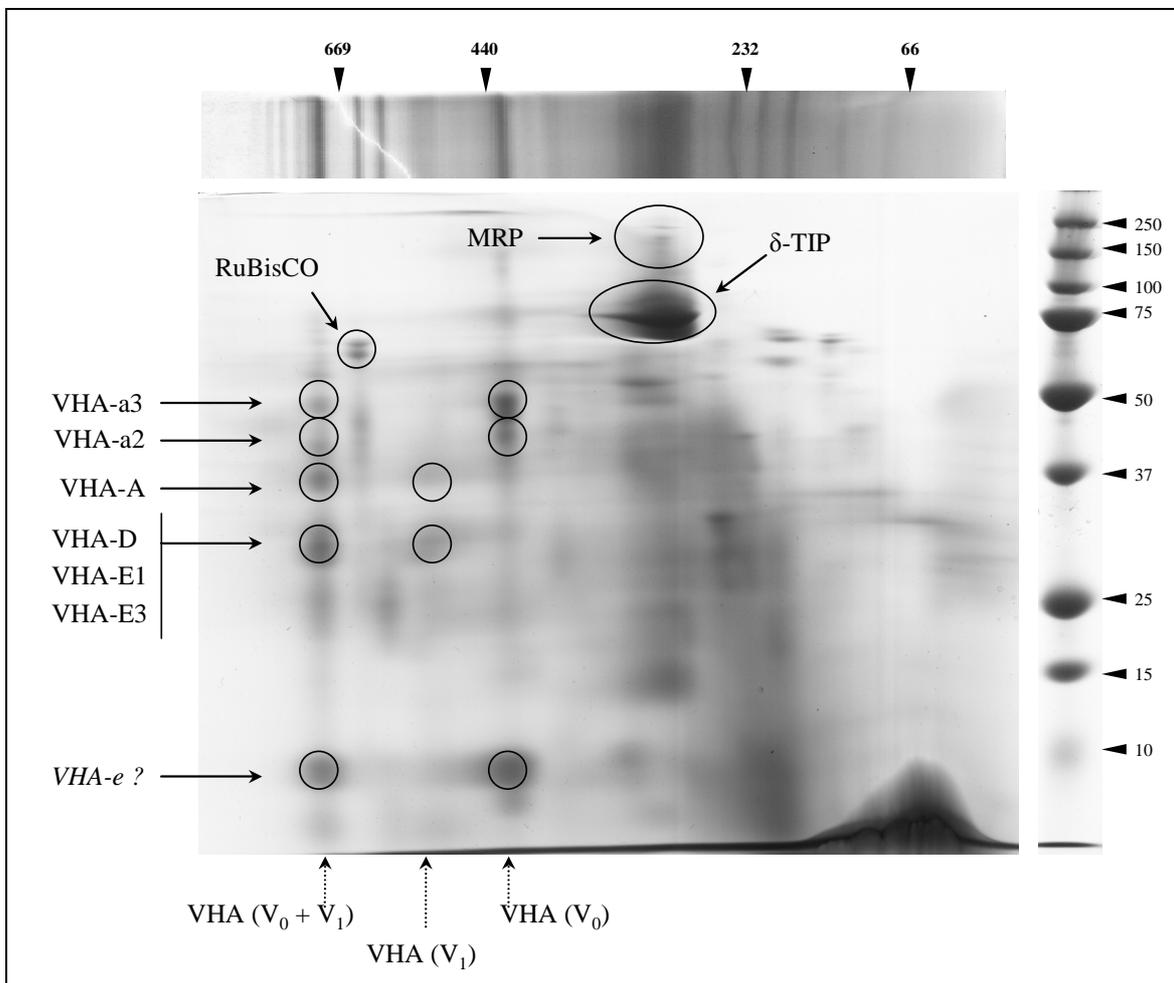


Figure 33 : Séparation des protéines vacuolaires par BN / SDS-PAGE. 200 µg d'échantillons vacuolaires totaux ont été solubilisés dans 10 % [p/v] de dodécyl-maltoside, et ont fait l'objet d'une électrophorèse de type BN-PAGE sur gradient d'acrylamide (5 % - 13 %) afin de séparer les complexes. La piste de migration a alors été placée au sommet d'un gel de type SDS-PAGE afin de séparer les protéines composant les complexes, et les gels obtenus colorés au bleu de Coomassie G250.

réalisée, nous a permis d'obtenir en une seule préparation la quantité de protéines nécessaire à la réalisation des 2 électrophorèses. La préparation des échantillons totaux, malgré leur légère contamination, a alors été réalisée comme précédemment, l'étape de séparation des fractions solubles et membranaires ayant été omise. Cette nouvelle méthode de préparation des échantillons vacuolaires nous a permis d'observer très nettement l'ATPase vacuolaire, présente dans 3 bandes distinctes dans la première dimension (Figure 33). Celles-ci correspondent à la V-ATPase entière, dont la quasi-totalité des sous-unités (VHA-A, VHA-B1, VHA-B2, VHA-C, VHA-D, VHA-E1, VHA-E3, VHA-F, VHA-G2, VHA-H, VHA-a3 VHA-c2, VHA-d1) a pu être identifiée, au domaine V1 seul, et au domaine V0 seul.

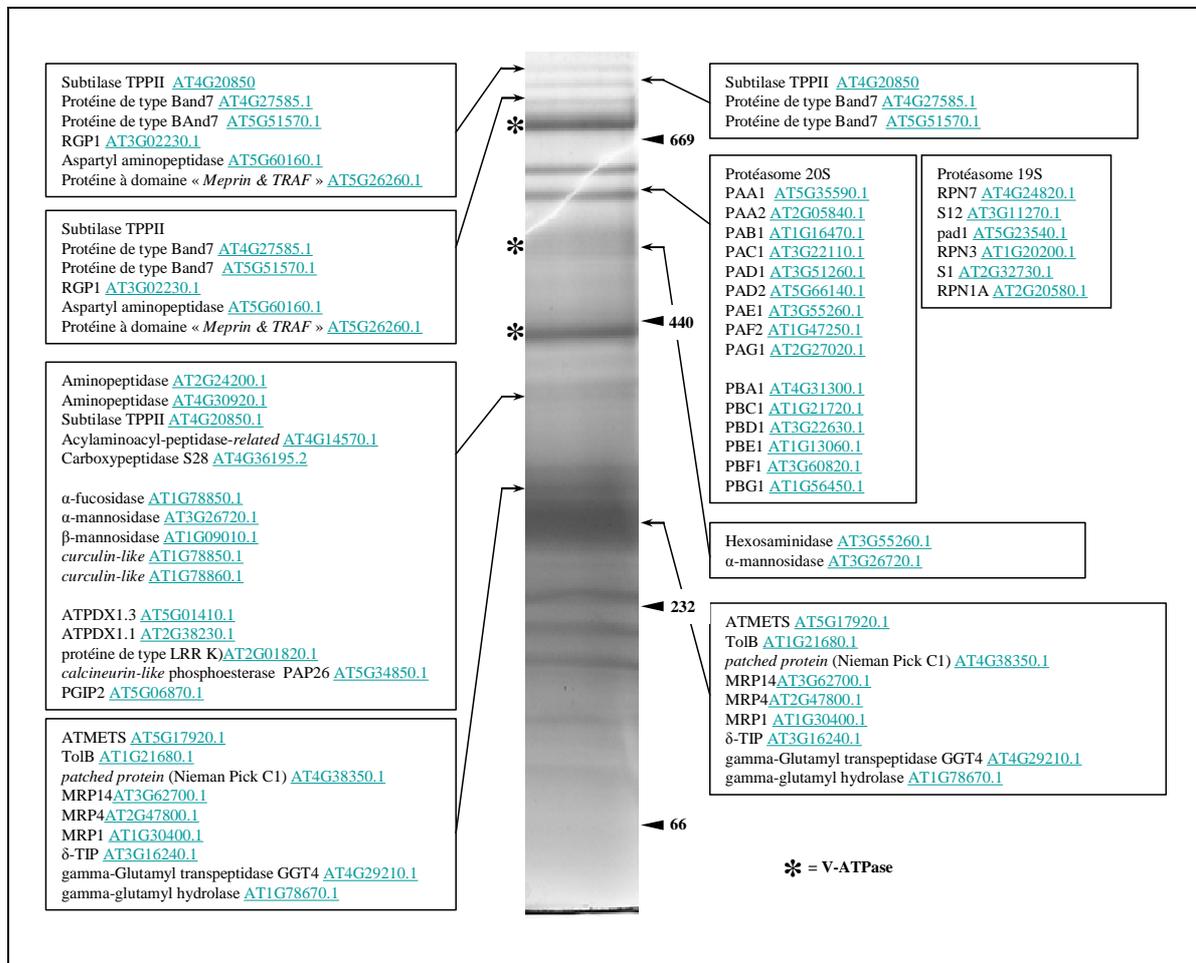


Figure 34 : Séparation des protéines vacuolaires par BN-PAGE. 150 µg d'échantillons vacuolaires totaux ont été solubilisés dans du dodécyl-maltoside (10 % [p/v]), et ont fait l'objet d'une électrophorèse de type BN-PAGE sur gradient d'acrylamide (5 % - 13 %) afin de séparer les complexes. La piste de migration a alors été colorée au bleu de Coomassie G250, et les bandes majeures ont été découpées et analysées par spectrométrie de masse. Le résultat des analyses est indiqué sur la figure.

L' α -mannosidase est également représentée. Minoritaire au sein des protéines identifiées, elle illustre la faible proportion des protéines solubles dans le protéome total de la vacuole, la quasi-totalité des identifications réalisées mettant en évidence des transporteurs. On peut noter en particulier la présence de l'aquaporine TIP2.1 (*Tonoplast Intrinsic Protein*), probablement majoritaire dans le protéome membranaire. Cette protéine est connue pour être sous forme multimérique dans des complexes suffisamment stables pour résister à la dénaturation par le SDS (Vander Willigen *et al.*, 2006), et nous observons ici une forme à 75 kDa, trimérique. Mais elle apparaît aussi, dans la première dimension, dans des structures d'environ 300 kDa, et s'il est possible qu'elle forme des dodécamères, il est également envisageable que les trimères de TIP soient aussi associés à d'autres protéines, identifiées dans la même bande de la première dimension. On retrouve notamment 3 transporteurs de type ABC (MRP1, MRP2 et MRP14) impliqués dans le transport des conjugués du glutathion, mais aussi une gamma-glutamyl transpeptidase et une gamma-glutamyl hydrolase, susceptibles de les dégrader. L'association potentielle de telles protéines en une même structure est particulièrement intéressante, toutes ces protéines étant impliquées des processus de détoxification vacuolaire.

Les processus de dégradations protéiques sont encore une fois relativement bien représentés. L'association de TPPII avec des protéines de type Band7 se confirme, bien que les deux protéines Band7 identifiées lors de cette analyse (AT4G27585 et AT5G51570) ne correspondent pas à celles identifiées lors des précédentes. D'autres protéases telles que des aspartyl aminopeptidases, ou des protéines à domaine « Meprin & TRAF », caractérisées précédemment pour leur présence au sein de complexes de hauts poids moléculaires, sont aussi présentes. Dans certaines bandes (Figure 34), la quasi-totalité des sous-unités du protéasome 20S a pu être identifiée, ainsi qu'une grande partie des protéines composant le protéasome 19S, ces résultats confirmant l'association du protéasome avec la vacuole. Nos analyses mettent également en évidence que la subtilase TPPII ne semble pas associée au protéasome.

III.4 - Conclusion

Contrairement à des organites tels que la mitochondrie ou le chloroplaste, la vacuole ne comprend pas de complexe majeur, aisément observable *via* une analyse de type BN-PAGE (Schagger & Pfeiffer, 2000 ; Heinemeyer *et al.*, 2004). L'estimation de l'organisation supramoléculaire du protéome vacuolaire par BN / SDS-PAGE nous a alors permis de mettre en évidence plusieurs complexes putatifs. Bien que la réalité physiologique des associations supposées reste à confirmer par d'autres approches, l'utilisation des BN-PAGE dans le contexte de ce travail de thèse s'est révélée adaptée à l'identification de schémas organisationnels protéiques globaux.

Cette approche nous a permis de mettre en évidence un certain nombre d'interactions potentielles entre différentes protéines. Ces analyses ont notamment suggéré l'association probable de plusieurs glycosidases entre elles, sans doute souvent organisées autour d'un noyau constitué d'un dimère d' α -mannosidase. Certaines protéases semblent également impliquées dans des superstructures protéolytiques, comprenant éventuellement des unités potentiellement régulatrices telles que les protéines de type Band7. Parmi ces protéases, la subtilase TPPII a été identifiée dans des multimères de tailles très importantes. L'ATPase vacuolaire est, elle aussi, retrouvée dans des complexes protéiques de tailles différentes suggérant soit une certaine labilité, soit l'existence de formes dissociées dans le tonoplaste. Elle est présente sous des degrés de complexation variables, de l'ATPase entière aux domaines V0 ou V1 seuls. Enfin, certaines bandes de la première dimension pourraient correspondre à des associations incluant des transporteurs de type ABC et des enzymes de la dégradation des conjugués du glutathion. De telles structures pourraient participer de façon importante aux processus de la détoxification cellulaire.

Toutefois les constituants exacts de ces complexes n'ont pu être précisément déterminés, de même que leurs proportions relatives, un tel travail nécessitant une approche ciblée sur chaque complexe potentiel. Des conditions de préparation des échantillons et d'électrophorèse étant établies, les perspectives de ce travail sont notamment l'identification de complexes protéiques évoluant suite à une exposition au cadmium, ce que seule une approche non ciblée de cet ordre pourrait mettre en évidence. Ainsi observés, ces complexes pourraient alors faire l'objet d'une caractérisation plus poussée visant à en identifier précisément les constituants.

Chapitre III

*Vers une recherche de candidats à la
détoxification métallique vacuolaire*

Chapitre III : Vers une recherche de candidats à la détoxification métallique vacuolaire

L'équipe dans laquelle j'ai réalisé mon travail de thèse s'intéresse à la réponse de la plante à un stress métallique, et souhaite en particulier comprendre les mécanismes de la séquestration vacuolaire de ces toxiques. Les acteurs impliqués dans les processus de signalisation du stress et de séquestration et traitement des métaux ne sont pas connus, et l'identification des protéines de la vacuole peut permettre de mettre en évidence des éléments potentiellement impliqués dans la détoxification vacuolaire des métaux lourds. L'objectif de ma thèse était donc de réaliser une caractérisation protéomique de la vacuole d'*Arabidopsis thaliana* dans le but de mettre en place les méthodes d'analyses de ce protéome et d'en établir un profil de référence. Ainsi, plusieurs transporteurs ont été localisés à la vacuole par nos travaux, et certains d'entre eux sont connus pour être, chez d'autres organismes, déterminants dans la réponse aux stress métalliques (transporteurs ABC en particulier). L'évaluation du rôle de ces protéines dans la tolérance aux métaux, *via* l'analyse de mutants par exemple, pourrait aboutir à l'identification de voies métaboliques de la protection cellulaire lors de tels stress. Une autre approche, visant à étudier la dynamique du protéome vacuolaire lors d'un stress, pourrait également mettre en évidence des acteurs de la réponse vacuolaire au stress métallique. L'analyse protéomique que nous avons réalisée constitue également la base des études quantitatives différentielles envisagées, et qui seront réalisées, pour la plupart, *a posteriori*.

L'un des aspects de la dynamique du protéome vacuolaire auquel nous avons souhaité nous intéresser est la régulation transcriptionnelle des gènes codant les protéines localisées à la vacuole. Des analyses d'expression génique réalisées au Laboratoire des Echanges Membranaires et Signalisation (CEA-Cadarache) en collaboration avec notre équipe ont permis d'étudier l'influence d'un stress cadmium sur la régulation transcriptionnelle du génome d'*Arabidopsis thaliana* (Herbette *et al.*, 2006). Cette analyse rend compte de l'évolution des transcrits dans des plantules cultivées en hydroponie et soumises à 5 μM et 50 μM de cadmium pendant 2 h, 6 h et 30 h. L'exploitation croisée de ces résultats avec ceux de l'analyse protéomique vacuolaire pourrait mettre en évidence des protéines requises à la mise en place des mécanismes étudiés, et une partie

de mon travail a consisté à initier cette analyse, afin de proposer des pistes dans l'identification des fonctions métaboliques impliquées dans la détoxification vacuolaire des métaux lourds.

I - Recherche de protéines vacuolaires à régulation transcriptionnelle par le cadmium

I.1 - Création d'une base informatique pour l'exploitation de données d'expression génique et de protéomique

Le développement constant des techniques d'analyses à haut débit (puces à ADN et spectrométrie de masse par exemple) et la grande quantité de données qu'elles génèrent nécessitent de mettre en place des structures informatiques capables de les accueillir. Les Systèmes de Gestion de Bases de Données Relationnelles (SGBDR) permettent l'implémentation, le stockage, la modification, et l'interrogation de données informatiques. Le « package » EasyPHP (v1.7) est disponible gratuitement (www.easyphp.org) et contient le SGBDR « MySQL » (v4.0.15). L'installation d'EasyPHP inclut l'installation du serveur « Apache » (v.1.3.27), un logiciel destiné à héberger la base de données et à traiter les flux d'informations entrant et sortant de celle-ci, et qui servent à son exploitation (Figure 35-A). Ce serveur communique avec le reste de l'ordinateur et notamment avec le navigateur internet (partie client), puisque c'est *via* ce dernier que l'utilisateur peut interagir avec la base (Figure 35).

La base de données relationnelle que nous avons créée, en collaboration avec Olivier Bastien (LPCV, CEA-Grenoble), a été nommée ArHeS (*Arabidopsis Heavy metal Stress*), et contient deux tables (Figure 35-B) : *microarray*, qui stocke les valeurs issues des analyses d'expression génique sur puce (Herbette *et al.*, 2006), et *proteomics*, qui accueille les résultats de l'analyse protéomique vacuolaire que nous avons réalisée (Jaquinod *et al.*, 2007a). La table *proteomics* (qui contient 709 entrées) comprend une série de champs contenant les différentes valeurs issues de nos analyses (valeurs de score, fonctions des protéines etc ...) et un champ unique pour l'identification de chacune des entrées de la table : le champ *AGI* (qui correspond au numéro d'accension AGI (The Arabidopsis Genome Initiative (AGI), 2000) de chaque protéine). De la même manière, la table *microarray* contient 23 797 entrées, et des champs correspondants aux résultats des différentes comparaisons (2 h d'exposition à 5 μ M Cd *vs.* contrôle à 2 h, 6 h d'exposition à 50 μ M Cd *vs.* contrôle à 6 h, etc ...). L'identifiant unique de cette table est constitué du couple de champs *AGI* et *Index*, un même locus pouvant être représenté par plusieurs sondes nucléiques sur la puce à ADN (auquel cas plusieurs entrées de la table auraient le même champ *AGI*). Un index (a, b, c ...) de la

sonde permet donc de différencier des résultats provenant de sondes différentes pour un même gène. Les données ont été insérées dans la base grâce à un script PHP (*hypertext preprocessing* ; Figure 36), un langage de programmation côté serveur destiné à faire le lien avec la partie client (Figure 35-D).

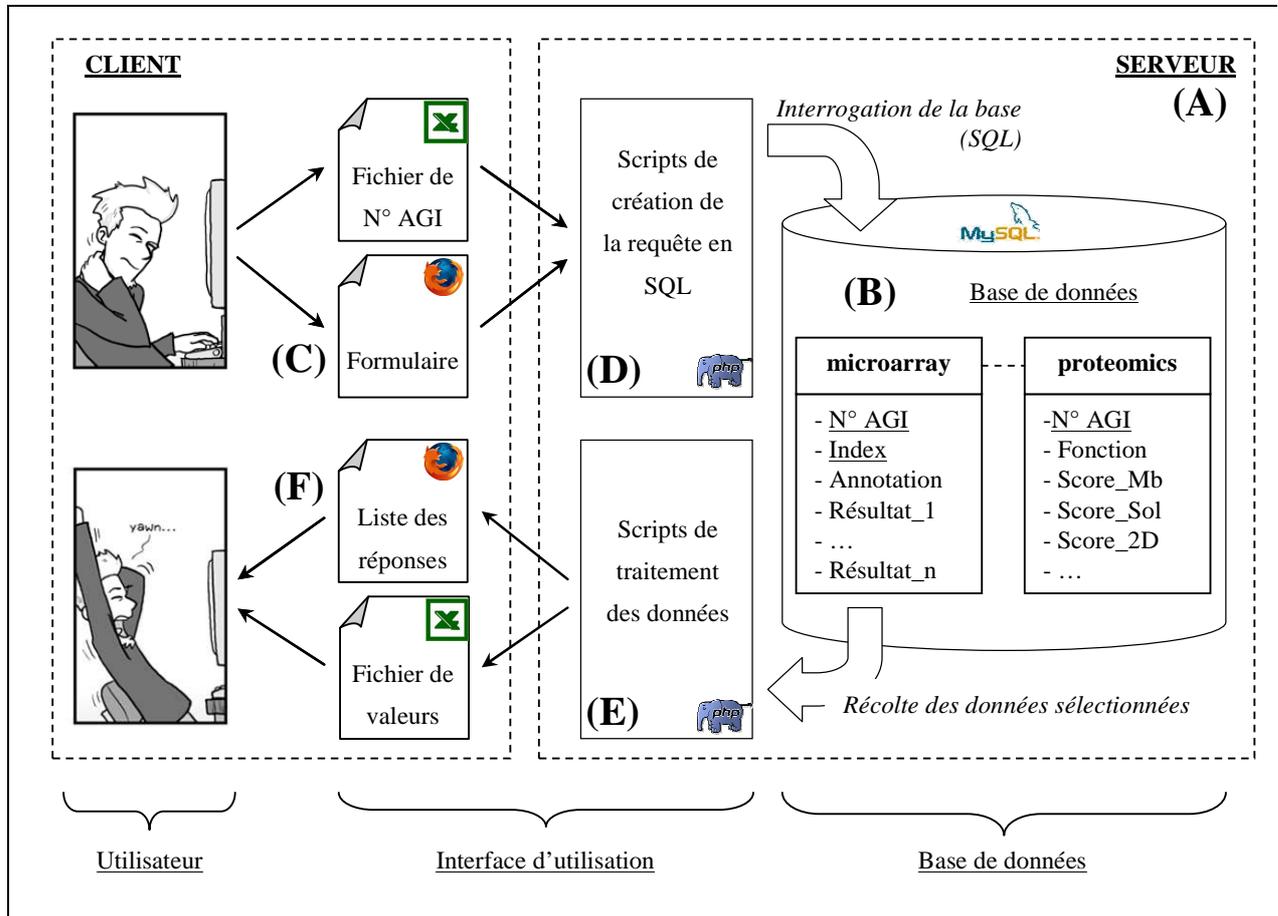


Figure 35 : Structure générale de la base de données ArHeS et de son interface d'exploitation. Le serveur Apache (A) héberge la base de données ArHeS (B) et l'interpréteur PHP qui permet de générer automatiquement les requêtes SQL permettant de l'interroger (C). L'utilisateur peut exploiter les données contenues dans la base grâce à une interface codée en HTML (interprétée par un navigateur internet), ou via la lecture de fichiers informatiques (Excel® ou texte). Les formulaires HTML ou les fichiers informatiques sont ensuite interprétés par les scripts PHP (D) pour l'interrogation de la base, et les résultats à nouveau traités par des scripts PHP (E). Ils peuvent être alors affichés à l'écran via l'interface HTML ou exportés sous forme de fichier informatique (F).

L'interface graphique d'interrogation de la base et de présentation des résultats à l'écran est codée par des scripts HTML (*HyperText Markup Langage*), interprétés par un navigateur internet (Microsoft Internet Explorer® ou Mozilla Firefox® par exemple) à la manière de pages web (Figure 35-C). Cette interface se compose notamment de deux formulaires contenant des informations à saisir et des options à spécifier pour interroger les données de transcriptomique

(Figure 37-A) et de protéomique (Figure 37-B). Ces scripts intègrent également des scripts PHP servant à créer de façon automatique des requêtes SQL (*Structured Query Language*), un langage informatique d'administration et d'interrogation de certaines bases de données (Figure 35-D). Une fois que les informations qui ont été saisies par l'utilisateur sont transcrites en requête SQL, la base de données peut être interrogée et les entrées de la base répondant aux critères spécifiés sont sélectionnées. Ces entrées sont alors traitées par un nouveau script PHP afin qu'elles soient intégrées à un nouveau script HTML (Figure 35-E), servant à afficher la liste des gènes / protéines renvoyées par ArHeS (Figure 35-F, Figure 38-A). Les N° AGI de cette liste sont « cliquables », ce qui a pour effet de renvoyer une requête SQL vers la base de données, qui à son tour retourne les informations spécifiques au locus sélectionné. Elles sont affichées sur une nouvelle page HTML, spécifique aux informations que souhaite consulter l'utilisateur : résultats de protéomique (Figure 38-B) ou de transcriptomique (Figure 38-C).

Cette base de données s'est révélée très utile dans l'exploitation de nos résultats d'analyses protéomiques vacuolaires, notamment grâce à un module supplémentaire de l'interface qui permet d'exporter les données dans un fichier texte ou dans un tableur (Microsoft Excel® par exemple, Figure 35-F). Mais c'est surtout dans l'exploitation des données de transcriptomique que l'utilisation d'une base de données informatique s'est trouvée être adaptée, en particulier pour la sélection des gènes dont les produits ont été identifiés dans la vacuole et dont l'expression est régulée par le stress cadmium.

```

<?php
$file = "nom_du_fichier_de_valeurs"
$db = "nom_de_la_base_de_données"
$ficreq = fopen ($file,"w");
fwrite($ficreq,"use ".$db."\n");
fwrite($ficreq,"LOAD DATA LOCAL INFILE '". $file.'" INTO TABLE `nom_de_le_table`
        \ FIELDS TERMINATED BY ';' ENCLOSED BY '\"' ESCAPED BY '\\\\'
        \ LINES TERMINATED BY '\n' (`liste`,`des`,`champs`,`de`,`la`,`base`)\n");

fclose($ficreq);
$maj = "C:\Progra~1\EasyPHP1-7\mysql\bin\mysql -u root < ".$file;
exec($maj);
?>

```

Figure 36 : *Script PHP d'insertion des valeurs contenues dans le fichier « nom_de_fichier » dans la base de données « nom_de_la_base_de_données ».*

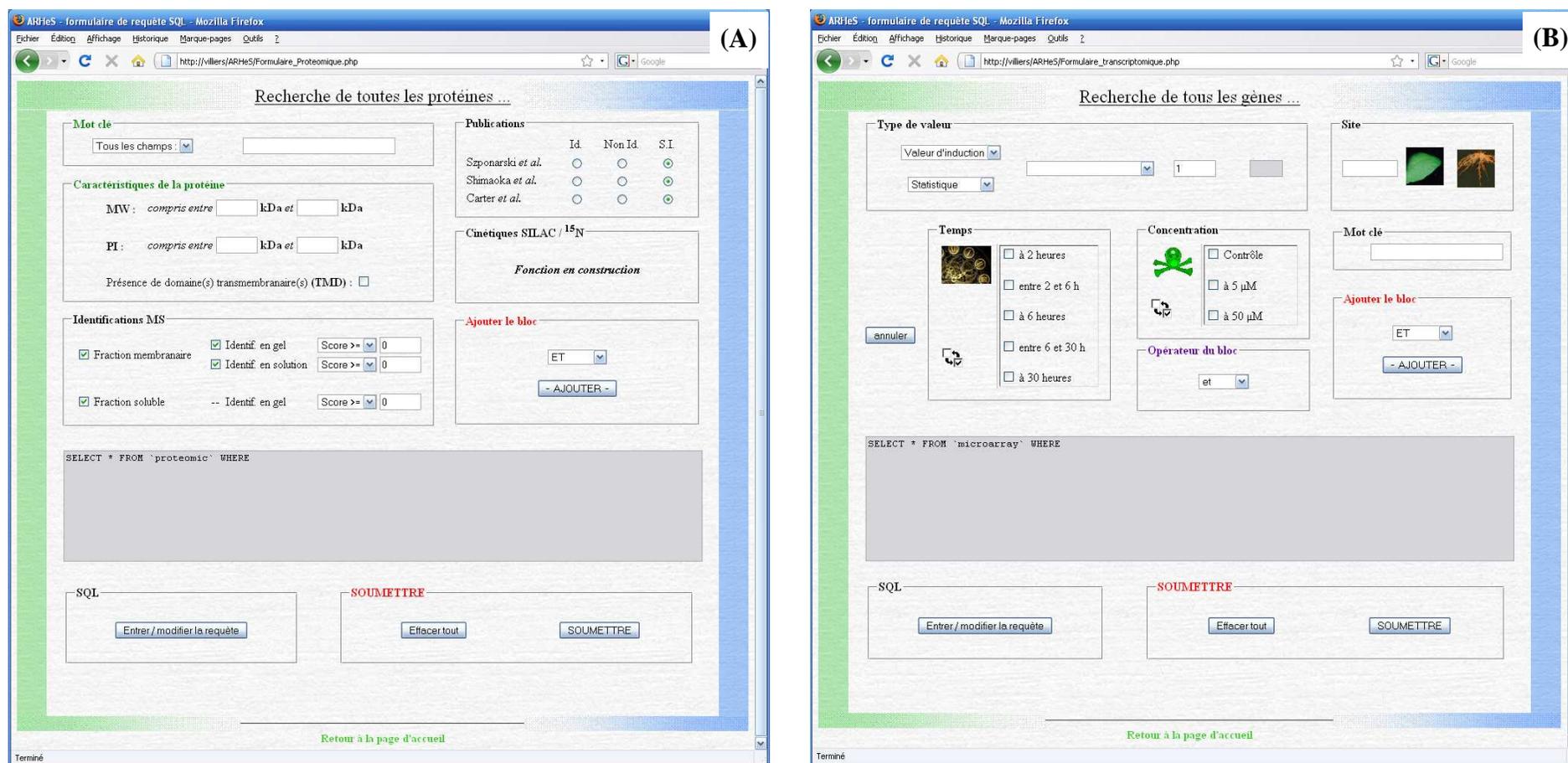


Figure 37 : Captures d'écran des interfaces d'interrogation des tables proteomics (A) et microarray (B) d'ArHeS. Les requêtes SQL pour sélectionner des données de la base peuvent être générées à partir de formulaires. Une interface graphique, adaptée à la table que l'on souhaite interroger, permet de sélectionner les champs sur lesquels on souhaite effectuer la requête, et de spécifier la valeur souhaitée. Une requête est créée par l'ajout successif de conditions reliées les unes aux autres par des opérateurs booléens (et, ou, et non, ou non). La requête est affichée en langage SQL au fur et à mesure de l'ajout de conditions, et éventuellement modifiable par l'utilisateur avant d'être transmise à la base de données.

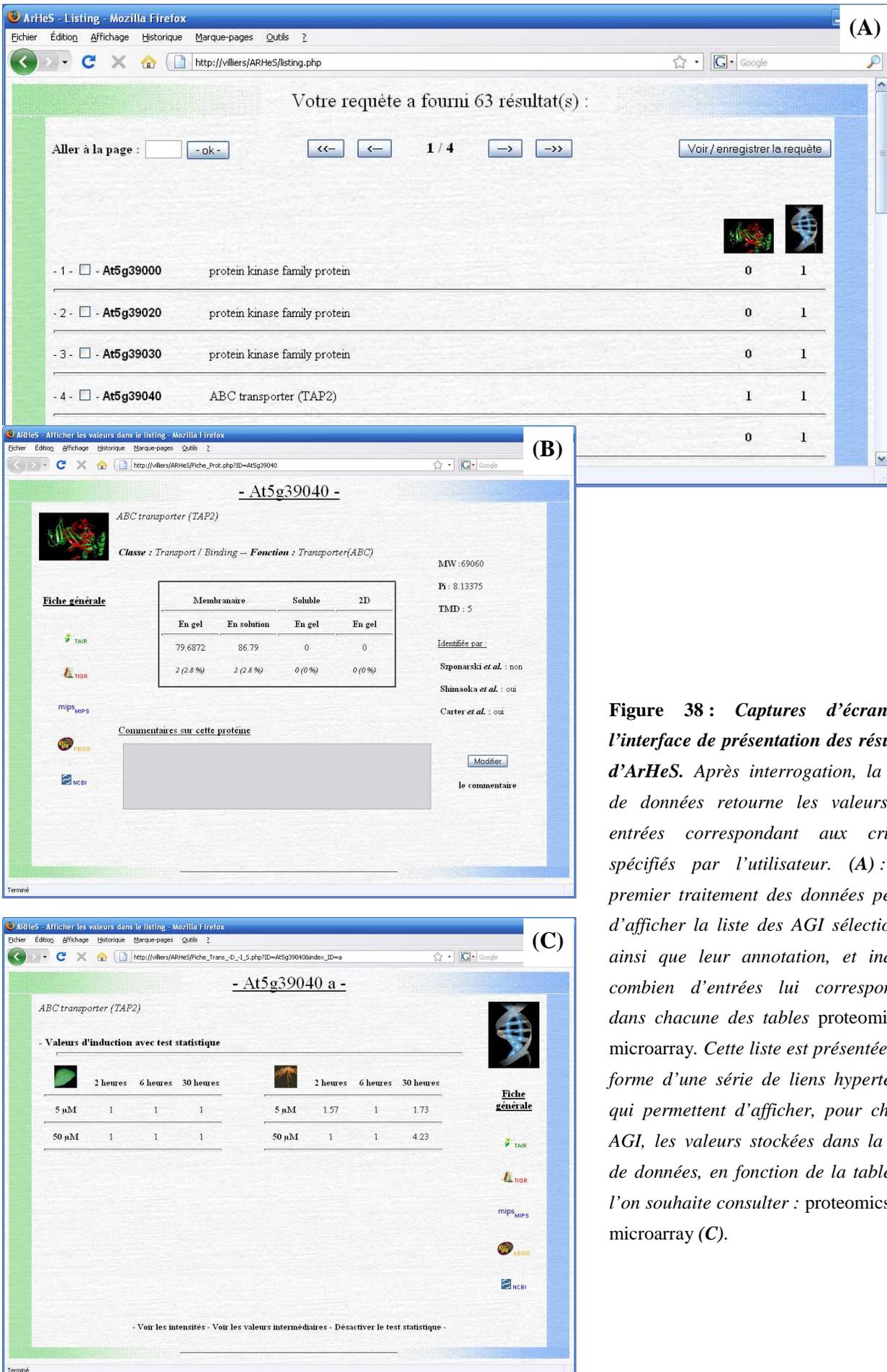


Figure 38 : Captures d'écran de l'interface de présentation des résultats d'ArHeS. Après interrogation, la base de données retourne les valeurs des entrées correspondant aux critères spécifiés par l'utilisateur. (A) : Un premier traitement des données permet d'afficher la liste des AGI sélectionnés ainsi que leur annotation, et indique combien d'entrées lui correspondent dans chacune des tables proteomics et microarray. Cette liste est présentée sous forme d'une série de liens hypertextes, qui permettent d'afficher, pour chaque AGI, les valeurs stockées dans la base de données, en fonction de la table que l'on souhaite consulter : proteomics (B), microarray (C).

I.2 - Analyse croisée des données d'analyses transcriptomiques et protéomiques

I.2.1 - Mise en place de l'analyse croisée

Les identifications réalisées par les différents travaux de protéomique vacuolaire sont très complémentaires. Les différentes méthodes utilisées et le matériel végétal divers à partir duquel ont été purifiées les vacuoles (intactes ou non), ont conduit à l'identification de plus de 1000 protéines différentes. Afin d'optimiser la recherche de protéines localisées à cet organe présentant une régulation transcriptionnel de leur expression, nous avons choisi d'utiliser l'ensemble des protéines identifiées chez *Arabidopsis thaliana* comme référence du protéome vacuolaire. Les N° AGI identifiés dans les travaux de Szponarski *et al.* (2004), Shimaoka *et al.* (2004), Carter *et al.* (2004) et par nos travaux ont été placés dans un fichier texte. Un module de la base de données ArHeS a alors été utilisé pour extraire l'ensemble de ces numéros, et sélectionner la liste non redondante de

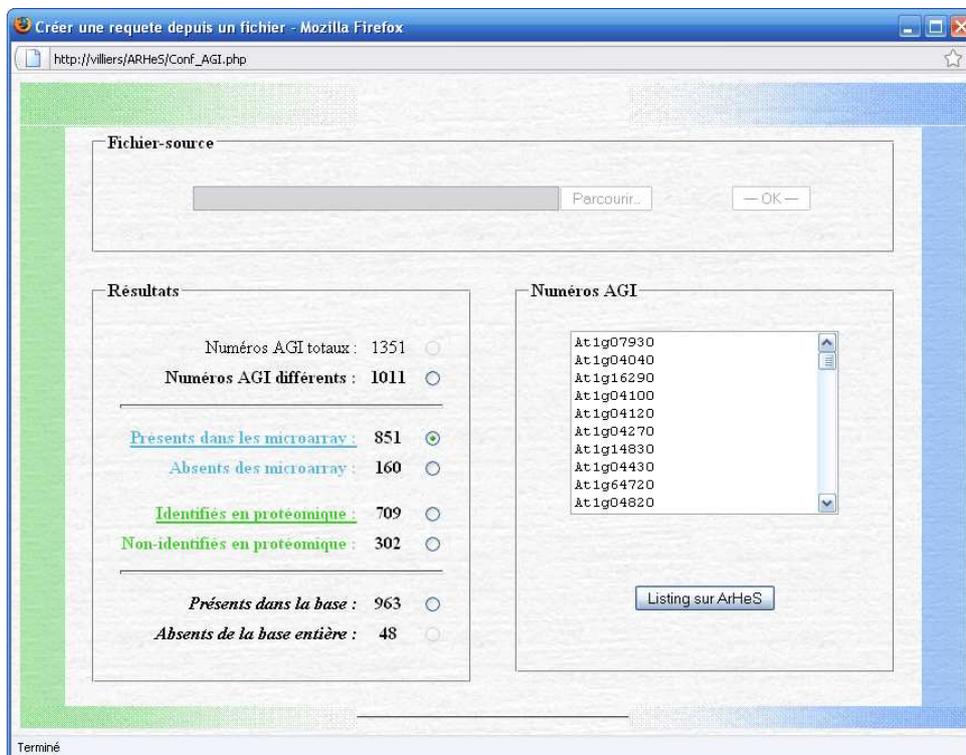


Figure 39 : Capture d'écran de l'interface du module de détection de N° AGI de ArHeS. Un fichier texte regroupant l'ensemble des identifications réalisées par Szponarski *et al.* (2004), Shimaoka *et al.* (2004), Carter *et al.* (2004) et nos travaux a été utilisé pour sélectionner les gènes présents dans la table microarray et dont les protéines ont été identifiées à la vacuole par des analyses de spectrométrie de masse. Sur 1011 protéines non-redondantes, 851 sont présentes dans la table microarray, ou dans la table proteomics.

ceux d'entre eux qui étaient présents dans la table *microarray* (Figure 39). Sur 1011 gènes dont les protéines ont été identifiées dans la vacuole ou associée à cet organelle par l'ensemble des études mentionnées, 851 sont présents sur la puce d'analyse CATMA (dans la table *microarray*), et 709 loci sont présents dans la table *proteomics* (correspondant aux 709 protéines que nous identifions). Cette sélection a alors été sauvegardée dans la base de données. Dans un second temps, les gènes dont l'expression est régulée lors d'un stress cadmium ont été sélectionnés à partir de la table *microarray*, via le formulaire d'interrogation (Figure 37-B).

Un second module d'ArHeS a alors été utilisé afin de confronter les deux sélections sauvegardées. Ce module a pour fonction de lister les N° AGI correspondants aux requêtes choisies par l'utilisateur (et précédemment sauvegardées) et propose de réaliser une seule sélection non-redondante, de ne conserver que les protéines communes aux deux sélections, ou de retirer les résultats de l'une des listes des résultats de l'autre. Le résultat de l'analyse croisée (pour la sélection des numéros AGI communs) des protéines vacuolaires présentes dans la table *microarray* (Figure 40, sauvegarde N° 1) et des gènes induits par le cadmium (Figure 40, sauvegarde N° 2) a alors débouché sur l'établissement de la liste des gènes codant des protéines vacuolaires dont le niveau d'accumulation de transcrite est modifié par un stress cadmium. A partir d'une liste de 1351 protéines vacuolaires, correspondant à l'addition des résultats des travaux considérés dans cette approche, l'utilisation de la base de données a permis la sélection des protéines non redondantes (1011), puis de celles pour lesquelles des résultats d'analyse d'expression génique étaient disponibles dans la base (851 gènes / protéines). Enfin, parmi cette dernière sélection, 250 gènes dont l'expression est régulée par le cadmium ont pu être mis en évidence et exportés dans un tableur.

I.2.2 - Protéines vacuolaires à régulation transcriptionnelle par le cadmium

Les critères successivement appliqués à la table *microarray* (protéine identifiée par spectrométrie de masse, niveau de transcrite modulé lors d'un stress cadmium) ont abouti à la sélection de 258 entrées de cette table, correspondant à 250 protéines différentes. Sept d'entre elles sont en effet représentées par plusieurs sondes sur la puce : 3 sondes pour une L-ascorbate peroxidase (APX1, At1g07890), et deux sondes pour une strictosidine synthase (At1g74020), une protéine à domaine C2 (At2g01540), une protéine non connue (At2g07707), une ATPase (At2g07698), une catalase (At4g35090) et une delta-1-pyrroline-5-carboxylate déshydrogenase (P5CDH, At5g62530).

Parmi ces 250 protéines, plusieurs appartiennent à des fonctions métaboliques dont l'implication lors du stress étudié n'est pas surprenante. Trois peroxidases sont notamment induites dans les feuilles et dans les racines, ainsi que d'autres protéines de la réponse au stress telles que 2

HSP (*Heat Shock Protein*), des glutathione S-transferases (2), ou bien encore une glutaredoxine et une glutathione réductase (Tableau XII). L'analyse croisée a également fait apparaître plusieurs autres processus intéressants impliquant la vacuole, et c'est en particulier la classe des transporteurs et les protéines de la signalisation cellulaire / régulation protéique qui ont suscité notre intérêt.

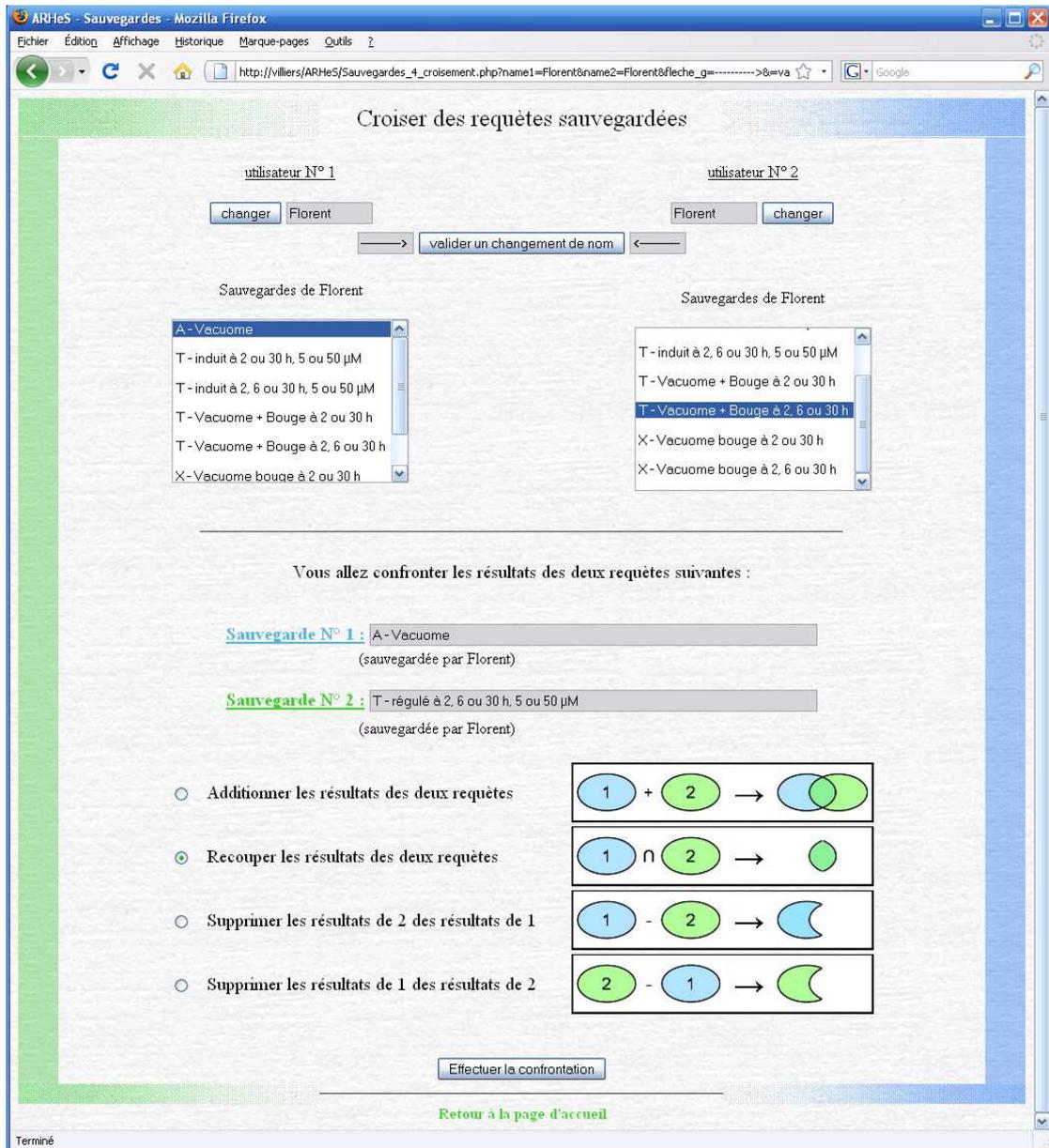


Figure 40 : Capture d'écran de l'interface du module croisement de requêtes de ArHeS. Les résultats des requêtes sauvegardées correspondant aux sélections des N° AGI identifiés dans la vacuole d'une part et aux gènes induits à 2 h, 6 h et 30 h d'exposition à 5 µM et 50 µM Cd d'autre part ont été confrontés. Les N° AGI communs aux deux listes, correspondant aux protéines vacuolaires régulées au niveau transcriptionnel par le cadmium, ont été ainsi sélectionnés et ont pu être par la suite exportés dans un tableur. Le Tableau XII présente une partie des résultats ainsi sélectionnés.

Tableau XII : Sélection de 52 protéines vacuolaires codées par des gènes dont le niveau d'accumulation de transcrits est régulé lors d'un stress cadmium. L'analyse croisée des résultats de protéomique vacuolaire (travaux de Szponarski et al. (2004) (Sz), Shimaoka et al. (2004) (Sh), Carter et al (2004) (Ca) et les nôtres (Ja)) avec les résultats d'analyses transcriptomiques effectuées par Herbette et al (2006) ont permis de sélectionner 250 protéines vacuolaires dont l'expression génique est régulée par le cadmium. Le tableau présente une partie de ces protéines avec les rapports d'expression des gènes correspondants dans les feuilles et les racines après 2 h, 6 h et 30 h d'exposition à 5 et 50 µM Cd. **Id** : index de la sonde nucléique de la puce CATMA. **Rouge** : induction, **Vert** : répression.

Locus	id	FEUILLES						RACINES						Fonction	Ja	Ca	Sh	Sz
		5 µM Cd			50 µM Cd			5 µM Cd			50 µM Cd							
		2 h	6 h	30 h	2 h	6 h	30 h	2 h	6 h	30 h	2 h	6 h	30 h					
Transporteurs																		
At5g39040	a	1	1	1	1	1	1	1,57	1	1,73	1	1	4,23	ABC transporter (TAP2)	x	x	x	
At2g34660	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,91	ABC transporter (MRP2)	x		x	
At2g47800	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2,04	ABC transporter (MRP4)	x	x	x	x
At1g04120	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	ABC transporter (MRP5)	x			
At3g13090	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1,96	1	1	4,08	ABC transporter (MRP6)	x			
At1g61890	a	2,2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,75	2,08	MATE efflux family protein			x	
At1g71140	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2,75	MATE efflux family protein	x			
At5g67330	a	1	1	2,38	1	1	1,83	1	1	1	1	1	1	NRAMP metal ion transporter 4 (NRAMP4)		x	x	
At1g60960	b	0,57	1	0,4	1	1	0,25	0,6	1	1	0,52	1	0,53	Metal transporter. putative (IRT3)	x			
At4g30190	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,5	ATPase 2 putative	x			
At2g41560	a	0,58	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,56	Calcium-transporting ATPase 4 (ACA4)	x	x		
At1g53210	a	1	1	1	1	1	1	0,6	1	1	1	1	1	Sodium/calcium exchanger family protein	x	x		x
At5g15090	a	1	1	0,59	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Voltage-dependent anion-selective channel putative	x	x	x	
At3g26520	a	1	1	1	1	1	0,44	1	0,65	0,59	1	1	0,12	gamma tonoplast intrinsic protein (TIP1.2)	x	x		
At2g36830	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,21	gamma tonoplast intrinsic protein (TIP1.1)	x	x		
At3g16240	a	1	1	1	1	1	1	0,55	0,51	1	1	1	0,28	delta tonoplast integral protein (TIP2.1)	x	x		
At4g17340	a	1	1	1	1	1	1	0,52	0,4	1	1	0,52	0,2	delta tonoplast integral protein (TIP2.2)	x	x		
At3g61430	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,56	0,24	Plasma membrane intrinsic protein 1A (PIP1A / PIP1.1)			x	
At2g45960	a	1	1	1	1	1	1	0,61	1	1	1	1	0,35	Plasma membrane intrinsic protein 1B (PIP1B / PIP1.2)			x	
At4g35100	a	1	1	0,59	1	1	0,54	1	0,63	1	1	0,53	0,2	Plasma membrane intrinsic protein (SIMIP)				x

Locus	id	FEUILLES						RACINES						Fonction	Ja	Ca	Sh	Sz			
		5 µM Cd			50 µM Cd			5 µM Cd			50 µM Cd										
		2 h	6 h	30 h	2 h	6 h	30 h	2 h	6 h	30 h	2 h	6 h	30 h								
At2g23150	a	1	1	1	1	1	1,82	1	0,48	1	1	1	1	1	1	NRAMP metal ion transporter 3 (NRAMP3)	x		x		
Signalisation / Régulation protéique																					
At1g18210	a	1	1	1	1	1	2,3	1	1	1	1	1	1	1	1	Calcium-binding protein. putative			x		
At2g33380	a	2,1	1	1	1	1	2,6	1	1	1	1	1	1	1	1	Calcium-binding RD20 protein (RD20)			x		
At5g61790	a	2,77	1	1	1	2,23	2,62	1	1	1	1	1	1	1,75	1	Calnexin 1 (CNX1)	x	x		x	
At1g76530	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,95	1	Auxin efflux carrier family protein				x	
At1g69840	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2,11	1	Band 7 family protein	x	x		x	
At3g01290	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2,3	1	Band 7 family protein	x	x		x	
At5g01820	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,65	1	1	3,63	CBL-interacting protein kinase 14 (CIPK14)				x
At1g06840	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2,75	LRR transmembrane protein kinase putative	x			
At4g17530	b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,93	Ras-related GTP-binding protein. putative	x	x		
At3g22060	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,82	Receptor protein kinase-related				x
At5g44020	a	1	1	1	1	1	1	1	1	0,62	0,54	1	1	0,39	1	Acid phosphatase class B				x	
At3g20500	a	1	1	1	1	1	1	1	1	0,55	1	1	1	1	1	Calcineurin-like phosphoesterase	x				
At1g78230	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,54	1	Leucine-rich repeat protein				x	
At1g48480	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,49	1	LRR transmembrane protein kinase putative	x				
At1g16920	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,47	1	Ras-related GTP-binding protein putative	x				
At5g47520	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,58	1	Ras-related GTP-binding protein putative	x				
At3g19820	a	1	1	1	1	1	1	1	1	0,57	1	1	0,59	1	0,6	Cell elongation protein / DWARF1 / DIMINUTO (DIM)	x	x		x	
At5g13710	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,56	1	Sterol 24-C-methyltransferase				x	
At2g03510	a	1	0,64	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Band 7 family protein	x				
Protéines de réponse au stress																					
At2g47730	a	1,87	1	1	1	1,99	1	1	1	1,51	1	1	1	2,27	1	Glutathione S-transferase 6 (GST6)	x				
At1g78380	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1,6	1	1	1	1,71	1	Glutathione S-transferase putative	x				
At3g24170	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3,68	Glutathione reductase putative	x				
At5g40370	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,85	Glutaredoxin. putative	x	x			
At3g09440	a	1	1	1	1	2,19	1	1	1	1	1	1	1	1	2,45	Heat shock protein (HSC70-3)	x				
At5g09590	a	1,8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Heat shock protein (HSC70-5)	x				

Locus	id	FEUILLES						RACINES						Fonction	Ja	Ca	Sh	Sz									
		5 μ M Cd			50 μ M Cd			5 μ M Cd			50 μ M Cd																
		2 h	6 h	30 h	2 h	6 h	30 h	2 h	6 h	30 h	2 h	6 h	30 h														
At1g71695	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Peroxidase 12 (PER12)	x	x			
At3g49110	a	1	1,72	1	1	1,93	12,55	1	1	1	1	1	1	16	1	1	1	1	1	1	1	1	Peroxidase 33 (PER33)		x		
At5g06730	a	1	1	1	1	1	3,94	1	1,52	2,19	1	1	2,14	17,15	1	1	1	1	1	1	1	1	Peroxidase putative	x			
At2g30860	a	1	1	0,6	1	1	1	0,57	1	1	0,55	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Glutathione S-transferase putative		x		
Autres protéines																											
At1g78680	a	1	1	1	1	1	1	1	0,37	0,51	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	gamma-glutamyl hydrolase (GGH1)	x	x		
At1g78660	a	1	1	1	1	1	1	1	0,58	0,6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	gamma-glutamyl hydrolase putative	x			
At5g25250	a	1	0,56	1	1	1	4,53	1	2,62	2,33	1	1	2,53	8,51	1	1	1	1	1	1	1	1	Expressed protein				

1.2.2.1 - Transporteurs

L'expression de plusieurs transporteurs localisés à la vacuole est réprimée lors d'un stress. De façon tout à fait notable, par exemple, les aquaporines identifiées dans l'ensemble des travaux considérés sont particulièrement réprimées. Les 4 *Tonoplast Intrinsic Protein* (TIP) que nous identifions (cf. p. 77), mais également 3 aquaporines plasmalemmiques (*Plasma Membrane Intrinsic Proteins*, PIP) identifiées par Carter *et al.* (2004) et par Shimaoka *et al.* (2004), probablement contaminantes, sont fortement réprimées dans les racines après 30 h d'exposition à 50 μM Cd (0,12 à 0,35 fois l'expression dans le contrôle). Certaines sont également réprimées dès 6 h d'exposition à 50 μM Cd (TIP2.2, PIP1.1, SIMIP), et certaines le sont aussi en présence de seulement 5 μM Cd, à partir de 6 h d'exposition (TIP1.1, TIP2.1 et TIP2.2). L'influence connue du cadmium sur la balance hydrique de la plante (Poschenrieder *et al.*, 1989) est ici remarquablement représentée par la régulation importante des aquaporines, en particulier des TIP.

Des transporteurs de type ATPase (At4g30190, At2g41560), ainsi que des canaux ioniques (At1g53210, At5g15090), sont aussi réprimés. L'expression du transporteur de zinc IRT3, par exemple, est très rapidement régulée négativement, dès deux heures d'exposition à 5 μM ou 50 μM Cd. Il a été suggéré que cette protéine participe au transport du zinc et à son accumulation dans le cytosol. Localisée à la vacuole d'après nos analyses, elle pourrait permettre l'efflux de métaux lourds essentiels depuis la vacuole vers le cytosol en cas de carence. Potentiellement dangereuse lors d'un stress, son expression serait réprimée afin de limiter les pertes vacuolaires du cadmium en cours de séquestration. Une telle régulation d'IRT3 par un excès de métaux lourds est d'ailleurs appuyée par les travaux de Talke *et al.*, 2006, qui observent une répression de l'expression d'IRT3 lors d'un stress zinc¹.

A l'inverse, le transporteur de métaux NRAMP4, également localisé à la vacuole, présente une régulation transcriptionnelle positive dans les feuilles, après 30 h d'exposition à 5 μM ou 50 μM Cd (respectivement d'un facteur 2,38 et 1,83, Tableau XII). NRAMP3, dont l'adressage à la vacuole a été confirmé par des fusions traductionnelles avec la GFP ((Thomine *et al.*, 2003), est induit de façon très similaire (d'un facteur 1,82) à NRAMP4 dans les feuilles après 30 h d'exposition à 50 μM Cd (mais est par contre inhibé transitoirement dans les racines après 6 h d'exposition à 5 μM Cd). Ces deux protéines ont été décrites comme étant impliquées dans le transport de fer depuis la vacuole vers le cytosol, en particulier lors d'une carence (Thomine *et al.*, 2003) ou au cours de la germination (Lanquar *et al.*, 2005). Des travaux visant à évaluer leur implication sur la tolérance d'*Arabidopsis thaliana* au cadmium ont également mis en évidence leur capacité à transporter ce métal vers le cytosol, des mutants *nramp3* présentant alors un phénotype

¹ Les auteurs ne mentionnent toutefois pas de répression de l'expression du gène IRT3 après une exposition au cadmium, le niveau de transcrite étant stable dans leurs conditions lors d'un tel stress.

de résistance au cadmium (Thomine *et al.*, 2000). L'identification par cette équipe des protéines NRAMP3 et NRAMP4 en tant que facteurs de sensibilité lors d'un stress cadmium illustre les phénomènes de fuites ioniques vacuolaires lors de la compartimentation des métaux lourds, et l'observation d'une régulation positive de ces protéines en présence de cadmium pourrait expliquer le phénotype de sensibilité auquel ils sont associés.

Mais parmi les protéines dont les niveaux de transcrits s'accumulent lors d'un stress, deux types de transporteurs sont particulièrement intéressants. L'étude réalisée a en effet mis en évidence l'induction de l'expression par le cadmium de 5 Transporteurs de type ABC (*ATP Binding Cassette*), et de 2 de la famille des MATE (*Multidrug And Toxin Extrusion*) efflux. Ces protéines, connues pour être impliquées dans le transport de métabolites toxiques, pourraient participer activement à la détoxification du cytosol lors d'un stress. Mais c'est surtout à la famille des protéines ABC qu'appartiennent les transporteurs vacuolaires de levure identifiés comme ayant une activité de transport des complexes PC-Cd (*SpHMT1*, Ortiz *et al.*, 1992) et GSH-Cd (*ScYCF1*, Li *et al.*, 1997), ce qui ouvre d'intéressantes perspectives dans l'identification de l'homologue végétale de cet acteur principal de la détoxification métallique vacuolaire. A l'exception d'un seul, les transporteurs ABC sont induits pour les temps les plus longs (MRP6 : 30 h à 5 μ M et 50 μ M Cd, Tableau XII), voire, certaines fois, pour les concentrations les plus fortes uniquement (MRP2, MRP4 et MRP5 : 30 h à 50 μ M Cd, Tableau XII). TAP2, à l'inverse, est induit, de façon transitoire, à 2 h sur 5 μ M Cd. Ce transporteur est connue pour son activité de transport de l'aluminium vers la vacuole (Larsen *et al.*, 2007) une fonction probablement impliquée dans les processus de tolérance à ce métal puisque des mutants *tap2* présentent un phénotype d'hypersensibilité à l'aluminium. Au contraire du cadmium, l'aluminium n'est toutefois pas inducteur de l'expression du gène *TAP2* et cette différence dans la régulation de l'expression génique lors d'un stress métallique (Cd ou Al) suggère l'existence de réseaux de signalisations cellulaires plus ou moins spécifiques du métal impliqué dans le stress.

1.2.2.2 - Protéines de la signalisation cellulaire / Régulation protéique

Les protéines impliquées dans les mécanismes de la signalisation sont d'ailleurs relativement bien représentées dans la sélection effectuée des protéines vacuolaires régulées par le cadmium. Certains intermédiaires protéiques des cascades de signalisation sont induits (récepteur de type *Leucine-Rich Repeat* (LRR) : At1g06840 ; protéines G : At4g17530 ; kinases : At3g22060) et d'autres inhibés (récepteur LRR-kinase : At1g48480 ; protéines G : At1g16920, At5g47520). D'autres protéines sont à rattacher à des mécanismes de régulation d'activité protéique. Les protéines de type Band 7, par exemple, sont peu connues mais sont décrites comme étant impliquées dans la régulation de l'activité de protéines membranaires, notamment les canaux ioniques. Leur régulation à un niveau transcriptionnel ne semble toutefois pas essentielle à la mise

en place des processus de la lutte contre le stress cadmium, les deux protéines induites (At1g69840, At3g01290) ne l'étant que tardivement, et pour les conditions de stress les plus intenses (racines, après 30 h d'exposition à 50 μ M Cd).

L'identification d'éléments déterminants de la régulation de la réponse au stress métallique suppose que l'on recherche des acteurs impliqués précocément dans les processus mis en place. De façon surprenante, seulement 4 gènes codant des protéines vacuolaires impliquées dans des processus de signalisation sont régulés dès 2 h d'exposition au cadmium. Deux d'entre eux, induits, codent des protéines de liaison au calcium (At2g33380, At5g61790), et pourraient constituer les intermédiaires d'une cascade de signalisation. Une kinase identifiée par les travaux de Carter *et al.* (2004), CIPK14 (*CBL-Interacting Protein Kinase*), est aussi induite dès 2 h d'exposition à 5 et à 50 μ M Cd (respectivement d'un facteur 1,65 et 1,75). Il est intéressant de noter que cette augmentation du niveau de transcrits est également observable après 30 h d'exposition à 50 μ M Cd (mais pas à 6 h d'exposition), alors que pour une exposition à 5 μ M Cd l'induction est transitoire, et n'est plus observable à 6 h ou à 30 h de stress. Cette protéine est connue pour interagir avec CBL2 (*Calcineurin B-Like Protein*, Akaboshi *et al.*, 2008), que nous avons identifiée dans les gels bi-dimensionnels, et pour être induite par les sucres (Lee *et al.*, 2005). Le rôle de cette protéine n'est pas connu, mais les auteurs proposent que sa régulation exploite un réseau de signalisation impliquant les sucres en tant qu'intermédiaire (Sheen *et al.*, 1999).

Une autre protéine présente également une régulation transcriptionnelle après 2 h d'exposition à 5 et à 50 μ M Cd, maintenue à 30 h sur 50 μ M Cd. Cette protéine, DWARF1 (At3g19820), est impliquée dans la voie de biosynthèse d'une classe d'hormone, les brassinostéroïdes (BR), et est réprimée par le stress cadmium. Cette observation est d'autant plus intéressante qu'une autre enzyme de la voie de biosynthèse, une stérol-méthyltransférase (At5g13710), figure également parmi les protéines vacuolaires dont l'expression est inhibée par le stress cadmium. Ces résultats pourraient suggérer que la mise en place de la réponse de la plante au stress métallique exploite la signalisation BR-dépendante, et que celle-ci puisse impliquer des composantes vacuolaires de la protection cellulaire.

I.3 - Conclusion

L'utilisation de techniques à haut débit dans l'étude de fonctions biologiques génère un grand nombre de données, ce qui pose souvent le problème de leur exploitation. La recherche de protéines vacuolaires potentiellement impliquées dans la détoxification métallique a abouti, suite à l'analyse protéomique effectuée, à l'identification de 709 protéines, portant le total des protéines

vacuolaire identifiées chez *Arabidopsis thaliana* par des techniques de spectrométrie de masse à 1011.

Afin de focaliser notre attention sur les candidats les plus pertinents, nous avons initié un travail d'étude de la dynamique vacuolaire lors d'un stress cadmium. Dans ce cadre, l'un des buts de cette thèse était de mettre en place des outils nécessaires au suivi de l'évolution qualitative et quantitative du protéome au cours d'un stress : établissement d'un profil protéique vacuolaire de référence (analyse globale, cartographie 2D), mise en place de méthodes d'analyses (BN-PAGE), mais aussi développement d'outils informatiques d'aide à l'exploitation de données. Ce dernier aspect a consisté à mettre en évidence les protéines vacuolaires codées par des gènes dont l'expression est régulée par un stress Cd.

Les différentes protéines (250) identifiées par cette approche sont pour certaines très intéressantes (transporteurs, intermédiaires de la signalisation cellulaire, enzymes de la voie de biosynthèse d'une hormone), et nous avons souhaité évaluer plus avant l'implication effective de l'une d'entre elles.

II - Identification d'un acteur potentiel de la réponse vacuolaire de la plante au stress cadmium

II.1 - DWARF1 / DIMINUTO, intervient dans une voie de biosynthèse régulée par le stress cadmium

DWARF1 (DWF1) est une protéine membranaire (1 segment transmembranaire prédit) identifiée suite à nos travaux de protéomique vacuolaire (scores MASCOT de 1183) et dont nous avons pu confirmer la localisation. Cette enzyme est impliquée dans la conversion des stérols en brassinostéroïdes, une classe d'hormones végétales intervenant dans les processus de sénescence, d'embryogenèse, de vascularisation, d'élongation cellulaire ou encore dans les réponses aux stress abiotiques (pour revue, voir Asami *et al.*, 2005 ; Kagale *et al.*, 2007). Les brassinostéroïdes (BR) sont classés en trois familles suivant le nombre d'atomes de carbone qu'ils comptent (27, 28 ou 29 ; Figure 41), la classe principale étant la famille C28, à laquelle appartient notamment le brassinolide, le plus actif des brassinostéroïdes connus (Yokota, 1997). Leur biosynthèse dérive de la voie du mévalonate (Figure 42), à partir de laquelle est synthétisé le 24-méthylénélophénol, précurseur des brassinostéroïdes de type C28 et C29 (les brassinostéroïdes de type C27 dérivent du cycloarténol, un précurseur de synthèse du 24-méthylénélophénol). La protéine DWF1 catalyse la conversion du 24-méthyléncholestérol en campesterol ou en 25-méthyl, 24-méthyléncholestérol, et de

l'isofucostérol en isostérol (Figure 42). Cette activité est essentielle à la production de la plupart des brassinostéroïdes, et un mutant de cette protéine (*dwf1*) présente une réduction importante de la quantité de brassinostéroïdes endogènes, associé à un phénotype marqué de nanisme, une fertilité réduite et une croissance lente (Klahre *et al.*, 1998).

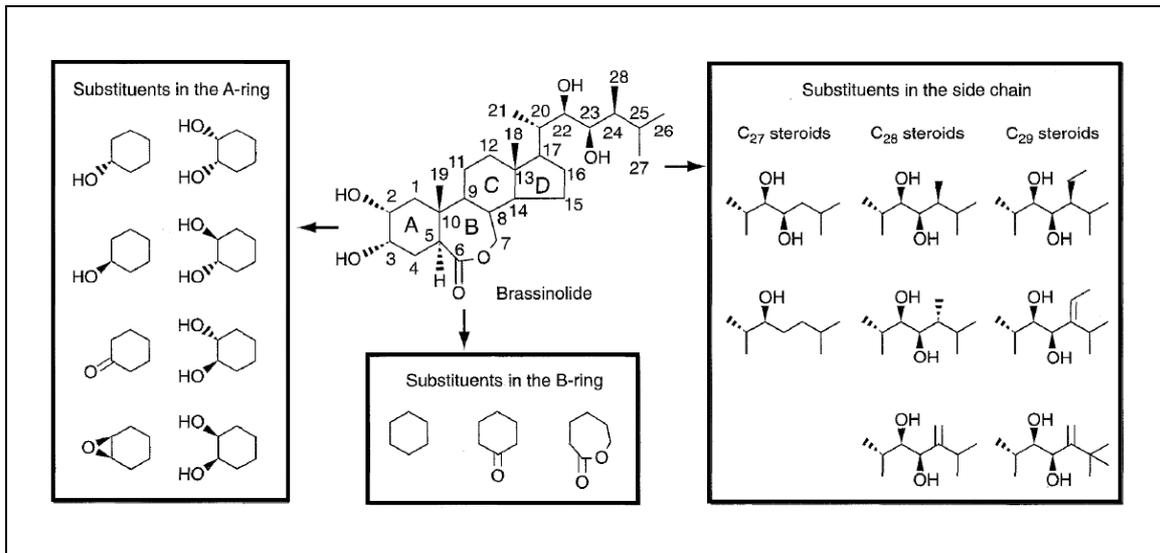


Figure 41 : Structure des brassinostéroïdes. Les variations portent sur les cycles A et B, ainsi que sur la chaîne latérale. En particulier, le nombre d'atome de carbone qu'elle contient détermine la classe du brassinostéroïde correspondant : C27, C28 (méthylation du carbone 24) et C29 (éthylation du carbone 24, méthylation des carbones 24 et 25). La molécule représentée est le brassinolide, le brassinostéroïde le plus actif. D'après Yokota, 1997.

Les analyses croisées des données de protéomique et de transcriptomique ont permis de mettre en évidence la répression de l'expression du gène *DWF1* lors d'un stress cadmium (Tableau XII). Cette régulation de l'expression intervient uniquement dans les racines (expression stable dans les feuilles) et est précoce (dès 2 h d'exposition). La répression du niveau d'accumulation des transcrits est aussi fonction de l'intensité du stress : une exposition à une concentration modérée de cadmium (5 μM) conduit à une baisse transitoire de la quantité d'ARNm codant *DWF1* (2 h : 57 % d'expression ; 30 h : 100 % d'expression), alors qu'une exposition à 50 μM Cd entraîne une réduction prolongée du niveau de transcrit *DWF1* (2 h : 59 % d'expression ; 30 h : 60 % d'expression, cf. annexe III, p.196).

Dans le cadre des travaux que nous réalisons, qui visent à mieux comprendre la réponse de la plante au stress métallique, la mise en évidence d'un phénomène de régulation par le cadmium de l'expression d'une enzyme impliquée dans la synthèse d'une hormone est particulièrement intéressante. Afin d'évaluer l'implication de cette classe d'hormones dans la réponse au stress cadmium, les enzymes participant à la biosynthèses des stérols et des brassinostéroïdes (classification AraCyc du site de TAIR, www.arabidopsis.org/biocyc/index.jsp) ont été sélectionnées et leur profil d'expression génique (2 h et 30 h d'exposition à 5 et 50 μ M) étudiés. La Figure 42-A présente une vue simplifiée de cette voie de biosynthèse, et notamment de la voie métabolique principale qui conduit à la production du brassinolide. Les enzymes connues pour être impliquées sont indiquées ainsi que, lorsque les données sont disponibles, un indice de l'évolution du niveau de transcrits dans les racines lors d'un stress cadmium (données de Herbette *et al.*, 2006). Sur 15 gènes identifiés dans cette voie, 4 ne sont pas représentés sur les puces CATMA (blanc), et 5, sur les 11 restants, présentent une régulation négative de leur expression lors d'un stress cadmium (notés en vert). Cette proportion importante (45 %) de gènes régulés de façon similaire dans une voie métabolique est notable (à titre de comparaison la voie de réduction du sulfate, connue pour être activée par le stress cadmium et essentielle à l'établissement d'une partie de la réponse, comprend 7 enzymes dont 3 (42 %) sont régulées positivement (Herbette *et al.*, 2006 / classification AraCyc). Cette observation suggère une régulation de la voie de biosynthèse dans son ensemble lors d'un stress cadmium, et est particulièrement intéressante puisqu'à ce jour aucune hormone, ou plus généralement processus de signalisation, n'a été identifié pour son rôle dans la réponse de la plante au stress cadmium. La présence d'un seul gène appartenant à cette voie métabolique (At5g16010) et régulé positivement à 30 h d'exposition à 50 μ M Cd (cf. annexe III, p. 196), ne remet pas en cause l'hypothèse d'une régulation globale négative de la voie.

Dans le but de confirmer la sous-expression de plusieurs enzymes clé de la voie de biosynthèse, les ARNm des racines de plantes exposées 2 h et 30 h à 0, 5 et 50 μ M Cd ont été extraits, et les ADN complémentaires synthétisés afin de réaliser des PCR semi-quantitatives. Les niveaux d'expression de 3 gènes, lors d'un stress cadmium, ont alors été évalués (Figure 42-A) : At1g76090, qui code une protéine (SMT3) intervenant au début de la voie considérée ; At3g19820, dont le produit (DWF1) catalyse les premières étapes de la biosynthèse des brassinostéroïdes et est impliqué dans les trois voies métaboliques conduisant à la synthèse des brassinostéroïdes à partir du 24-méthylénélophénol ; et At3g55360, qui code la première enzyme (CER10) de la voie de synthèse du brassinolide (Figure 42-A). Ces analyses ont confirmé la régulation négative des gènes testés (Figure 42-B). L'expression des 3 gènes considérés (*SMT3*, *DWF1* et *CER10*) est réduite de façon prononcée dès 2 h d'exposition à 5 μ M Cd (respectivement 28 %, 26 % et 14 % du niveau constitutif) et 50 μ M Cd (34 %, 38 %, et 21 %), ce qui confirme le caractère précoce de la réponse observée. Après 30 h d'exposition, si les niveaux d'expression des gènes extraits de plantules

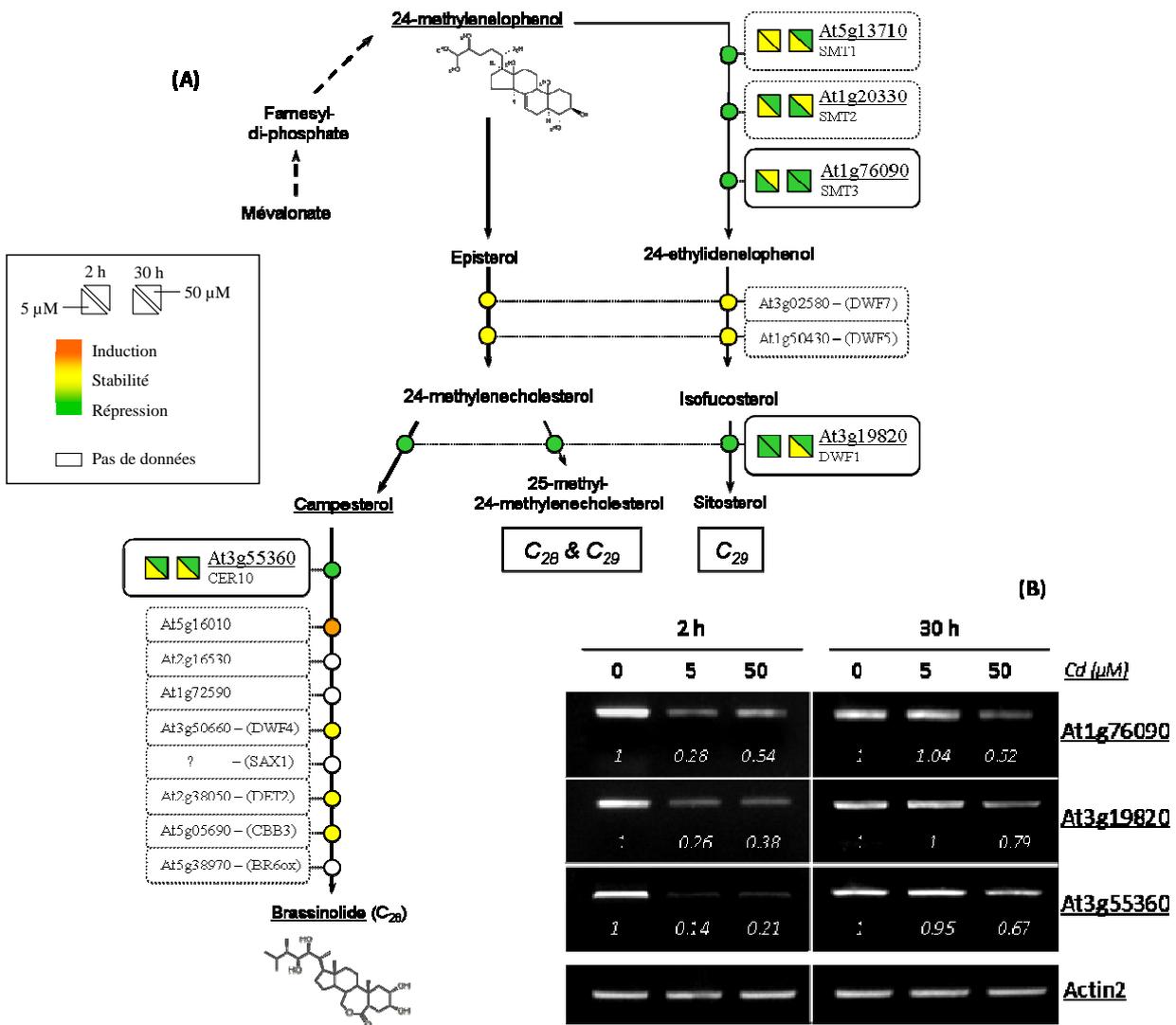


Figure 42 : Régulation transcriptionnelle de la voie de biosynthèse des stérols / brassinostéroïdes lors d'un stress cadmium, dans des racines de plantules d'Arabidopsis thaliana. (A) : Résultats d'analyse d'expression génique sur puce à ADN CATMA (Complete Arabidopsis transcriptome MicroArray ; Herbette et al., 2006). Vert : régulation négative, jaune : expression stable, orange : régulation positive, blanc : gène non présent sur la puce. Pour les gènes régulés négativement sont précisés le niveau de transcrit à 2 h (carré de gauche) et à 30 h (carré de droite), pour une exposition à 5 µM Cd (triangle du bas) et à 50 µM Cd (triangle du haut). Les niveaux de régulation sont présentés en annexe (p. 196). (B) : Trois gènes ont fait l'objet d'une évaluation plus précise de leur niveau d'expression par PCR semi-quantitative (SMT1 : At1g76090 ; DWF1 : At3g19820 ; CER10 : At3g55360). Le rapport d'expression, déterminé à partir de 3 mesures réalisées sur 3 PCR indépendantes (9 valeurs au total), est indiqué. Le témoin de charge utilisé est le transcrit du gène codant l'actine 2 (ACTIN2).

soumises à 5 μM Cd ont retrouvé leurs valeurs initiales, ceux des gènes extraits de plantes exposées à 50 μM Cd sont encore réduits à 52 %, 79 % et 67 % de la valeur du contrôle (Figure 42-B).

Cette étude préliminaire consistant à analyser la réponse de la voie de biosynthèse des brassinostéroïdes à un stress cadmium a donc abouti à la mise en évidence de la répression de l'expression génique de plusieurs enzymes, observée à partir d'analyses sur puces à ADN puis confirmée par RT-PCR. Afin de mieux comprendre la relation entre les brassinostéroïdes et le stress cadmium *in vivo*, une série d'expériences a été mise en place, visant à évaluer l'impact d'une modulation de la concentration endogène en hormone sur la réponse d'*Arabidopsis thaliana* à un stress cadmium.

II.2 - Modulation du niveau de brassinostéroïdes endogènes et effets sur la réponse au cadmium de plantules d'*Arabidopsis thaliana*

II.2.1 - Inhibition chimique de la voie de biosynthèse

Le stress cadmium induisant une régulation négative de la voie de biosynthèse de brassinostéroïdes, nous avons souhaité étudier l'impact d'une baisse artificielle du niveau endogène d'hormone sur la réponse au cadmium de plantules. Pour ce faire, nous avons utilisé un inhibiteur chimique de la voie de biosynthèse des brassinostéroïdes, le brassinazole (Brz ; Nagata *et al.*, 2000). Cette molécule interagit spécifiquement avec DWF4, un cytochrome P450 intervenant dans la voie de biosynthèse des brassinostéroïdes (Figure 42), et inhibe la synthèse de plusieurs brassinostéroïdes, dont le brassinolide.

Des plantules d'*Arabidopsis thaliana* de 4 jours ont été transférées sur un milieu contenant 0, 1 ou 5 μM de Brz, et 0, 10, 25 ou 50 μM de cadmium, et l'élongation racinaire a été mesurée après 6 jours de croissance. Cette façon d'estimer la toxicité du cadmium, est souvent employée afin d'évaluer les processus de tolérance (Kim *et al.*, 2007 ; Dutilleul *et al.*, 2008). La croissance de la racine est réduite dès une exposition à 10 μM de Cd (Figure 43), puis de façon proportionnelle au stress. La croissance est inhibée respectivement de 16 %, 40 % et 58 % par des concentrations de 10, 25 et 50 μM de cadmium (élongation racinaire de 84 %, 60 % et 42 % par rapport au contrôle ; Figure 43-B).

En absence de cadmium, le brassinazole est également un inhibiteur de la croissance racinaire (Figure 43-A), ce qui est cohérent avec l'implication connue de cette classe d'hormone dans l'élongation cellulaire (52 % et 70 % d'inhibition de croissance par respectivement 1 μM et 5 μM de Brz). Sa présence dans le milieu nutritif des plantes réduit l'effet inhibiteur du Cd sur la

croissance racinaire, la réduction de cette croissance étant moindre lorsqu'elle est comparée au contrôle correspondant (0 μM de Cd, concentration de Brz identique ; Figure 43-B). La croissance racinaire des plantules exposées à 10 μM de Cd est inhibée de seulement 9 % sur 1 μM de Brz ($p\text{val} < 0,05$), et statistiquement identique à celle des contrôles sur 5 μM de Brz ($p\text{val} = 0,64$). Pour des expositions à 25 μM de Cd les inhibitions de croissances sont de 21 % et de 19 % (sur respectivement 1 et 5 μM de Brz), soit deux fois moins qu'en absence d'inhibiteur (40 % d'inhibition). L'exposition à 50 μM de Cd induit quant à elle une réduction de croissance racinaire de 48 % et 44 % en présence de l'inhibiteur, alors qu'elle atteint 58 % en absence de Brz. Ces résultats pourraient laisser penser que la répression des gènes de la voie de biosynthèse des brassinostéroïdes est responsable de la chute de croissance racinaire en présence de Cd.

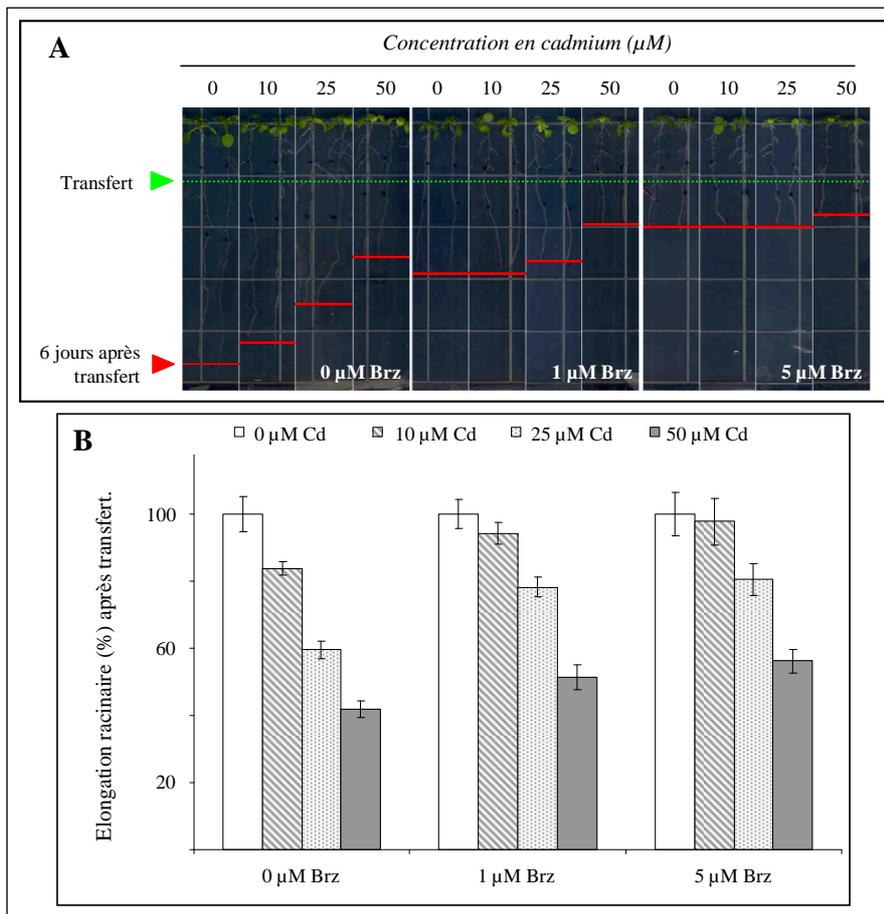


Figure 43 : Effet du brassinazole (Brz) sur la croissance racinaire de plantules exposées au cadmium (Cd). Des plantules de 4 jours, mises à germer en conditions standard, ont été transférées sur un milieu contenant les concentrations indiquées en Cd et Brz. (A) : Phénotype des plantules de 10 jours, après 6 jours d'exposition aux éléments. La ligne verte indique la taille des racines au moment du transfert, et la ligne rouge 6 jours plus tard. (B) : Elongation racinaire des plantules exposées 6 jours à différentes concentrations de Cd et de Brz. Pour chacune des concentrations en Brz (0, 1 et 5 μM), les mesures de l'élongation racinaire des plantules exposées

au Cd sont exprimées en pourcentage par rapport au contrôle correspondant (0 μM de Cd). Ces résultats ont été obtenus à partir d'une expérience représentative.

II.2.2 - Ajout d'hormone exogène

Afin d'étudier plus avant l'impact d'une modulation de la teneur en brassinostéroïdes sur l'établissement de la réponse au cadmium, nous avons analysé le phénotype des plantules exposées au cadmium en présence d'une hormone de synthèse, l'épibrassinolide (eBL). Cet analogue du brassinolide est capable de restaurer efficacement un phénotype sauvage chez des mutants de la biosynthèse des brassinostéroïdes (Klahre *et al.*, 1998), et a été utilisé à des concentrations comprises entre 1 nM et 10 μ M. La Figure 44-A présente des plantules de 10 jours exposées 6 jours à 0, 1 μ M et 10 μ M d'eBL, et illustre le phénotype caractéristique de ces plantules. L'exposition au cadmium entraîne une dégradation du système photosynthétique, qui se traduit notamment par l'apparition d'un jaunissement des feuilles, dès 10 μ M de Cd (Figure 44-A). Lorsque les plantes sont traitées par 1 μ M d'eBL, celles exposées à 50 μ M de Cd présentent un léger brunissement, qui est probablement la conséquence d'une nécrose marquée des tissus. Le traitement des plantules avec 10 μ M d'hormone augmente la surface foliaire affectée par le brunissement sur les plantes exposées à 50 μ M de Cd, et provoque l'apparition de ces nécroses dès une exposition à 25 μ M de Cd, suggérant une augmentation significative de la toxicité du cadmium lorsque l'hormone est présente dans le milieu.

La Figure 44-B présente l'élongation racinaire en millimètre de plantules exposées 6 jours à 0, 10, 25 et 50 μ M de Cd, en absence d'eBL ou en présence de 1 nM, 10 nM, 100 nM ou 1 μ M d'hormone. Ces valeurs sont également présentées en pourcentage d'élongation par rapport au contrôle (0 μ M de Cd) pour chaque concentration d'eBL (Figure 44-C). La présence d'épibrassinolide seul dans le milieu de culture entraîne une diminution de la croissance racinaire (9 % sur 1 nM d'eBL, jusqu'à 29 % sur 1 μ M d'eBL), un effet connu de l'hormone (Figure 44-B). Lorsque les plantules sont exposées au cadmium, à l'inverse de l'effet du Brz (Figure 43), la présence d'hormone entraîne une augmentation prononcée de l'inhibition de la croissance racinaire. Soumises à 10 μ M de Cd, l'élongation racinaire des plantules correspond à 83 % de celle du contrôle (0 μ M de Cd) en absence d'hormone, et respectivement 76,8 % ; 59,1 % ; 50,4 % et 51,3 % sur 1 nM, 10 nM, 100 nM et 1 μ M d'eBL. L'élongation racinaire sur 25 μ M de Cd correspond à 66,2 % du contrôle en absence d'hormone et atteint seulement 31 % sur 1 μ M d'eBL. Sur 50 μ M de Cd, l'élongation racinaire est de 47,6 % de celle du contrôle en absence d'eBL, et de 26 % sur 1 μ M d'hormone (Figure 44-C).

L'inhibition de l'élongation racinaire occasionnée par une exposition au cadmium est donc modulée de façon importante par la quantité de brassinostéroïdes présents dans la plante. L'ajout d'un inhibiteur de synthèse diminue l'inhibition de croissance racinaire observée, alors que l'addition d'hormone exogène augmente la sensibilité des plantules.

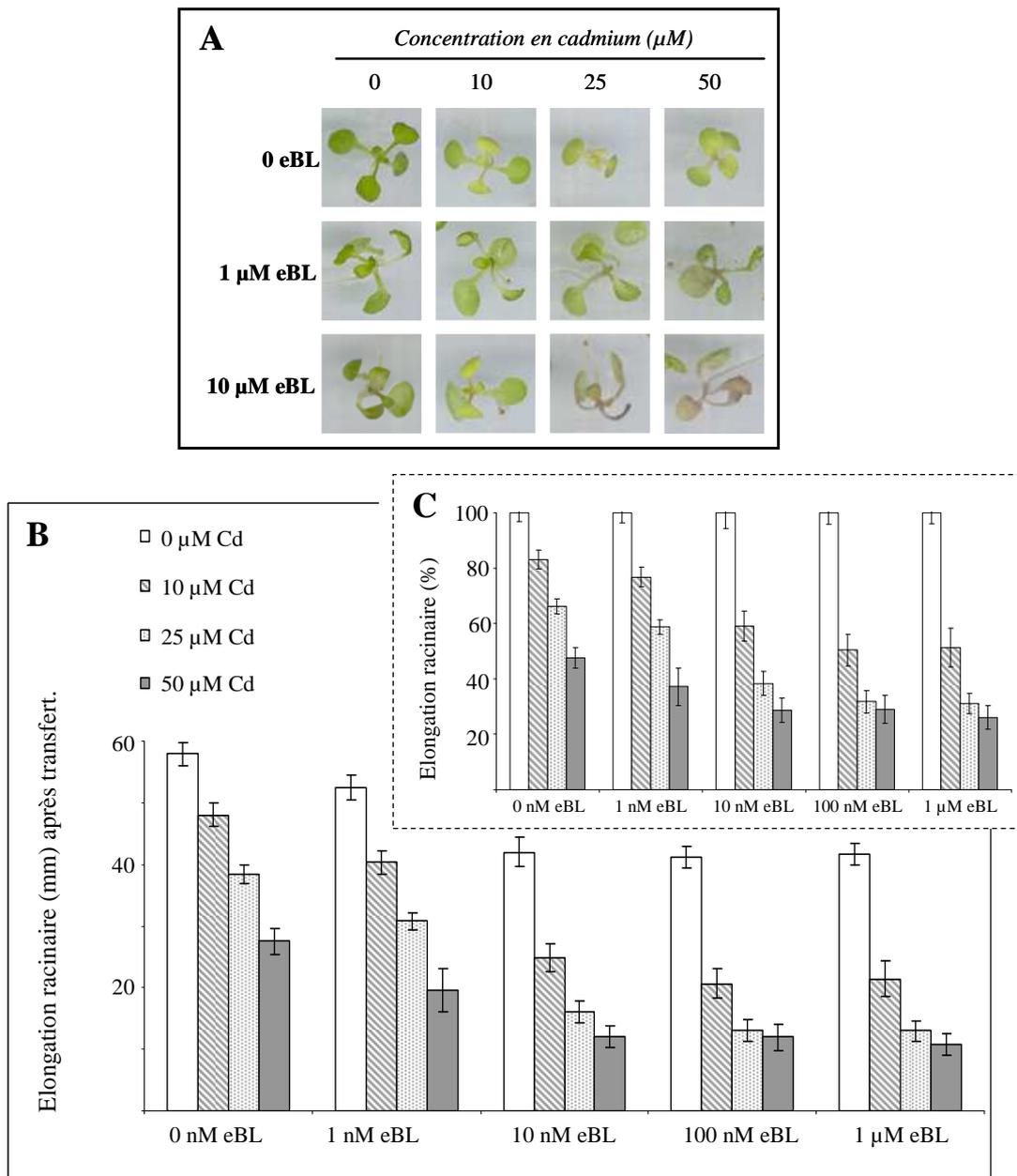


Figure 44 : Effet de l'épibrassinolide (eBL) sur des plantules exposées au cadmium. (A) : Phénotype foliaire de plantules exposées à 0, 10, 25 et 50 μM de Cd, en présence de 0, 1 et 10 μM d'eBL. Si en absence d'eBL le cadmium entraîne un jaunissement des feuilles, en présence de 1 μM d'eBL les feuilles présentent un brunissement marqué sur 50 μM de Cd, visible dès 25 μM de Cd lorsque les plantes sont traitées avec 10 μM d'eBL. (B et C) : Elongation racinaire, exprimées en millimètre (B) et en pourcentage de l'élongation racinaire du contrôle (C) de plantules de 10 jours exposées 6 jours aux conditions indiquées de Cd et d'eBL. Ces résultats ont été obtenus à partir d'une expérience représentative.

Cette dernière observation est essentielle dans l'identification du rôle des brassinostéroïdes dans la réponse au cadmium. Cette hormone est en effet connue pour être impliquée dans le développement racinaire des plantes, et une diminution de sa synthèse, telle qu'elle est supposée, suite à un stress métallique pourrait être l'un des facteurs de la chute de l'élongation racinaire lors

de ce stress. Cette hypothèse expliquerait alors l'apparente résistance des plantules soumises au brassinazole : la croissance racinaire dépendante des BR affectée lors d'un stress métallique serait déjà réduite, en absence de cadmium, par l'inhibiteur. Or selon cette hypothèse, l'inhibition de la croissance racinaire par le cadmium *via* la baisse du niveau endogène de brassinostéroïdes devrait être contre-balançée par un ajout d'hormone exogène. La présence d'eBL dans le milieu de culture conduit de façon claire à une amplification de la réduction de l'élongation racinaire, ce qui démontre que l'altération de la croissance racinaire par le cadmium est, au moins en partie, indépendante de la chute du niveau d'hormone, et est probablement une conséquence de l'activité cytotoxique du cadmium.

II.3 - Etude de la réponse au cadmium de mutants affectés dans la synthèse ou la perception des brassinostéroïdes

Le brassinazole (Brz) est un inhibiteur de cytochrome P450 et sa haute spécificité pour DWF4 a été confirmée (Asami *et al.*, 2001). Toutefois il ne peut être totalement exclu qu'il puisse interagir avec d'autres P450, et nous avons souhaité étudier la sensibilité au cadmium d'un mutant de la voie de biosynthèse des brassinostéroïdes.

II.3.1 - Réponse du mutant *dwf1* au stress cadmium

Nous avons pour cela utilisé un mutant disponible au *Salk Institute* (San Diego, USA), contenant un insert dans le premier exon de *DWF1* (lignée N506932, Figure 45-A) et avons sélectionné les homozygotes parmi la génération F1 des graines obtenues, reconnaissables au phénotype marqué de nanisme observé précédemment pour les plantules sauvages exposée au Brz. Le génotype a ensuite été confirmé pour chaque plantule sélectionnée par PCR semi-quantitative sur des ADNc réalisés à partir des ARNm extraits des plantules (cf. Matériels et Méthodes). Celles-ci ont permis de confirmer l'absence d'un ARNm pleine longueur chez le mutant, une partie du premier exon restant exprimé (Figure 45-B), quoique probablement moins stable que l'ARN pleine longueur.

L'évaluation de la tolérance du mutant au cadmium, observée dans un premier temps sur 0, 25 et 50 μM de Cd (Figure 45-C), a confirmé les résultats obtenus avec le sauvage traité au Brz : l'élongation racinaire est inhibée de 40,9 % chez les contrôles exposés à 25 μM de Cd, alors qu'elle est réduite de 18,1 % seulement chez *dwf1*. Sur 50 μM de Cd, la taille racinaire de *dwf1* dépasse même celle des plantules sauvages.

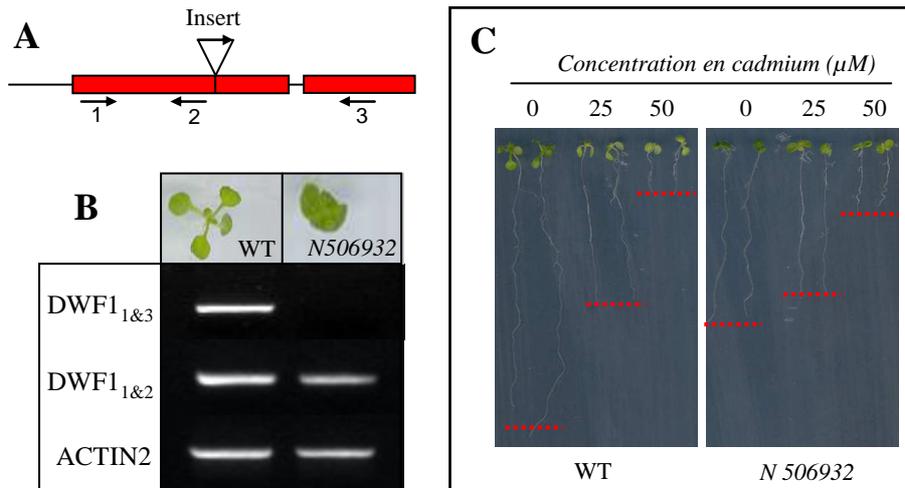


Figure 45 : Caractérisation du mutant N506932 du Salk Institute. (A) : L'insert a été positionné dans le premier exon du gène DWF1. (B) : phénotypes des mutants homozygotes pour l'insertion. Les RT-PCR réalisées confirment l'expression d'un ARN tronqué (les oligonucléotides utilisés, notés 1, 2 et 3, sont représentés sur la figure A). (C) : tailles racinaires de plantules sauvages et mutantes (homozygotes) de 10 jours, après 6 jours d'exposition à 0, 25 et 50 μM de Cd.

II.3.2 - Restauration chez *dwfl* d'un phénotype de sensibilité au cadmium par ajout d'eBL exogène

La Figure 46 présente le phénotype de plantules mutantes exposées à diverses concentrations de cadmium et d'épibrassinolide. La présence d'hormone exogène dans le milieu nutritif entraîne l'abolition du phénotype nain caractéristique des plantules déficientes en brassinostéroïdes, et l'apparition, pour les plus fortes concentrations en hormone (10 μM), de nécroses foliaires pour les plantules exposées à 25 et 50 μM de Cd (Figure 46-A).

La mesure de l'élongation racinaire de mutants exposés à 0, 10 et 25 μM de Cd est également reportée sur la figure, exprimée en valeur absolue (Figure 46-B), ou en pourcentage de celle du contrôle (0 μM de Cd, Figure 46-C). En absence d'hormone, l'élongation racinaire des plantules exposées à 10 μM de Cd n'est pas différente de celle observée pour les contrôles, et la croissance racinaire des plantules exposées à 25 μM de Cd correspond à 83,7 % de l'élongation des plantes témoins (16,3 % d'inhibition), ce qui rappelle la réponse de la plante sauvage en présence de Brz. En présence d'eBL, l'effet du cadmium sur la croissance racinaire est visible dès l'exposition à 10 μM de Cd, et inhibe l'élongation de 17,9 % (1 nM d'eBL) à 20,5 % (1 μM d'eBL). Sur 25 μM de Cd l'effet est plus marqué encore puisque la présence d'hormone entraîne une inhibition d'élongation racinaire par le métal de 29 %, 35,3 %, 42,3 % et 48 % sur respectivement 1 nM, 10 nM, 100 nM et 1 μM d'eBL (Figure 46-B et C). La restauration de la sensibilité est telle que,

alors que l'ajout d'hormone entraîne une augmentation de l'élongation racinaire (Figure 46-B), les plantules exposées au cadmium et à l'hormone présentent une croissance racinaire moindre que les mutants exposés au cadmium seul (0 μM d'eBL, 25 μM de Cd : 25,0 mm ; 1 μM d'eBL, 25 μM de Cd : 21,8 mm ; $p\text{val} < 0,05$).

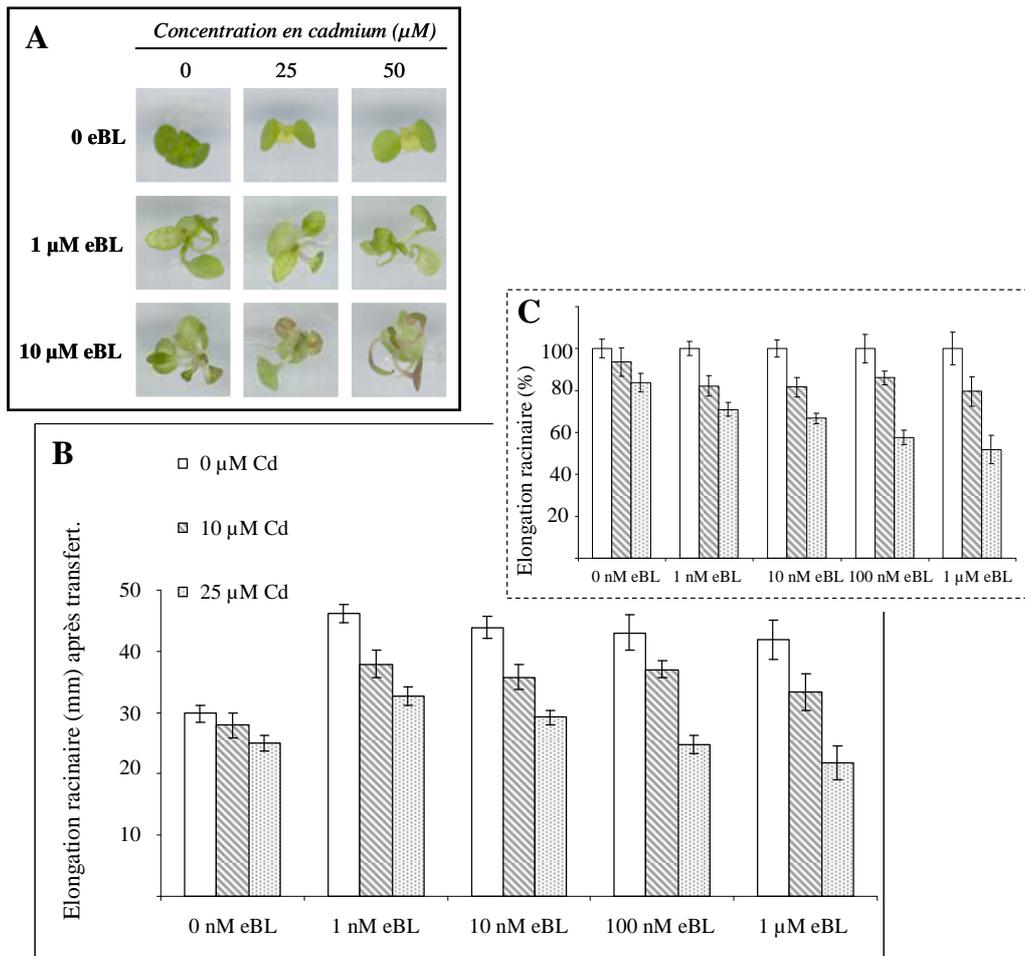


Figure 46 : Effet de l'épibrassinolide (eBL) sur des plantules N507932 (*dwf1*) exposées au cadmium. (A) : Phénotype des mutants exposés à 0, 25 et 50 μM de Cd, en présence de 0, 1 et 10 μM d'eBL. En présence de 10 μM d'eBL, les feuilles présentent un brunissement marqué sur 25 et 50 μM de Cd, absent des plantes non traitées ou traitées avec 1 μM d'eBL. (B et C) : Elongation racinaire, exprimée en millimètre (B) et en pourcentage de l'élongation racinaire du contrôle (C) de plantules *dwf1* de 10 jours exposées 6 jours aux conditions indiquées de Cd et d'eBL. Ces résultats ont été obtenus à partir d'une expérience représentative.

II.3.3 - Réponse au cadmium d'autres mutants affectés dans la voie de signalisation et de perception des brassinostéroïdes

Afin de confirmer les conclusions établies à partir des expériences précédentes, conduites sur le sauvage et le mutant N506932 du *Salk Institute* (*dwf1*), nous avons souhaité analyser la réponse au cadmium d'un second mutant affecté dans la biosynthèse des brassinostéroïdes, et d'un mutant de la perception du signal. Nous avons, pour ce faire, utilisé les plantes N520761 et N503371 du *Salk Institut*, mutées respectivement par insertion dans les gènes *DWF4*, impliqué dans la biosynthèse des brassinostéroïdes (Figure 42), et *BRI1*, impliqué dans la perception du signal. *BRI1* est en effet un récepteur de type LRR-Kinase localisé à la membrane plasmique, qui est le seul connu à ce jour pour interagir avec les brassinostéroïdes et activer une cascade de signalisation cellulaire (He *et al.*, 2000).

Après sélection des mutants homozygotes pour les insertions, la sensibilité au cadmium des plantules a pu être évaluée comme précédemment, sur 0, 10, 25 et 50 μM de Cd pour *bri1* ou sur 0 et 25 μM de Cd pour *dwf4*, et comparée à celle de plantules sauvages (Figure 47).

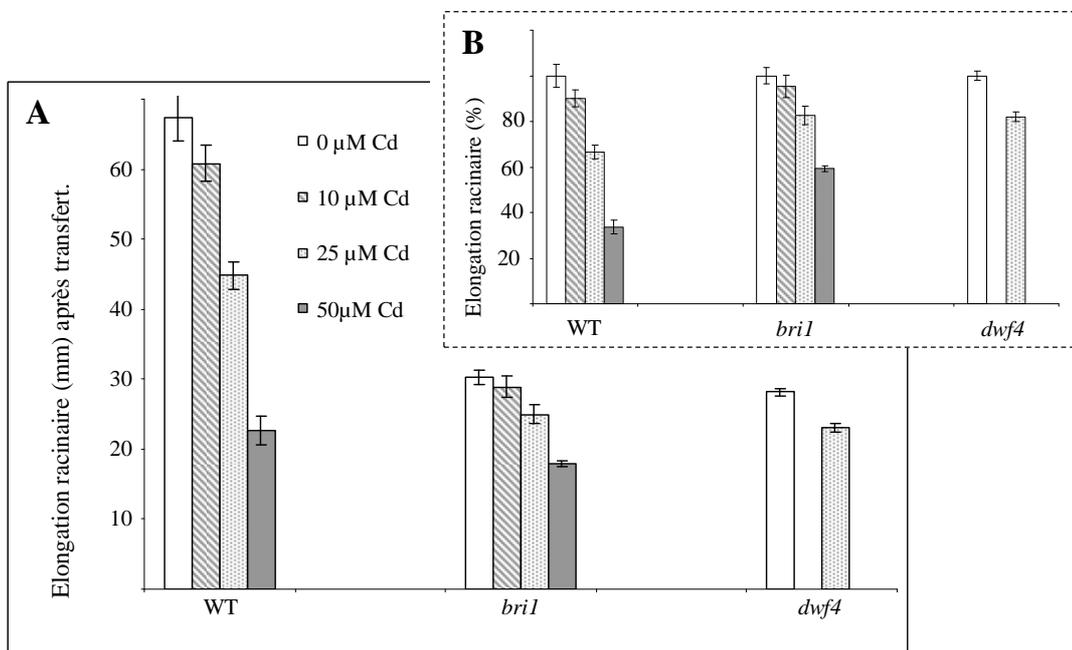


Figure 47 : Evaluation de la sensibilité au cadmium de plantules sauvages (WT) et mutées (*dwf4*, *bri1*). Elongation racinaire de plantules de 4 jours exposées 6 jours à 0, 10, 25 et 50 μM de Cd, exprimée en millimètre (A) et en pourcentage de l'élongation du contrôle (0 μM de Cd) (B).

Les mutants testés alors ont présenté une inhibition de la croissance racinaire par le cadmium inférieure à celle du sauvage. Comme *dwf1*, le mutant *bri1* ne semble pas affecté sur des concentrations de 10 μM de Cd ($p\text{val} = 0,26$). De même sur 25 μM de Cd, la croissance racinaire du sauvage est inhibée de 33,5 %, alors que celle des deux mutants est inhibée de seulement 17,4 % (*bri1*) et 18 % (*dwf4*), ces valeurs étant similaires à celles constatées pour *dwf1* (Figure 46-C).

Ces différentes analyses mettent en évidence l'influence significative des brassinostéroïdes dans la réponse des plantes au cadmium. La réduction du niveau endogène de l'hormone ou de la capacité de la plante à percevoir le signal conduit à la diminution de l'inhibition du développement de la plante par le métal. A l'inverse, l'ajout d'hormone exogène au milieu de culture entraîne une augmentation du retard de croissance racinaire provoqué par le stress métallique. Ces résultats suggèrent que la cascade de signalisation impliquant cette classe d'hormone module l'expression d'un (ou de plusieurs) facteur(s) de tolérance / sensibilité. Chez les plantes, les mécanismes connus de la résistance aux métaux, et en particulier au cadmium, consistent à (i) limiter l'entrée du métal et éventuellement excréter les ions excédentaires, (ii) modifier la répartition du cadmium à travers les organes de la plante afin de réduire la toxicité qu'il engendre au niveau des racines, ou encore (iii) séquestrer le métal dans la vacuole, *via* notamment la production des phytochélatines (cf. synthèse bibliographique). Dans le but de mieux comprendre le rôle des brassinostéroïdes dans la réponse observée, nous avons mis en place une série d'expériences visant à déterminer l'implication relative de chacun de ces mécanismes dans le phénomène observé.

II.4 - Recherche de facteurs de tolérance dépendants des brassinostéroïdes impliqués dans la réponse de la plante au stress métallique

II.4.1 - Mesure de la quantité endogène de cadmium

Les brassinostéroïdes sont connus pour leur implication dans la croissance racinaire et le développement général des plantes. Cette caractéristique peut être à l'origine d'une influence de cette hormone sur l'assimilation des nutriments et leur répartition dans différents organes *via* le xylème. Le cadmium étant connu pour emprunter des voies physiologiques servant à l'assimilation des micro-éléments essentiels, il est possible que ce soit à travers une augmentation de la teneur en Cd des plantes que les brassinostéroïdes augmentent leur sensibilité. Afin de tester cette hypothèse, des plantules sauvages ont été mises à germer 7 jours, puis transférées 3 jours sur un milieu contenant 50 μM de Cd. Un tiers de ces plantes a en outre été traité avec 10 nM d'eBL, un tiers

avec 1 μM de Brz, la dernière fraction, ne contenant ni hormone ni inhibiteur, servant de contrôle. Les plantules ont alors été prélevées et la quantité de cadmium présente dans les feuilles et dans les racines déterminée séparément sur chacune de ces deux fractions, par ICP-MS.

La Figure 48 présente les quantités de cadmium mesurées dans les feuilles et les racines des plantules. Si aucune différence significative n'est mesurée entre les plantules contrôles et les plantules traitées à l'hormone, on note à l'inverse une légère augmentation de la teneur en cadmium des plantes soumises à 1 μM de Brz. Ces résultats infirment l'hypothèse d'une augmentation de la quantité de cadmium assimilé par les plantes traitées avec l'hormone, puisque c'est à l'inverse les plantes les plus tolérantes qui semblent contenir le plus de cadmium (+ 10 % dans les feuilles et + 11 % dans les racines).

Un facteur de tolérance connu chez les plantes, et en particulier chez les espèces hyperaccumulatrices, consiste également à exporter vers les feuilles une plus grande partie du cadmium endogène que chez les espèces plus sensibles. La mesure séparée de la concentration en cadmium dans les parties aériennes et dans les racines qui a été réalisée met également en évidence la répartition feuilles / racines identique du cadmium, quel que soit le traitement utilisé.

Des expériences similaires visant à comparer *dwf1* avec la plantule sauvage n'ont montré aucune différence significative entre les plantes (résultats non montrés), la quantité de cadmium dans la plante n'est donc pas responsable du phénotype observé.

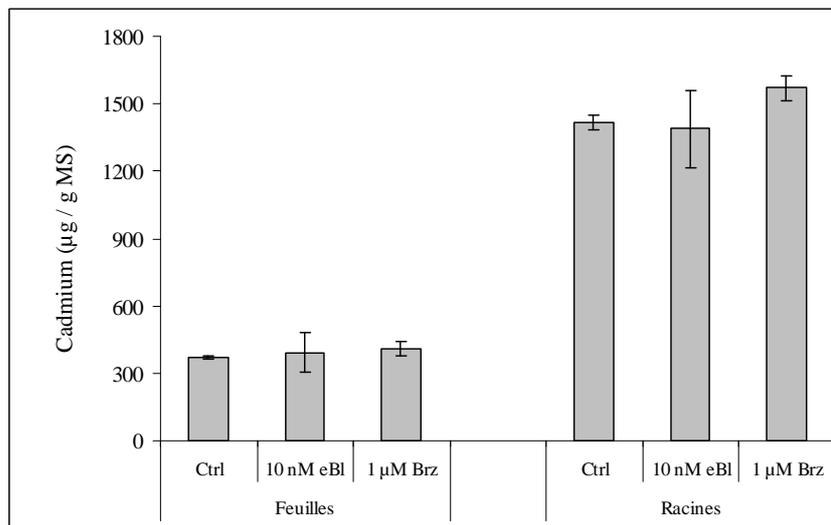


Figure 48 : *Quantité de cadmium mesurée dans les feuilles et les racines de plantules. Les plantules de 7 jours ont été exposées 3 jours à 50 μM de Cd, en présence ou en absence d'eBL (1 nM) et de Brz (1 μM), et la quantité de cadmium, exprimée en microgramme par gramme de matière sèche déterminée par ICP-MS.*

II.4.2 - Evaluation de l'implication de la voie GSH / PC

La compartimentation des métaux lourds dans la vacuole est l'un des mécanismes de résistance les mieux décrits dans la littérature. Cette séquestration passe par la synthèse (à partir du glutathion) des phytochélatines, des peptides capable de chélater les métaux et impliqués dans leur confinement (Vogeli-Lange & Wagner, 1990). Ces processus constituent une part essentielle des mécanismes de tolérance aux métaux lourds, des mutants de la synthèse des phytochélatines étant hypersensibles à différents métaux, notamment au cadmium (Howden *et al.*, 1995).

Afin d'évaluer l'implication de cette voie métabolique dans la tolérance observée chez les plantules traitées au Brz, nous avons réalisé, en collaboration avec Nathalie Leonhardt (LEMS, CEA-Cadarache), un dosage du glutathion (GSH) et des phytochélatines (PC) dans les feuilles et les racines de plantules exposées à 0 ou 50 μM de Cd, en absence ou en présence de 5 μM de Brz. Pour ce faire, des plantules de 6 jours ont été traitées 4 jours par les concentrations mentionnées d'inhibiteur et de métal, puis prélevées afin d'extraire les métabolites des racines et des feuilles pour leur analyse par HPLC. La Figure 49 présente les quantités mesurées de glutathion et de phytochélatines (PC₂, PC₃, PC₄ et PC₅) dans les plantules.

Concernant le glutathion, aucune différence importante entre les plantules ne permet de lier le phénotype de résistance à un contenu en GSH renforcé de façon drastique dans les plantes traitées à l'inhibiteur. La présence de Brz semble même faire légèrement chuter la quantité de GSH dans les feuilles lors d'une exposition au cadmium comparée aux contrôles (0 μM de Brz + 50 μM de Cd et 5 μM de Brz + 50 μM de Cd). Dans les racines, en absence de cadmium, le Brz entraîne par contre une augmentation de la quantité de GSH (0 μM de Brz + 0 μM de Cd vs 5 μM de Brz + 0 μM de Cd), qui n'est toutefois pas maintenue en présence de cadmium (0 μM de Brz + 50 μM de Cd vs 5 μM de Brz + 50 μM de Cd), et qui ne se traduit pas par un taux de PC plus élevé en présence de Cd (Figure 49). Ces dernières ne sont pas détectées en absence de cadmium (non montré), et leur quantité atteint, respectivement dans les feuilles et les racines, 550 (\pm 71) et 994 (\pm 115) $\mu\text{g} / \text{g MF}$ en absence d'inhibiteur. En présence de 5 μM de Brz, ces quantités chutent à 383 (\pm 77) et 804 (\pm 216) $\mu\text{g} / \text{g MF}$ dans les feuilles et les racines respectivement. Cette tendance à une quantité de PC moindre chez les plantes traitées au Brz n'est toutefois significative que dans les feuilles (pval < 0,05), la variabilité entre les échantillons étant trop importante pour conclure à une inhibition de la synthèse des PC dans les racines (pval = 0,14). Ces résultats tendent à infirmer l'hypothèse d'une synthèse accrue des PC en réponse à la chute de BR provoquée par l'inhibiteur. Au contraire, la présence du Brz dans le milieu de culture semble provoquer une diminution du pool de PC présent dans les plantes lors d'un stress, au minimum dans les feuilles.

Ces analyses ne permettent toutefois pas d'exclure une éventuelle implication du glutathion, les plantules traitées au Brz présentant une concentration de GSH supérieure, dans les racines, à

celle des contrôles en absence de cadmium (325 $\mu\text{g} / \text{g MF}$ vs. 269 $\mu\text{g} / \text{g MF}$; $p\text{val} < 0,05$). Toutefois des analyses préliminaires ont permis de montrer que le Brz est capable de restaurer un phénotype de tolérance chez des plantules déficientes en GSH (*cad2* (Cobbett *et al.*, 1998), résultats non présentés). Ces résultats, qui restent à confirmer, tendraient à prouver que la voie GSH / PC ne serait pas requise pour la mise en place des mécanismes de tolérance observés.

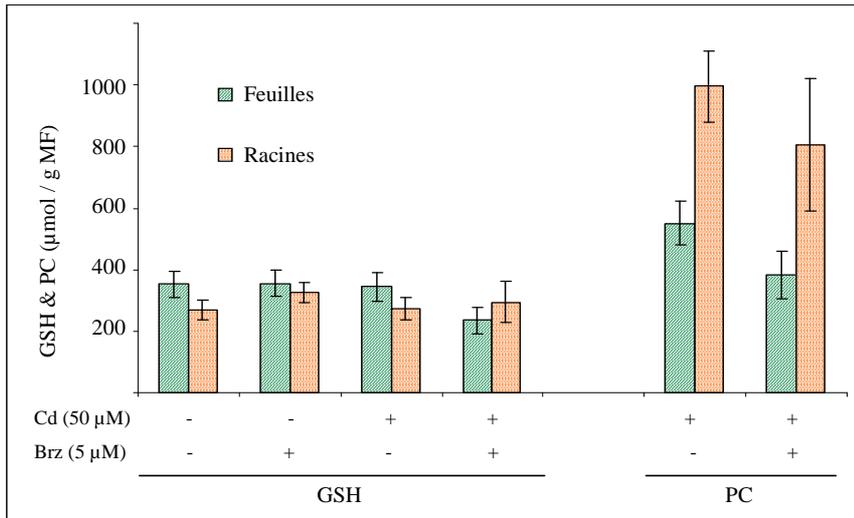


Figure 49 : Effet du Brz sur les quantités de glutathion (GSH) et de phytochélatines (PC) mesurées dans les feuilles et les racines de plantules exposées au Cd. Des plantules de 7 jours ont été exposées 3 jours aux concentrations indiquées de Brz et de Cd, puis récoltées afin de mesurer, par HPLC, les quantités de GSH et de PC dans les feuilles et les racines, exprimées en micromoles par gramme de matière fraîche. Ces

résultats proviennent de 4 réplicats indépendants.

II.5 - Conclusion et perspectives

Les brassinostéroïdes sont connus depuis plusieurs années pour leur implication dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Krishna, 2003). C'est toutefois systématiquement une augmentation de leur synthèse qui est associée à la protection cellulaire, et la mise en évidence de l'établissement d'un phénotype de tolérance *via* l'inactivation de la biosynthèse ou de la perception de cette hormone constitue un résultat original. Une équipe a d'ailleurs récemment proposé que, contrairement à nos résultats, les brassinostéroïdes puissent être un facteur de tolérance au cadmium, à travers l'activation des gènes de la protection contre le stress oxydant (Hasan *et al.*, 2007). Cette observation nous a d'ailleurs incités à vérifier que nos conditions expérimentales permettaient, le cas échéant, d'observer la sensibilité accrue des mutants à divers stress. Des mesures de l'élongation racinaire de *dwf1* en présence de 100 mM de NaCl ont alors été réalisées et ont confirmé la sensibilité des plantules au stress salin (résultats non présentés).

Si ces différentes analyses mettent en évidence une modulation de la tolérance au cadmium *via* l'altération artificielle de la quantité de brassinostéroïdes endogènes, elles ne permettent pas de vérifier la réalité physiologique d'un tel mécanisme *in planta*, lors d'un stress. Les brassinostéroïdes sont connus pour agir à de très faibles concentrations et nos tentatives visant à doser l'hormone dans les racines de plantes traitées ou non au cadmium (collaboration avec S. Fujioka, Riken, Japon) n'ont pas permis d'observer une différence significative entre les échantillons (résultats non montrés). Il n'est toutefois pas possible de réfuter l'éventualité d'une régulation de la quantité d'hormones lors d'un stress, une part importante d'entre elles, et en particulier le brassinolide, étant à des concentrations inférieures au seuil de détection. Toutefois la régulation négative de la voie de biosynthèse, précoce et pour des concentrations modérées de cadmium, suggère que les brassinostéroïdes sont un élément de la réponse de la plante au cadmium. Il est intéressant de noter que cette voie de biosynthèse est également réprimée en présence d'argent et de césium, deux autres métaux lourds. En effet, la base de données Genevestigator regroupe plusieurs résultats d'analyse d'expression génique sur puce à ADN, dont certaines visent à étudier l'effet de divers stress. Les seuls stress métalliques disponibles sur le site sont l'argent et le césium, pour lesquels les effets sur l'expression de 7 gènes appartenant à la voie de biosynthèse des brassinostéroïdes sont présentés (Tableau XIII). On peut aussi remarquer que le gène At5g16010, induit par le cadmium (seul gène induit de la voie de biosynthèse, Figure 42), est également induit par l'argent.

La répression de la voie de biosynthèse de cette classe d'hormone pourrait donc être une constante lors d'un stress métallique, alors que ce phénomène ne semble pas lié aux processus connus de la détoxification chez les plantes. La quantité de cadmium assimilée par les plantes, par exemple, est légèrement plus importante lorsqu'elles sont traitées au Brz, et identique à celle des témoins lorsqu'elles sont exposées à l'hormone. La répartition entre les feuilles et les racines est quant à elle identique quelque soit le niveau de brassinostéroïdes endogènes. De même, la synthèse du glutathion et des phytochélatines ne paraît pas non plus déterminante dans l'établissement du phénotype de tolérance causé par la chute du niveau de brassinostéroïdes : les quantités de PC présentes dans les feuilles de plantules traitées avec l'inhibiteur sont même moindres que celles des contrôles, ce qui suggère également une tolérance accrue des plantes, qui sont moins affectées par le stress et qui synthétisent alors moins de PC. Cette indépendance des mécanismes est également confirmée par l'instauration d'un phénotype de résistance chez des plantes déficientes en GSH, et donc en PC. En outre, l'étude des effets d'une carence en soufre sur l'expression de certains gènes de la voie de biosynthèse des brassinostéroïdes (Genevestigator, Tableau XIII) montre que la carence en soufre n'a pas d'effet sur la synthèse des brassinostéroïdes. Il est alors probable que cette classe d'hormone ne soit pas un acteur majeur de la régulation de l'assimilation du soufre, et que ce ne soit pas par ce biais qu'il influe sur la tolérance au cadmium des plantules. Ces résultats suggèrent l'existence d'un mécanisme de tolérance au cadmium inconnu, exploitant la cascade de signalisation des brassinostéroïdes et indépendant des voies décrites dans la littérature.

Tableau XIII : Analyse de l'expression de gènes appartenant à la voie de biosynthèse des brassinostéroïdes en réponse à différents stress. Les données (ratio d'expression par rapport au contrôle) proviennent des travaux de Herbette *et al.*, 2006 (H) ou du site Genevestigator (G). Elles rendent compte de l'expression de 7 gènes en présence de cadmium (+ Cd), d'argent (+ Ag) ou de césium (+ Cs), ou en carence en soufre (- S). Les valeurs correspondant au stress cadmium, données à titre indicatif, ont été calculées sur la base d'une moyenne des valeurs prises en compte dans l'étude présentée, soit 2 h et 30 h d'exposition à 5 et 50 μ M de Cd. Le détail des niveaux d'accumulation des transcrits est précisé Figure 42 et en annexe (annexe III, p. 196). Pour DWF1, les données de Genevestigator correspondent aux résultats obtenus avec deux sondes différentes (a et b).

Locus	Protéine	+ Cd	+ Ag	+ Cs	- S
At5g13710	(SMT1)	0,89	1,09	0,72	0,98
At1g20330	(SMT2)	0,78	0,91	0,99	1,08
At1g76090	(SMT3)	0,77	0,50	0,92	0,98
At3g02580	(DWF7)	1	1,06	0,84	1,04
At3g19820 (a)	(DWF1)	0,69	0,69	0,95	0,92
At3g19820 (b)		0,61	0,76	1,38	
At3g55360	(CER10)	0,76	0,81	0,83	1,08
At5g16010	-	1,96	1,44	0,97	1,00
Source :		H	G	G	G

De façon très intéressante, c'est à travers la recherche d'éléments vacuolaires de la détoxification du cadmium que cette voie alternative a été mise en évidence. DWF1, qui intervient dans la voie de biosynthèse des brassinostéroïdes, a en effet été identifié par nos travaux de protéomique avec un haut score MASCOT, et SMT1 (*Sterol MethylTransferase*) est mentionné par les travaux de Carter *et al.* (2004). L'analyse réalisée par cette équipe a d'ailleurs également permis d'identifier DWF1, dont la localisation a été en outre confirmée par nos fusions traductionnelles (Figure 15). Cette relation entre la vacuole et le réseau de signalisation impliquant les brassinostéroïdes ne s'arrête pas à la localisation vacuolaire de plusieurs enzymes de la voie de synthèse de l'hormone. Si la régulation du signal BR-dépendant est décrite pour être en partie transcriptionnelle (Nemhauser & Chory, 2004), DWF1 a aussi été mis en évidence pour son activité strictement dépendante d'une calmoduline (Du & Poovaiah, 2005) et plusieurs protéines de ce type ont été associées à la vacuole (celle(s) interagissant avec DWF1 n'ayant pas été identifiée(s) à ce jour). Mais c'est également *via* la modulation de la transmission du signal que la signalisation BR-dépendante est régulée. En particulier, la protéine 14-3-3 λ (At5g10450) a été clairement décrite comme jouant un rôle dans la transmission du signal (Gampala *et al.*, 2007), et a été identifiée par nos travaux de protéomique vacuolaire avec un score MASCOT relativement élevée (228). Ces

observations suggèrent l'intégration de la signalisation cellulaire BR-dépendante du stress métallique au sein du réseau métabolique de la vacuole. L'association à la vacuole d'enzymes de synthèse des brassinostéroïdes et d'éléments régulateurs de la synthèse et de la perception de cette classe d'hormone pourrait permettre l'établissement d'un signal initié par les activités vacuolaires lors d'un stress métallique. La confirmation d'une telle hypothèse nécessiterait toutefois de connaître les cibles métaboliques de l'hormone et le travail que nous avons réalisé n'a pas permis d'identifier les mécanismes mis en jeu. Une étude comparative de la régulation génique induite par le cadmium (données de Herbette *et al.*, 2006) et de celle induite par le brassinazole et par l'épibrassinolide (données du site Genevestigator) est actuellement en cours. La mise en évidence de protéines régulées de façon similaire par le cadmium et le brassinazole (et inversement régulées par le cadmium et l'eBL) pourrait suggérer des pistes dans la recherche des processus mis en jeu *via* la signalisation BR-dépendante lors d'un stress cadmium. Le Tableau XIV présente quelques gènes dont l'évolution de la quantité de transcrits est affectée par le stress cadmium (induction ou repression de la transcription), mais également par un traitement au Brz ou par l'ajout d'hormone exogène.

Tableau XIV : Sélection de gènes régulés de façon similaire (répression ou induction) par le cadmium et le brassinazole, et de façon opposée par l'épibrassinolide. Les valeurs présentées sont issues de Herbette *et al.* (2006) (niveau d'accumulation des transcrits dans les racines, pour 2 h, 6 h et 30 h d'exposition à 5 et 50 μ M de Cd), et du site genevestigator (niveau d'accumulation des transcrits dans des cellules exposés au brassinazole (+ Brz) ou à l'épibrassinolide (+ eBL)).

Locus	Fonction	RACINES								
		5 μ M Cd			50 μ M Cd			+ Brz	+ eBL	
		2 h	6 h	30 h	2 h	6 h	30 h			
At3g23560	MATE efflux family protein	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	2,05	1,66	0,8	
At1g33110	MATE efflux family protein	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	2,53	1,21	0,88	
At2g47730	Glutathione S-transferase 6 (GST6)	1,00	1,50	1,00	1,00	2,27	1,00	1,2	0,94	
At3g09270	Glutathione S-transferase putative	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,87	1,43	0,79	
At4g17340	Tonoplast intrinsic family protein / MIP family protein	1,00	0,52	0,40	1,00	0,53	0,20	0,86	1,09	
At2g25810	Tonoplast intrinsic protein. putative	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,25	0,88	1,17	
At2g45960	Plasma membrane intrinsic protein 1B (PIP1B / PIP1.2)	1,00	0,61	1,00	1,00	1,00	0,35	0,81	1,12	
At4g19030	Major intrinsic family protein / MIP family protein	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,43	0,82	1,37	
At4g23400	Major intrinsic family protein / MIP family protein	0,63	0,58	0,43	1,00	1,00	0,16	0,8	1,19	
At5g47450	Major intrinsic family protein / MIP family protein	1,00	0,64	0,38	1,00	0,54	0,19	0,83	1,35	
At5g60660	Major intrinsic family protein / MIP family protein	1,00	1,00	0,36	1,00	1,00	0,34	0,88	1,2	
At4g12730	Fasciclin-like arabinogalactan-protein (FLA2)	0,52	1,00	1,00	0,56	1,00	0,28	0,66	1,46	
At5g10430	Arabinogalactan-protein (AGP4)	1,00	0,53	0,41	0,57	0,50	0,16	0,62	1,93	
At2g04780	Fasciclin-like arabinogalactan-protein (FLA7)	0,62	0,63	0,54	1,00	1,00	0,23	0,97	1,22	
At2g45470	Fasciclin-like arabinogalactan-protein (FLA8)	0,55	0,60	0,55	0,59	1,00	0,17	0,77	1,1	
At1g03870	Fasciclin-like arabinogalactan-protein (FLA9)	0,60	0,62	1,00	1,00	0,50	0,08	0,8	1,39	
At5g53250	Arabinogalactan-protein. putative (AGP22)	1,00	0,60	1,00	1,00	0,60	0,08	0,73	1,5	
		H						B		B

De façon suprenante, cette analyse fait apparaître peu de protéines connues pour être impliquées dans la réponse aux stress (2 transporteurs de type MATE, 2 glutathion S-transférase induits). Elle met par contre en évidence deux types de protéines, réprimés par le stress cadmium et l'ajout de Brz dans le milieu de culture mais induits par l'hormone. Il s'agit des aquaporines, dont la répression quasi systématique par le cadmium a déjà été évoquée, et des protéines de type arabinogalactanes. Ces dernières, généralement localisées à la membrane *via* une ancre GPI, sont impliquées dans un grand nombre de fonctions métaboliques. Elles participent notamment à la division cellulaire et au programme de mort cellulaire, à l'incomptabilité pollinique, à la protection contre les pathogènes, mais également à la signalisation en tant que molécules signales aussi bien que récepteurs ou co-récepteurs (Seifert & Roberts, 2007). La nécessité de réprimer l'expression de ces gènes (arabinogalactanes et aquaporines) est très intéressante et semble primordiale lors d'un stress puisque cette régulation intervient précocement et aux concentrations de Cd les plus faibles pour la plupart des gènes. Ces résultats suggèrent que c'est peut-être *via* la réduction de l'expression de facteurs de sensibilité que les brassinostéroïdes participent à la réponse de la plante au stress métallique, un tel processus semblant déterminant dans les mécanismes de tolérance mis en place.

*Conclusion générale
et perspectives*

Conclusion générale et perspectives

Lors d'un stress métallique, la plante est capable de mettre en place une série de processus physiologiques aboutissant à l'excrétion ou à la compartimentation des toxiques. L'équipe « Stress Environnementaux et Métaux Lourds » du Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale (CEA-Grenoble) étudie la réponse de la plante au cadmium, et en particulier les mécanismes impliquant la vacuole. Cette thématique nécessite de mettre en place une approche ciblée sur cet organite, destinée à observer sa dynamique au cours d'un stress. Ceci devrait, sans aucun doute, permettre d'identifier un certain nombre d'acteurs de la détoxification vacuolaire. Toutefois, cet organite est mal connu, et il n'a fait l'objet de caractérisation protéomique que récemment (Carter *et al.*, 2004; Shimaoka *et al.*, 2004; Szponarski *et al.*, 2004). Dans ce cadre, mon travail de thèse avait pour objectif de réaliser une étude protéomique de vacuoles purifiées à partir de cellules en culture d'*Arabidopsis thaliana*, et de mettre en place un certain nombre d'outils d'analyse de ce protéome en vue d'analyser son évolution lors d'un stress.

Une partie de mon travail a consisté à mettre en place un protocole de purification de vacuoles, à partir de procédures expérimentales décrites dans la littérature. L'une d'entre elle a été sélectionnée, et nous lui avons apportées quelques modifications, afin de définir une méthodologie adaptée à nos conditions et nous donnant satisfaction. La pureté des organites a pu être évaluée par des tests biochimiques, et les résultats nous ont incités à engager les analyses par spectrométrie de masse. Celles-ci ont été réalisées indépendamment sur les fractions membranaires et solubles des vacuoles, et ont permis d'identifier respectivement 420 et 371 protéines, conduisant à l'établissement d'une liste de 689 protéines présentes à l'intérieur de la vacuole, enchâssées dans le tonoplaste, ou associées à celui-ci. Parmi ces protéines, 110 transporteurs ont été identifiés, particulièrement intéressants pour la compréhension des flux métaboliques impliquant la vacuole. Afin de confirmer la localisation de certaines protéines identifiées, nous avons réalisé des expériences de localisation *in vivo* de protéines chimères, fusionnées à la GFP. Cinq protéines (un transporteur de sucre putatif (At1g19450), une lipocaline (At5g58070), une enzyme de la voie de biosynthèse des brassinostéroïdes (DWF1, At3g19820), une enzyme de dégradation des caroténoïdes (CCD1, At3g63520) et une protéine de type Band7 (At1g69840)), dont la localisation vacuolaire n'avait jamais été évaluée par des approches autres que celles de la spectrométrie de masse, ont été choisies, et ont fait l'objet d'un clonage dans un vecteur d'expression contenant la GFP. Les fusions ont alors été exprimées dans des cellules d'épiderme de tabac, et les profils de fluorescences ont été comparés à ceux obtenus avec des marqueurs tonoplastiques connus :

NRAMP3 et TIP2.1. Ce travail a permis de confirmer la localisation vacuolaire de 4 des 5 protéines testées, et une expérience complémentaire d'expression de l'une de ces constructions dans des protoplastes d'*Arabidopsis thaliana* a abouti à la confirmation de la localisation de l'ensemble des protéines testées. Une partie de ce travail a pu faire l'objet de deux publications (un article original (Jaquinod M*, Villiers F*, Kieffer-Jaquinod S, Hugouvieux V, Bruley C, Garin J, Bourguignon J (2007) A proteomics dissection of *Arabidopsis thaliana* vacuoles isolated from cell culture. *Mol Cell Proteomics* **6**: 394-412) et un *addendum* (A proteomics approach highlights a myriad of transporters in the *Arabidopsis thaliana* vacuolar membrane) paru dans *Plant Signaling & Behavior*), exposant la méthode de purification des vacuoles, l'identification des 420 protéines retrouvées dans la fraction membranaire et la confirmation de la localisation de 5 d'entre elles.

Un second aspect de mon travail a ensuite consisté à approfondir l'étude protéomique réalisée par des analyses visant à mieux comprendre l'organisation du protéome de la vacuole : estimation de paramètres quantitatifs, détermination de la localisation de certaines protéines sur la face interne ou externe du tonoplaste, évaluation de l'organisation supramoléculaire des protéines. Pour cela, des cartographies du protéome soluble de la vacuole par électrophorèses bidimensionnelles IEF / SDS-PAGE ont été réalisées, et ont permis d'identifier les protéines principales de la vacuole. L'ensemble des analyses par spectrométrie de masse effectuées ayant mis en évidence un certain nombre de protéines connues pour être cytosoliques, nous avons initié une série d'analyses ayant pour objectif de déterminer l'origine de ces « contaminants ». La comparaison de cartographies par IEF / SDS-PAGE des protéomes du cytosol et de la fraction soluble de la vacuole a abouti à la conclusion que ces protéines n'étaient très certainement pas des contaminants aspécifiques, mais plus probablement qu'elles étaient présentes à l'intérieur de la vacuole ou associées au tonoplaste *via* des interactions spécifiques. Nous supposons que ces associations sont impliquées dans des processus cytosoliques faisant intervenir la vacuole, le protéasome, la subtilase TPPII et de nombreuses protéines de type 14-3-3, par exemple, semblant associées au tonoplaste. Des analyses complémentaires doivent être envisagées pour confirmer ces interactions. Nous avons ensuite établi des conditions expérimentales (préparation des échantillons, tampons d'électrophorèse) permettant l'observation de différentes structures protéiques supramoléculaires de la vacuole. Ces électrophorèses en conditions non dénaturantes ont permis d'isoler un certain nombre de complexes putatifs, constitués principalement de protéases et de glycosidases. L'ATPase vacuolaire ou encore le protéasome ont également pu être identifiés à partir d'une proportion importante de leurs sous-unités. Une publication traitant de ces différents aspects, et décrivant également les résultats de l'analyse protéomique globale de la fraction soluble de la vacuole, est actuellement en cours de rédaction (Villiers F, Jarno N, Jaquinod M, Kuhn L, Nicaise M, Rabilloud T, Garin J, Bourguignon J, Proteomic analysis of *Arabidopsis thaliana* vacuoles reveals new insights into the function of this organelle).

Enfin, une dernière partie de mon travail a consisté à développer un outil informatique permettant d'exploiter plus facilement les résultats des approches d'analyses à haut débit mises en place par l'équipe : spectrométrie de masse et analyses d'expressions géniques sur puces à ADN. La base de données et l'interface de gestion créés à cette fin ont permis de définir quelques candidats potentiels à la détoxification métallique vacuolaire, dont l'un d'eux a pu faire l'objet d'une étude plus approfondie. En effet, l'identification d'une enzyme associée à la vacuole (DWARF1), participant à la biosynthèse d'une classe d'hormones et réprimée lors d'un stress cadmium a débouché sur l'observation d'une régulation de la voie de synthèse des brassinostéroïdes (BR) dans son ensemble lors du stress. Les expériences biométriques réalisées suggèrent que ces hormones influent sur la tolérance au cadmium de plantules d'*Arabidopsis thaliana*, et des analyses biochimiques semblent démontrer que les mécanismes mis en jeu ne sont pas connus. Une autre publication, décrivant la base de données développée et la probable implication des brassinostéroïdes dans la réponse de la plante aux métaux lourds est également en cours de rédaction (Villiers F, Leonhardt N, Fujioka S, Bourguignon J, Hugouvieux V, Modulation of *Arabidopsis thaliana* response to cadmium stress by modifying endogenous level of brassinosteroids).

Dans un contexte où les approches *a priori* sur des protéines de la vacuole, supposées impliquées dans la détoxification métallique (principalement des transporteurs), n'ont données que très peu de résultats, l'observation de la dynamique du protéome vacuolaire au cours d'un stress semble être une méthode particulièrement adaptée à l'identification de protéines vacuolaires impliquées dans la détoxification. Cette dynamique est observable à plusieurs échelles, et pourra être évaluée *via* différentes méthodes, dont certaines ont été développées dans ce travail.

La base de données informatique a notamment permis d'identifier des candidats vacuolaires régulés au niveau transcriptionnel. Plusieurs protéines semblent intéressantes, mais les évolutions de leurs niveaux de transcrits suite au stress devront sans doute être confirmées par d'autres approches, notamment de PCR quantitative, avant d'initier leur caractérisation. L'une d'entre elles a néanmoins commencé à être étudiée. Les analyses ont débouché sur la suggestion d'un certain nombre de mécanismes potentiellement impliqués, dont il sera nécessaire de confirmer l'implication.

L'étude de l'évolution du niveau d'accumulation des protéines est aussi un aspect particulièrement prometteur dans les études engagées. Celle-ci permettra de vérifier la corrélation entre les niveaux de régulations transcriptionnelle et traductionnelle des protéines de la vacuole. Elle permettra ainsi d'identifier des protéines (notamment des transporteurs) qui ont un rôle important dans la lutte contre le stress métallique. Deux approches ont déjà été initiées afin d'identifier de telles protéines : une méthode par marquage isotopique à l'azote 15 et une autre par analyse de gels d'électrophorèses 2D. Dans le premier cas, des vacuoles préparées à partir d'un milieu de culture ne contenant que l'isotope 15 de l'azote ont été purifiées, et utilisées comme

standard interne lors de l'analyse par LC-MS/MS de protéines vacuolaires provenant de cellules exposées ou non au cadmium. Ces données de spectrométrie de masse quantitative sont actuellement en cours d'exploitation par Nolwenn Jarno (LPCV et LEDyP, CEA-Grenoble). L'analyse à partir de gels d'électrophorèses bidimensionnelles (IEF / SDS-PAGE) consiste quant à elle en un marquage des deux échantillons protéiques à comparer par des fluorochromes différents, puis à leur co-migration au sein d'un même gel d'acrylamide (DIGE, *Difference In Gel Electrophoresis*). La détection de l'une puis de l'autre des molécules fluorescentes permet d'obtenir 2 images, comparées afin de mettre en évidence des spots protéiques exprimés différemment. Deux premiers gels ont pu être réalisés, et près de 2000 spots différents ont été résolus dont 29 ont présenté une intensité différente suite à l'exposition des cellules à 50 μM de Cd pendant 24 heures. Il s'agit malheureusement de spots minoritaires, qui n'ont pu être identifiés par spectrométrie de masse, et il sera nécessaire de renouveler ces analyses afin de tenter de connaître les protéines différenciellement exprimées. Ces résultats, prometteurs, attestent néanmoins d'une évolution du protéome vacuolaire provoquée par le stress Cd, et la très faible proportion de protéines affectées (29 protéines) suggère une réponse relativement spécifique.

Enfin, certaines modifications post-traductionnelles des protéines de la vacuole suite à un stress métallique pourraient également permettre d'identifier des protéines engagées dans des mécanismes de tolérance. Nous mettons actuellement en place une méthode d'analyse des protéines phosphorylées par spectrométrie de masse en collaboration avec LEDyP, destinée à évaluer les phosphorylations / déphosphorylations qui peuvent intervenir lors d'un stress. Dans un autre registre, la visualisation de la formation et/ou dissociation de complexes suite à un stress cadmium peut aussi être envisagée *via* l'utilisation des BN-PAGE. Concernant cette technique, des conditions satisfaisantes de préparation des échantillons et d'électrophorèse ont été établies, mais l'évaluation de l'intérêt d'employer d'autres détergents, notamment, pourrait déboucher sur une amélioration de la solubilisation des complexes protéiques et de la résolution des électrophorèses.

L'ensemble de ce travail de thèse a permis de mettre en place un certain nombre d'outils, qui pourront faciliter à l'avenir l'étude du protéome vacuolaire, et en particulier sa réponse au stress. Toutefois de nombreuses études restent encore à réaliser avant d'identifier les voies métaboliques vacuolaires de la détoxification métallique. Le fonctionnement de cet organite gagne aujourd'hui à être mieux compris, notamment son interaction avec le reste de la cellule (mise en évidence de protéines impliquées dans la transduction de signaux et d'hormones potentiellement impliquées dans la réponse au cadmium), et en particulier le cytosol. Ce travail a contribué à l'effort de caractérisation protéomique vacuolaire engagé depuis quelques années et a abouti à l'établissement de plusieurs profils protéiques de référence, mettant en évidence de nouvelles facettes de la vacuole végétale.

Annexes

Annexes

Annexe I

Protéines identifiées dans la vacuole par nos travaux. Les protéines identifiées suite à l'analyse globale des fractions solubles (en gel 1D), membranaires (en gel 1D et en solution) et à l'analyse des cartographies par IEF / SDS-PAGE du protéome soluble de la vacuole sont regroupée ici par classe fonctionnelle. Le tableau mentionne pour chaque protéine le N° AGI, la fonction, la catégorie fonctionnelle, le type, et éventuellement le nombre, de domaines de liaison à la membrane (Nm = N-myristoylation ; LLAS = Lipoprotein Lipid Attachment Site ; 0-15 = nombre de domaines transmembranaires ; P = prenylation ; GPI = ancre GPI), les scores MASCOT, pourcentages de couverture et nombres de peptides obtenus suite aux analyses mentionnées (valeurs maximales dans le cas de la cartographie 2D), le point isoélectrique (pi), la masse moléculaire (MW) et les travaux de protéomique vacuolaire les ayant identifiés (Ca = Carter *et al.* (2004) ; Sh = Shimoaka *et al.* (2004) ; Sz = Szponarski *et al.* (2004)).

289	At3g55260	GH family 20 protein, beta-N-acetylhexosaminidase	Glycosyl hydrolase	(glycoprotein synthesis)					711,61	22,92	12	322,95	11,51	6			5,88	61191	X	X
290																				
291	At3g26380	GH family 27, alpha-galactosidase family protein	Glycosyl hydrolase	alpha-galactosidase					274,60	10,66	6						8,94	72297		
292	At3g56310	GH family 27, alpha-galactosidase-like protein	Glycosyl hydrolase	alpha-galactosidase					435,033	21,281465	7	208,48	13,9	4			4,73	48332	X	X
293																				
294	At1g80170	GH family 28 protein, polygalacturonase (pectinase)	Glycosyl hydrolase	Pectinase	0				101,837	8,1081081	2						8,67	48141		
295	At3g06770	GH family 28 protein, polygalacturonase (pectinase)	Glycosyl hydrolase	Pectinase					104,403	5,0397878	2						6,04	40782		
296	At3g16850	GH family 28 protein, polygalacturonase (pectinase)	Glycosyl hydrolase	Pectinase					598,107	25,934066	8						5,46	49094	X	
297	At3g57790	GH family 28 protein, polygalacturonase (pectinase)	Glycosyl hydrolase	Pectinase	0	98	3,7	1	373,73	13,265306	5	137,905	6,3136456	3			4,8	54064		
298	At3g62110	GH family 28 protein, polygalacturonase (pectinase)	Glycosyl hydrolase	Pectinase					324,46	12,10	4						6,03	51964	X	
299	At5g49215	GH family 28 protein, polygalacturonase (pectinase)	Glycosyl hydrolase	Pectinase					250,87	10,02	4	175,06	7,69	3			5,40	48728		
300																				
301	At2g28100	GH family 29 protein, alpha-L-fucosidase	Glycosyl hydrolase	alpha-fucosidase	0				500,67	17,39	8	222,96	7,51	4			5,29	57150	X	
302																				
303	At5g11720	GH family 31 protein, alpha-glucosidase I (maltase)	Glycosyl hydrolase	alpha-glucosidase (sugar processing)					760,19	16,08	14	519,62	11,220044	10			5,58	101055	X	X
304	At5g63840	GH family 31 protein, alpha-glucosidase II (maltase)	Glycosyl hydrolase	alpha-glucosidase (sugar processing)					361,414	8,577633	7						5,86	104209		
305																				
306	At1g72990	GH family 35 protein, beta-galactosidase (beta-galactosidase)	Glycosyl hydrolase	beta-galactosidase (glycoprotein degradation)	0				41,33	1,72	1						6,27	78590		
307	At2g32810	GH family 35 protein, beta-galactosidase (beta-galactosidase)	Glycosyl hydrolase	beta-galactosidase (glycoprotein degradation)	0	38	0,9	1	789,231	22,660654	13						8,3	99135	X	X
308																				
309	At4g24040	GH family 37 protein, trehalase	Glycosyl hydrolase	trehalase (sugar processing)					80,5966	3,0351438	2						5,67	71310		
310																				
311	At3g26720	GH family 38 protein, alpha-mannosidase (mannanase)	Glycosyl hydrolase	alpha-mannosidase (glycoprotein degradation)	1	329	8,5	6	1637,36	29,342493	23	279,24	6,69	5			6,3	115148	X	X
312	At5g13980	GH family 38 protein, alpha-mannosidase (mannanase)	Glycosyl hydrolase	alpha-mannosidase (glycoprotein degradation)	1	135	6	4	1198	21,5	21	129,53	2,19	2			5,8	103983	X	X
313	At5g66150	GH family 38 protein, alpha-mannosidase (mannanase)	Glycosyl hydrolase	alpha-mannosidase (glycoprotein degradation)	1				62,2187	1,9102197	2						8,33	117933		
314																				
315	At3g21160	GH family 47 protein, 1,2-alpha-mannosidase (mannanase)	Glycosyl hydrolase	alpha-mannosidase					417,622	13,111888	7						6,09	65095		
316	At1g30000	GH family 47 protein, alpha-mannosidase (mannanase)	Glycosyl hydrolase	alpha-mannosidase	0				147,822	7,3717949	3						6,62	69025		
317																				
318	At3g10740	GH family 51 protein, alpha-L-arabinofuranosidase	Glycosyl hydrolase						659,059	22,713864	11	66,76	1,62	1			5,50	74997	X	
319																				
320	At2g40840	GH family 77 protein, 4-alpha-glucanotransferase	Glycosyl hydrolase						63,8187	2,617801	2				X		5,54	109707		
321																				
322	At5g07830	GH family 79 protein, similar to beta-glucuronidase	Glycosyl hydrolase	(glycoprotein degradation)					69,66	2,58	1						9,08	60212		
323																				
324	At5g05460	GH family 85 protein, similarity to endo-beta-glucuronidase	Glycosyl hydrolase						145,62	5,15	3						5,81	76302		
325																				
326	At5g13690	GH family 89 protein, alpha-N-acetylglucosaminidase	Glycosyl hydrolase						343,30	11,79	8						7,26	92630	X	
327																				
328	At1g22300	14-3-3 protein GF14 epsilon (GRF10)	Signal trans. / Prot. r	14-3-3 protein	0				293,79	22,44	5	99,22	10,69	2	X		4,73	28882		
329	At1g35160	14-3-3 protein GF14 phi (GRF4)	Signal trans. / Prot. r	14-3-3 protein	0				285,02	25,47	6				X		4,79	30175		
330	At2g42590	14-3-3 protein GF14 mu (GRF9)	Signal trans. / Prot. r	14-3-3 protein					88,06	8,37	2						4,86	29502		
331	At4g09000	14-3-3 protein GF14 chi / general regulator	Signal trans. / Prot. r	14-3-3 protein					445,10	41,95	9				X		4,68	29913	X	
332	At5g10450	14-3-3 protein GF14 lambda (GRF6) (AFT1)	Signal trans. / Prot. r	14-3-3 protein					228,74	20,97	4				X		4,77	27958		
333	At5g38480	14-3-3 protein GF14 psi (GRF3) (RC1)	Signal trans. / Prot. r	14-3-3 protein					313,72	38,82	7				X		4,75	28588	X	
334	At5g65430	14-3-3 protein GF14 kappa (GRF8)	Signal trans. / Prot. r	14-3-3 protein					254,06	27,82	5				X		4,82	28011		
335	At1g78300	14-3-3 protein GF14 omega (GRF2)	Signal trans. / Prot. r	14-3-3 protein	0	83,88	11,196911	2									4,7	29144	X	
336	At2g10450	14-3-3 protein, putative / grf15, putative	Signal trans. / Prot. r	14-3-3 protein	0	47,46	12,195122	1									4,7	9349		
337																				
338	At1g09210	Calreticulin 2 (CRT2), endoplasmic reticulum chaperone	Signal trans. / Prot. r	Ca2+ binding	0				51,5366	2,1226415	1						4,37	48127	X	
339	At1g56340	calreticulin 1 (CRT1)	Signal trans. / Prot. r	Ca2+ binding	1	186	14,6	4									4,5	48497		
340	At1g66410	Calmodulin-1/4 (CAM4)	Signal trans. / Prot. r	Ca2+ binding	0				32,89	5,37	1				X		4,14	16851		
341	At2g27030	calmodulin-2/3/5 (CAM5) (TCH1)	Signal trans. / Prot. r	Ca2+ binding	0	84	33,557047	2									4,1	16809		
342	At2g41100	Calmodulin-related protein 3 / touch-responsive protein	Signal trans. / Prot. r	Ca2+ binding	asmb	47	4,3	1									4,7	26534		
343																				
344	At5g43940	Glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase	Signal trans. / Prot. r	GSNO is linked to Cd response					65,47	3,43	2						6,51	40673		
345																				
346	At3g45240	Protein kinase family protein, GRIK1 (GEM1)	Signal trans. / Prot. r	Kinase					72,75	3,28	1						4,85	44545		
347	At4g21410	Protein kinase family protein, contains Pfam domain	Signal trans. / Prot. r	Kinase					145,41	3,83	3	223,17	6,11	4			6,81	75672		
348	At5g61350	Protein kinase family protein, endomembrane-associated	Signal trans. / Prot. r	Kinase					68,6633	1,3064133	1	182,28	4,0380048	3			5,92	92629		X
349	At2g42630	Protein kinase family protein	Signal trans. / Prot. r	Kinase	lipopro	38	3,6	1									8,0	40171		
350																				
351	At1g06840	Leucine-rich repeat transmembrane protein	Signal trans. / Prot. r	LRR K	0				165,857	4,0468584	3						6,55	103848		
352	At1g51850	Leucine-rich repeat protein kinase, endomembrane-associated	Signal trans. / Prot. r	LRR K	0				68,5733	2,1965318	1						5,83	96060		
353	At2g01820	Leucine-rich repeat protein kinase, putative	Signal trans. / Prot. r	LRR K	0				661,64	11,983033	9	156,01	2,9157667	2			5,93	101896		
354	At3g02880	Leucine-rich repeat transmembrane protein	Signal trans. / Prot. r	LRR K					183,96	7,66	4						8,60	67710		
355	At3g23750	Leucine-rich repeat family protein, plasma membrane-associated	Signal trans. / Prot. r	LRR K					92,37	3,99	3						5,46	99901		
356	At5g16900	Leucine-rich repeat protein kinase, putative	Signal trans. / Prot. r	LRR K					83,13	2,77	2						6,00	97191		
357	At1g48480	leucine-rich repeat transmembrane protein	Signal trans. / Prot. r	LRR K	2	37,19	1,3740458	1									8,3	71087		
358																				
359	At1g18080	WD-40 repeat family protein / auxin-dependent protein	Signal trans. / Prot. r	Miscellaneous	0				106,08	11,01	2						7,61	35725		
360																				
361	At1g13900	Calcineurin-like phosphoesterase family protein	Signal trans. / Prot. r	Phosphatase	0				98,6166	3,8109756	2						5,78	73670		

726	At3g11780	MD-2-related lipid recognition domain-cont	Unclassified	[Lipid / Mb] [binding / targeting]							151,127	16,993464	2	102,38	18,42	2			4,93	16794	X
727	At3g44100	MD-2-related lipid recognition domain-cont	Unclassified	[Lipid / Mb] [binding / targeting]							167,6	18,421053	2						8,38	16059	X
728																					
729	At3g11770	Nucleic acid binding protein, putative	Unclassified	Nucleic acid related	MB	208,61	28,5	4	103,02	15	2	399,497	30	5					5,3	22942	X
730	At3g21000	Nucleic acid binding protein, putative	Unclassified	Nucleic acid related								38,33	2,47	1					5,94	46292	
731	At2g24420	DNA repair ATPase-related contains 2 tran	Unclassified	Nucleic acid related	2	62	2,7272727	1											9,4	50321	
732	At5g53960	ATP binding / DNA binding / DNA topoisom	Unclassified	Nucleic acid related	0	34	4,7619048	1											4,8	21970	
733	At1g75530	forkhead-associated domain-containing pr	Unclassified	Nucleic acid related	0	35	1,4	1											4,6	63231	
734	At4g02840	Small nuclear ribonucleoprotein D1, putativ	Unclassified	Nucleic acid related	0				79,44	17,241379	1								11,2	12742	
735	At3g07590	Small nuclear ribonucleoprotein D1, putativ	Unclassified	Nucleic acid related	0	97	17,5	1											11,2	12592	
736																					
737	At4g22690	cytochrome P450 family protein	Unclassified	Cytochrome	1	52	2,3	1											6,7	63077	
738	At3g27240	cytochrome c1, putative	Unclassified	Cytochrome	2	113	15,0	3											5,7	33629	X
739	At4g32470	ubiquinol-cytochrome C reductase complex	Unclassified	Cytochrome	0	221	38,5	4											9,7	14518	
740	At4g21105	cytochrome-c oxidase/ electron carrier	Unclassified	Cytochrome	1	63	45,6	1											9,9	7679	
741	At1g22840	cytochrome c, putative	Unclassified	Cytochrome	0	60	9,6	1											9,3	12386	
742																					
743	At3g16640	Protein homologous to translationally contr	Unclassified		0	55	5,4	1				104,63	11,31	2				X	4,5	18898	
744	At3g16990	TENA/THI-4 family protein	Unclassified									65,40	4,52	1					4,90	25054	
745	At5g57700	BNR/Asp-box repeat family protein	Unclassified									387,79	21,02	6	200,77	9,60	3		5,44	39016	
746	At1g04100	Auxin-responsive protein / indoleacetic acid	Unclassified		0							39,14	3,45	1					5,98	27861	
747	At1g54990	auxin responsive	Unclassified		1	93,13	5,9196617	2											5,6	52387	
748	At2g04690	Cellular repressor of E1A-stimulated genes	Unclassified		0							317,295	30,952381	5					6,96	23579	X
749	At2g34790	EDA28/MEE23 (MATERNAL EFFECT EME	Unclassified		0							549,19	21,052632	8					6,01	59609	
750	At1g43620	UDP-glucose:sterol glucosyltransferase, pu	Unclassified		1	39	1,1	1											5,4	68302	X
751	At3g15310	transposable element gene	Unclassified		0	41	1,9	1											8,5	48213	
752	At5g39410	binding / catalytic; Identical to Probable mit	Unclassified		0	117	11,2	3											8,5	49650	X
753	At4g12730	fasciclin-like arabinogalactan-protein (FLA2	Unclassified	Gpi an	1	31	2,0	1											6,1	43421	
754	At3g62360	carbohydrate binding	Unclassified		1	162	3,3	3											6,0	132861	
755	At3g48680	bacterial transferase hexapeptide repeat-ct	Unclassified		0	58	5,1	1											8,9	27939	
756	At5g39380	calmodulin-binding protein-related has wea	Unclassified		0	41	2	1											9,3	56380	
757	At1g13040	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing	Unclassified		0	39	2,1	1											8,4	58638	
758	At5g27310	similar to Golgi GDP mannose transporter	Unclassified		0				36,9	2,4324324	1								8,8	42462	
759	At2g44640	similar to PDE320 (PIGMENT DEFECTIVE	Unclassified		0	81	4,7	2											8,8	49800	
760	At1g12870	S locus F-box-related	Unclassified		0	39	1,7	1											8,9	48375	
761	At3g17040	tetratricopeptide repeat (TPR)-containing p	Unclassified		0	46	1,4	1											9,2	73425	
762	At5g42020	luminal binding protein 2 (BIP-2)	Unclassified		1	935	33,1	16										X	5,2	67359	X
763	At1g22510	zinc finger (C3HC4-type RING finger) fami	Unclassified		2	37	4,9	1											8,1	20767	
764	At1g68070	zinc finger (C3HC4-type RING finger) fami	Unclassified		5	186	7,3	2	187,22	7,2886297	2								5,2	38273	
765	At3g61180	zinc finger (C3HC4-type RING finger) fami	Unclassified		6				56,6	2,6385224	1								5,0	42461	
766	At3g13870	root hair defective 3 (RHD3)	Unclassified		0	39	1,4	1											5,4	89036	
767	At3g26810	transport inhibitor response protein, putativ	Unclassified		0	38	1,2	1											7,2	64563	
768	At5g25260	expressed protein similarity to fitillin-1	Unclassified		0	165	6,6954644	3											6,0	51387	
769	At2g21160	translocon-associated protein alpha (TRAP	Unclassified		1	54,8	5,8139535	1	80,304	5,8823529	4								5,1	28150	X
770	At5g14030	translocon-associated protein beta (TRAP	Unclassified		2	68	14,871795	2											9,7	21091	X
771	At5g43970	Subunit of the TOM complex, a translocase	Unclassified		1	37,34	11,111111	1											9,8	10372	
772	At5g08670	ATP synthase beta chain 1	Unclassified	MB	785,97	33,633094	12												6,2	59634	X
773	At3g52300	ATP synthase D chain-related contains we	Unclassified	MB	75	10,119048	2												5,1	19574	
774	At5g24650	mitochondrial import inner membrane trans	Unclassified		3	61,91	5,4054054	1											9,6	27755	X
775	At3g07180	GPI transamidase component	Unclassified		2	53	3,1719533	2											6,5	67087	
776	At3g60040	F-box family protein contains a novel domai	Unclassified		2	38	1,3126492	1											8,5	94133	
777	At5g67480	TAZ zinc finger family protein	Unclassified		0	58	6,1827957	2											9,3	42434	
778	At3g25780	allene oxide cyclase, putative	Unclassified		0	59,49	5,4263566	1											9,2	28380	
779	At4g33110	cochlorane N-methyltransferase, putative	Unclassified		0	39	4,5070423	1											6,4	41202	
780	At4g34700	complex 1 family protein	Unclassified	asmb	1	37,96	9,4017094	1											8,7	13608	
781	At3g51050	FG-GAP repeat-containing protein	Unclassified		1	45,36	2,1489971	1											7,8	77627	
782	At1g51980	mitochondrial processing peptidase alpha	Unclassified		2	425,61	23,06163	9											5,9	54368	X
783	At1g61000	Nuf2 family protein contains Pfam PF0380	Unclassified		6	39	0,9	1											5,2	111589	X
784	At3g28480	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase fam	Unclassified		1	38	3,8	1											6,3	35547	
785	At5g11560	PQQ enzyme repeat-containing protein cor	Unclassified		1	96	2,1	2											6,3	108332	X
786	At2g01470	St12p protein (ST12p) / SEC12p protein, p	Unclassified		1	63	3,8	1											5,5	42767	
787	At5g10350	polyadenylate-binding protein family protei	Unclassified		0				47,32	3,6866359	1								4,9	24788	
788	At5g40930	putative import receptor subunit TOM20-4	Unclassified		1	43,32	5,3475936	1											5,4	20960	
789	At3g12800	short-chain dehydrogenase/reductase (SD	Unclassified		0	46,73	4,6978866	1											9,2	31777	
790	At1g30470	SIT4 phosphatase-associated family protei	Unclassified		0	34	2,5	1											4,4	89832	
791	At4g24430	Lyase	Unclassified		0	34	1,8	1											5,0	55327	
792																					
793	At1g08480	Expressed protein	Unclassified		2	61,7	6,3380282	1											6,3	15803	X
794	At1g36050	Expressed protein	Unclassified		2	42	2,6	1											6,1	43331	
795	At1g53760	Expressed protein	Unclassified		1	73	7,0	1											9,5	30587	
796	At1g53770	Expressed protein	Unclassified		1	38	1,4	1											7,9	63903	
797	At1g55265	Expressed protein	Unclassified		0							55,05	5,71	1	46,99	8,67	1		5,00	19125	X

Annexe II

Protéines majeures des fractions enrichies en cytosol. Après séparation par IEF SDS-PAGE, la composition protéique des spots majeur sa été déterminée par LC-MS/MS. 256 spots ont été résolus, donnant lieu à 200 analyses par spectrométrie de masse (plusieurs spots ayant été parfois analysés ensemble), qui ont conduit à l'identification de 153 protéines différentes. Parmi celles-ci, 83 (*) avaient été précédemment identifiées dans la vacuole. Les spots dans lesquels les protéines mentionnées ont été identifiées sont précisés (**spots**).

N° AGI	Annotation	V _{total}	V _{2D}	Spots
Transport				
At5g53560	Cytochrome b5 isoform 1	*		44
Dégradation de protéines				
At5g35590	20S proteasome alpha subunit A1 (PAA1)	*		110
At2g05840	20S proteasome alpha subunit A2 (PAA2)	*		115
At3g22110	20S proteasome alpha subunit C (PAC1)	*		126
At1g53850	20S proteasome alpha subunit E1 (PAE1)	*		86
At2g27020	20S proteasome alpha subunit G (PAG1)	*		116
At4g31300	20S proteasome beta subunit A (PBA1)	*		104;112;113;119
At3g22630	20S proteasome beta subunit D (PBD1)	*		112;120
At3g60820	20S proteasome beta subunit F1 (PBF1)	*		121;125
At1g64520	26S proteasome regulatory subunit			85
At5g60160	Aspartyl aminopeptidase putative	*	*	190
At2g24200	Cytosol aminopeptidase	*	*	34;35
At3g51800	Metallopeptidase M24			23
At1g63770	Peptidase M1 family protein	*		39
At5g65620	Peptidase M3 : thimet oligopeptidase	*		37;38
At1g50380	Prolyl oligopeptidase	*		197
At3g53970	Proteasome inhibitor-related			4
At1g47710	Serpin (serine protease inhibitor)	*	*	12
At4g20850	Subtilase (Tripeptidyl-peptidase II)	*	*	198
At2g30110	Ubiquitin activating enzyme 1 (UBA1)			195
At1g16890	Ubiquitin-conjugating enzyme			71
Synthèse de protéines				
At3g22230	60S ribosomal protein L27 (RPL27B)			49
At1g09640	Elongation factor 1B-gamma putative			89
At1g56070	Elongation factor 2, putative	*		77;129;130;153;170
At5g44320	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7			177
At3g13920	Eukaryotic translation initiation factor 4A-2			74;77
At5g57870	Eukaryotic translation initiation factor 4F			89
Glycosyl hydrolase				
At2g40840	Glycoside hydrolase (GH77)	*		39

N° AGI	Annotation	V _{total}	V _{2D}	Spots
Transduction de signal / régulation				
At1g22300	14-3-3 protein GF14 epsilon (GRF10)	*	*	16;76;84
At5g65430	14-3-3 protein GF14 kappa (GRF8)	*		16
At5g10450	14-3-3 protein GF14 lambda (GRF6)	*		13;14;15
At3g02520	14-3-3 protein GF14 nu (GRF7)			13
At1g35160	14-3-3 protein GF14 phi (GRF4)	*		60;85
At5g38480	14-3-3 protein GF14 psi (GRF3)	*		12
At4g09000	14-3-3-like protein GF14 chi (GRF1)	*		13;14;15;59;84
At1g66410	Calmodulin-1/4 (CAM4)	*		43
At2g44100	Rab GDP dissociation inhibitor (GDI1)			184
At3g63130	RAN GTPase activating protein 1 (RanGAP1)			172
Réponse au stress / protection cellulaire				
At3g28940	Avirulence-responsive protein putative			3
At1g19570	Dehydroascorbate reductase	*	*	103
At2g26740	Epoxide hydrolase, soluble (sEH)	*		131
At2g41530	Esterase putative	*		110;128
At3g24170	Glutathione reductase putative	*		190;191
At1g78380	Glutathione S-transferase	*		19;20;103;108
At2g30870	Glutathione S-transferase	*	*	19;20;102;107
At5g02500	heat shock cognate (HSC70-1)	*		12;31;32
At5g02490	heat shock cognate (HSC70-2)			81
At3g09440	heat shock cognate (HSC70-3)	*		14;15;178
At5g52640	Heat shock protein 81-1 (HSP81-1)			12;86;
At5g56030	Heat shock protein 81-2 (HSP81-2)	*		11;78;
At3g12580	heat shock protein(HSP70)	*		155;156;163
At1g11840	Lactoylglutathione lyase putative / glyoxalase I putative	*		90;91;93
At2g44060	Late embryogenesis abundant (LEA)			84
At3g52880	Monodehydroascorbate reductase	*		154;162
At5g16970	NADP-dependent oxidoreductase	*		149
At2g17420	NADPH-dependent thioredoxin reductase 1 (NTR1)	*		132
At4g25100	Superoxide dismutase (Fe)			21;22;119
At5g42980	Thioredoxin H-type 3 (TRX-H-3)	*		5;6;52
At1g45145	Thioredoxin H-type 5 (TRX-H-5) (TOUL)	*		54
At4g26840	Ubiquitin-like protein (SMT3)	*		62
Métabolisme				
At1g62380	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase			83;90
At1g79500	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase			138
At3g02360	6-phosphogluconate dehydrogenase			192
At5g47720	Acetyl-CoA C-acyltransferase putative			57
At2g05710	Aconitate hydratase	*		40
At4g35830	Aconitate hydratase	*		40
At3g09820	Adenosine kinase 1 (ADK1)	*		26;142
At3g23810	Adenosylhomocysteinase putative			191
At1g17290	Alanine aminotransferase	*		182
At5g19440	Alcohol dehydrogenase			137
At3g48990	AMP-dependent synthetase and ligase			135;138

N° AGI	Annotation	V _{total}	V _{2D}	Spots
At5g19550	Aspartate aminotransferase	*		163;168;169;170
At1g77120	ATADH	*	*	155
At5g17920	ATMETS	*		29;41;42;143
At5g49460	ATP-citrate synthase putative			124
At4g14880	Cysteine synthase	*		151
At2g32520	Dienelactone hydrolase			99
At1g48030	Dihydrolipoamide dehydrogenase 1	*	*	189
At2g36530	Enolase	*	*	177
At5g14780	Formate dehydrogenase (FDH)			156
At2g36460	Fructose-bisphosphate aldolase	*		164;167
At3g52930	Fructose-bisphosphate aldolase	*		27;28
At5g42740	Glucose-6-phosphate isomerase	*		187
At1g65930	Isocitrate dehydrogenase	*		153
At5g43330	Malate dehydrogenase			165
At1g04410	Malate dehydrogenase, cytosolic	*		139;28b
At5g11670	Malic enzyme	*		186;188;199
At2g44160	Methylenetetrahydrofolate reductase 2 (MTHFR2)			92
At5g03630	Monodehydroascorbate reductase putative			176
At5g17000	NADP-dependent oxidoreductase			166
At4g13940	Nascent polypeptide associated complex alpha chain protein	*		34;35;190
At3g44300	Nitrilase 2 (NIT2)	*		146;147;148
At3g25230	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase			193;194;
At2g31390	pfkB-type carbohydrate kinase	*		96;98;100;144;145
At4g37870	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	*		187
At4g38370	Phosphoglycerate / bisphosphoglycerate mutase			123
At1g79550	Phosphoglycerate kinase	*		29;30
At1g12000	Pyrophosphate-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase beta subunit			36;37
At4g33070	Pyruvate decarboxylase			37
At5g54960	Pyruvate decarboxylase putative			36
At2g42910	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 4			166
At3g55440	Triosephosphate isomerase	*	*	17;18;57;97;101;102
At3g03250	UDP-glucose pyrophosphorylase putative			184;185
At3g54470	Uridine 5'-monophosphate synthase			111
At5g49650	Xylulose kinase putative			181
Remaniements lipidiques				
At3g15730	Phospholipase D alpha 1	*		183
Autres				
At5g05010	Clathrin adaptor complexes medium subunit-related			13
At3g14990	4-methyl-5-(b-hydroxyethyl)-thiazole monophosphate biosynthesis	*		94
At5g59880	Actin-depolymerizing factor 3 (ADF3)			7;9
At2g37760	aldo/keto reductase			137;200
At1g60710	Aldo/keto reductase	*		117;118;122
At2g38230	ATPDX1.1 (protein predicted to functionwith PDX2 to form glutamine)	*		136
At3g16050	ATPDX1.1 (protein predicted to functionwith PDX2 to form glutamine)	*		136
At3g23990	chaperonin (CPN60) (HSP60)	*		179

N° AGI	Annotation	V _{total}	V _{2D}	Spots
At3g13470	chaperonin putative			179
At1g30630	coatomer protein epsilon (COPE) family protein	*		95
At5g01410	Encodes a protein predicted to function with PDX2 to form glutamine	*		133;136
At4g39260	Glycine-rich RNA-binding protein 8 (GRP8)	*		61
At4g16143	Importin alpha-2 (IMPA-2)			173
At3g11710	lysyl-tRNA synthetase			33
At5g11330	Monoxygenase			176
At1g27970	Nuclear transport factor 2 (NTF2)			68
At2g03640	Nuclear transport factor 2 (NTF2)			50
At5g60980	Nuclear transport factor 2 (NTF2)			58
At4g09320	Nucleoside diphosphate kinase 1 (NDK1)	*		8;10;63
At4g38740	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	*		72
At2g19760	Profilin 1			51
At4g29350	Profilin 2	*		5
At1g07370	Proliferating cell nuclear antigen 1 (PCNA1)			79
At2g29570	Proliferating cell nuclear antigen 2 (PCNA2)			80
At1g21750	Protein disulfide isomerase-like (PDIL)			174
At3g02230	Reversibly glycosylated polypeptide-1 (RGP1)	*	*	27;142
At2g28000	RuBisCO subunit binding-protein alpha subunit			174
At2g30410	Tubulin folding cofactor A (KIESEL)			56
Non classées				
At1g35720	Annexin 1 (ANN1)	*		24;25;142;144;145;146;147
At5g65020	Annexin 2 (ANN2)			150
At1g60420	DC1 domain-containing protein			175;180
At3g53110	DEAD/DEAH box helicase			105
At5g11170	DEAD/DEAH box helicase			75
At1g08200	Expressed protein			178
At1g63000	Expressed protein			134
At3g60450	Expressed protein			47
At4g27450	Expressed protein			114
At5g02240	Expressed protein	*		127
At2g21660	Glycine-rich RNA-binding protein (GRP7)			64
At5g48180	Kelch repeat-containing protein	*		99
At5g42020	luminal binding protein 2 (BiP-2)	*		171
At4g10480	Nascent polypeptide associated complex alpha chain protein			48
At2g16940	RNA recognition motif (RRM)-containing protein			53
At4g32720	RNA recognition motif (RRM)-containing protein			87
At4g22670	tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein			88
At3g16640	Translationally controlled tumor family protein	*		1;2;53
At3g04780	Unknown protein			3
Aucune identification				45;46;55;65;66;67;69;70;73;82;106;109 140;141;152;157;158;159;160;161;196

Annexe III

Enzymes de la voie de biosynthèse des stérols et des brassinostéroïdes. Les valeurs mentionnées correspondent aux niveaux d'accumulation des transcrits des gènes codant ces enzymes, dans les racines, pour 2 h et 30 h d'exposition à 5 µM et 50 µM de Cd. La classification AraCyc (www.arabidopsis.org/biocyc/index.jsp) de chacune de ces enzymes est également mentionnée.

AGI	Fonction	Nom	5 µM Cd		50 µM Cd		Classification AraCyc
			2 h	30 h	2 h	30 h	
At5g13710	sterol methyltransferase	SMT1	1	1	1	0,56	Sterol biosynthesis
At1g20330	24-methylenelophenol-C24-methyltransferase	SMT2	1	0,57	0,55	1	Sterol biosynthesis
At1g76090	sterol methyltransferase	SMT3	0,61	1	1	0,47	Sterol biosynthesis
At3g02580	Δ7-sterol-C5-desaturase	DWF7	1	1	1	1	Sterol biosynthesis
At1g50430	sterol Δ7 reductase	DWF5	1	1	1	1	Sterol biosynthesis
At3g19820	24-methylenecholesterol reductase	DWF1	0,57	1	0,59	0,6	Sterol biosynthesis
At3g55360	enoyl-CoA reductase 3-oxo-5-α-steroid 4-DH	CER10	1	1	0,6	0,44	BR biosynthesis I, II, III
At5g16010	3-oxo-5-α-steroid 4-dehydrogenase		1	1	1	4,82	BR biosynthesis I, II, III
At2g16530	3-oxo-5-α-steroid 4-dehydrogenase		-	-	-	-	BR biosynthesis I, II, III
At1g72590	3-oxo-5-α-steroid 4-dehydrogenase		-	-	-	-	BR biosynthesis I, II, III
At3g50660	steroid 22α-hydroxylase	DWF4	1	1	1	1	BR biosynthesis I, II
?		SAX1	-	-	-	-	BR biosynthesis II
At2g38050	sterol 5-α reductase	DET2	1	1	1	1	BR biosynthesis II
At5g05690	6-deoxo-cathasterone 23α-hydroxylase	DWF3 / CPD	1	1	1	1	BR biosynthesis I, II
At5g38970	brassinosteroid C6-oxidase	BR6OX	-	-	-	-	BR biosynthesis I

Bibliographie

Bibliographie

A

- Abel S, Krauss GJ, Glund K** (1989) Ribonuclease in tomato vacuoles: high-performance liquid chromatographic analysis of ribonucleolytic activities and base specificity. *Biochem. Biophys. Act.* **998**: 145-150
- Akaboshi M, Hashimoto H, Ishida H, Saijo S, Koizumi N, Sato M, Shimizu T** (2008) The crystal structure of plant-specific calcium-binding protein AtCBL2 in complex with the regulatory domain of AtCIPK14. *J Mol Biol* **377**: 246-257
- Akoh CC, Lee GC, Liaw YC, Huang TH, Shaw JF** (2004) GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog Lipid Res* **43**: 534-552
- Alexandersson E, Saalbach G, Larsson C, Kjellbom P** (2004) Arabidopsis plasma membrane proteomics identifies components of transport, signal transduction and membrane trafficking. *Plant Cell Physiol* **45**: 1543-1556
- Antao CM, Malcata FX** (2005) Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiol Biochem* **43**: 637-650
- Apse MP, Blumwald E** (2007) Na⁺ transport in plants. *FEBS Lett* **581**: 2247-2254
- Asami T, Mizutani M, Fujioka S, Goda H, Min YK, Shimada Y, Nakano T, Takatsuto S, Matsuyama T, Nagata N, Sakata K, Yoshida S** (2001) Selective interaction of triazole derivatives with DWF4, a cytochrome P450 monooxygenase of the brassinosteroid biosynthetic pathway, correlates with brassinosteroid deficiency in planta. *J Biol Chem* **276**: 25687-25691
- Asami T, Nakano T, Fujioka S** (2005) Plant brassinosteroid hormones. *Vitam Horm* **72**: 479-504
- Atteia A, van Lis R, Mendoza-Hernandez G, Henze K, Martin W, Riveros-Rosas H, Gonzalez-Halphen D** (2003) Bifunctional aldehyde/alcohol dehydrogenase (ADHE) in chlorophyte algal mitochondria. *Plant Mol Biol* **53**: 175-188
- Aubert S, Gout E, Bligny R, Marty-Mazars D, Barrieu F, Alabouvette J, Marty F, Douce R** (1996) Ultrastructural and biochemical characterization of autophagy in higher plant cells subjected to carbon deprivation: control by the supply of mitochondria with respiratory substrates. *J Cell Biol* **133**: 1251-1263

B

- Banas A, Carlsson AS, Huang B, Lenman M, Banas W, Lee M, Noiriel A, Benveniste P, Schaller H, Bouvier-Nave P, Stymne S** (2005) Cellular sterol ester synthesis in plants is performed by an enzyme (phospholipid:sterol acyltransferase) different from the yeast and mammalian acyl-CoA:sterol acyltransferases. *J Biol Chem* **280**: 34626-34634
- Bardel J, Louwagie M, Jaquinod M, Jourdain A, Luche S, Rabilloud T, Macherel D, Garin J, Bourguignon J** (2002) A survey of the plant mitochondrial proteome in relation to development. *Proteomics* **2**: 880-898
- Barrett M** (1995) Metabolism of herbicides by cytochrome P450 in corn. *Drug Metabol Drug Interact* **12**: 299-315
- Barroso JB, Corpas FJ, Carreras A, Rodriguez-Serrano M, Esteban FJ, Fernandez-Ocana A, Chaki M, Romero-Puertas MC, Valderrama R, Sandalio LM, del Rio LA** (2006) Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *J Exp Bot* **57**: 1785-1793
- Bassham DC, Laporte M, Marty F, Moriyasu Y, Ohsumi Y, Olsen LJ, Yoshimoto K** (2006) Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy* **2**: 2-11
- Belenghi B, Acconcia F, Trovato M, Perazzolli M, Bocedi A, Polticelli F, Ascenzi P, Delledonne M** (2003) AtCYS1, a cystatin from Arabidopsis thaliana, suppresses hypersensitive cell death. *Eur J Biochem* **270**: 2593-2604

- Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D** (2008) New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 21-39
- Bethke PC, Hillmer S, Jones RL** (1996) Isolation of Intact Protein Storage Vacuoles from Barley Aleurone (Identification of Aspartic and Cysteine Proteases). *Plant Physiol* **110**: 521-529
- Binzel ML, Hess FD, Bressan RA, Hasegawa PM** (1988) Intracellular Compartmentation of Ions in Salt Adapted Tobacco Cells. *Plant Physiol* **86**: 607-614
- Bishop GJ, Koncz C** (2002) Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling. *Plant Cell* **14 Suppl**: S97-110
- Bishop JG, Dean AM, Mitchell-Olds T** (2000) Rapid evolution in plant chitinases: molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5322-5327
- Blee E** (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci* **7**: 315-322
- Blumwald E, Poole RJ** (1985a) Nitrate storage and retrieval in Beta vulgaris: Effects of nitrate and chloride on proton gradients in tonoplast vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 3683-3687
- Blumwald E, Poole RJ** (1985b) Na/H Antiport in Isolated Tonoplast Vesicles from Storage Tissue of Beta vulgaris. *Plant Physiol* **78**: 163-167
- Boller T, Kende H** (1979) Hydrolytic Enzymes in the Central Vacuole of Plant Cells. *Plant Physiol* **63**: 1123-1132
- Bolter B, Soll J, Hill K, Hemmler R, Wagner R** (1999) A rectifying ATP-regulated solute channel in the chloroplastic outer envelope from pea. *Embo J* **18**: 5505-5516
- Book AJ, Yang P, Scalf M, Smith LM, Vierstra RD** (2005) Tripeptidyl peptidase II. An oligomeric protease complex from Arabidopsis. *Plant Physiol* **138**: 1046-1057
- Bourguignon J, Merand V, Rawsthorne S, Forest E, Douce R** (1996) Glycine decarboxylase and pyruvate dehydrogenase complexes share the same dihydrolipoamide dehydrogenase in pea leaf mitochondria: evidence from mass spectrometry and primary-structure analysis. *Biochem J* **313 (Pt 1)**: 229-234
- Bourguignon J, Vaublanc P, Merand V, Forest E, Neuburger M, Douce R** (1993) Glycine decarboxylase complex from higher plants. Molecular cloning, tissue distribution and mass spectrometry analyses of the T protein. *Eur J Biochem* **217**: 377-386
- Bovet L, Feller U, Martinoia E** (2005) Possible involvement of plant ABC transporters in cadmium detoxification: a cDNA sub-microarray approach. *Environment International* **31**: 263-267
- Briskin DP, Thornley WR, Wyse RE** (1985) Membrane Transport in Isolated Vesicles from Sugarbeet Taproot : II. Evidence for a Sucrose/H-Antiport. *Plant Physiol* **78**: 871-875
- Broadley MR, Bowen HC, Cotterill HL, Hammond JP, Meacham MC, Mead A, White PJ** (2003) Variation in the shoot calcium content of angiosperms. *J Exp Bot* **54**: 1431-1446
- Browne SC, Coombe BG** (1984) Proposal for hexose group transport at the tonoplast of grape pericarp cells. *Physiol.veg.* **22**: 231-240
- Brugiere S, Kowalski S, Ferro M, Seigneurin-Berny D, Miras S, Salvi D, Ravanel S, d'Herin P, Garin J, Bourguignon J, Joyard J, Rolland N** (2004) The hydrophobic proteome of mitochondrial membranes from Arabidopsis cell suspensions. *Phytochemistry* **65**: 1693-1707
- Buchner P, Takahashi H, Hawkesford MJ** (2004) Plant sulphate transporters: co-ordination of uptake, intracellular and long-distance transport. *J Exp Bot* **55**: 1765-1773

C

- Canut H, Alibert G, Boudet AM** (1985) Hydrolysis of Intracellular Proteins in Vacuoles Isolated from Acer pseudoplatanus L. Cells. *Plant Physiol* **79**: 1090-1093
- Canut H, Dupré M, Carrasco A, Boudet AM** (1987) AtMRP2, an Arabidopsis ATP binding cassette transporter able to. *planta* **170**: 541-549
- Carpaneto A** (2003) Nickel inhibits the slowly activating channels of radish vacuoles. *Eur Biophys J* **32**: 60-66
- Carter C, Pan S, Zouhar J, Avila EL, Girke T, Raikhel NV** (2004) The vegetative vacuole proteome of Arabidopsis thaliana reveals predicted and unexpected proteins. *Plant Cell* **16**: 3285-3303
- Cazale AC, Clemens S** (2001) Arabidopsis thaliana expresses a second functional phytochelatin synthase. *FEBS Lett* **507**: 215-219

- Chang A, Fink GR** (1995) Targeting of the yeast plasma membrane [H⁺]ATPase: a novel gene AST1 prevents mislocalization of mutant ATPase to the vacuole. *J Cell Biol* **128**: 39-49
- Chen A, Komives EA, Schroeder JI** (2006) An improved grafting technique for mature Arabidopsis plants demonstrates long-distance shoot-to-root transport of phytochelatin in Arabidopsis. *Plant Physiol* **141**: 108-120
- Choi YE, Harada E, Wada M, Tsuboi H, Morita Y, Kusano T, Sano H** (2001) Detoxification of cadmium in tobacco plants: formation and active excretion of crystals containing cadmium and calcium through trichomes. *Planta* **213**: 45-50
- Christensen A, Svensson K, Persson S, Jung J, Michalak M, Widell S, Sommarin M** (2008) Functional characterization of Arabidopsis calreticulin1a: a key alleviator of endoplasmic reticulum stress. *Plant Cell Physiol* **49**: 912-924
- Chvatchko Y, Howald I, Riezman H** (1986) Two yeast mutants defective in endocytosis are defective in pheromone response. *Cell* **46**: 355-364
- Clemens S** (2006) Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* **88**: 1707-1719
- Clemens S, Antosiewicz DM, Ward JM, Schachtman DP, Schroeder JI** (1998) The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 12043-12048
- Clemens S, Kim EJ, Neumann D, Schroeder JI** (1999) Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *Embo J* **18**: 3325-3333
- Cobbett CS** (2000) Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol* **123**: 825-832
- Cobbett CS, May MJ, Howden R, Rolls B** (1998) The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, cad2-1, of Arabidopsis thaliana is deficient in gamma-glutamylcysteine synthetase. *Plant J* **16**: 73-78
- Collinge DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen U, Vad K** (1993) Plant chitinases. *Plant J* **3**: 31-40
- Connolly EL, Fett JP, Guerinot ML** (2002) Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell* **14**: 1347-1357
- Conradt B, Shaw J, Vida T, Emr S, Wickner W** (1992) In vitro reactions of vacuole inheritance in Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Biol* **119**: 1469-1479
- Courtois C, Besson A, Dahan J, Bourque S, Dobrowolska G, Pugin A, Wendehenne D** (2008) Nitric oxide signalling in plants: interplays with Ca²⁺ and protein kinases. *J Exp Bot* **59**: 155-163
- Cram J** (1983) Characteristics of Sulfate Transport Across Plasmalemma and Tonoplast of Carrot Root Cells. *Plant Physiol* **72**: 204-211
- Crowell DN, Huizinga DH, Deem AK, Trobaugh C, Denton R, Sen SE** (2007) Arabidopsis thaliana plants possess a specific farnesylcysteine lyase that is involved in detoxification and recycling of farnesylcysteine. *Plant J* **50**: 839-847
- Curie C, Briat JF** (2003) Iron transport and signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 183-206
- Curie C, Panaviene Z, Loulergue C, Dellaporta SL, Briat JF, Walker EL** (2001) Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* **409**: 346-349

D

- da Silva Conceicao A, Marty-Mazars D, Bassham DC, Sanderfoot AA, Marty F, Raikhel NV** (1997) The syntaxin homolog AtPEP12p resides on a late post-Golgi compartment in plants. *Plant Cell* **9**: 571-582
- Dahlqvist A, Stahl U, Lenman M, Banas A, Lee M, Sandager L, Ronne H, Stymne S** (2000) Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6487-6492
- Dalton TP, He L, Wang B, Miller ML, Jin L, Stringer KF, Chang X, Baxter CS, Nebert DW** (2005) Identification of mouse SLC39A8 as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 3401-3406
- Dameron CT, Smith BR, Winge DR** (1989) Glutathione-coated cadmium-sulfide crystallites in Candida glabrata. *J Biol Chem* **264**: 17355-17360

- Davies DR** (1990) The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **19**: 189-215
- Davies JM, Poole RJ, Rea PA, Sanders D** (1992) Potassium transport into plant vacuoles energized directly by a proton-pumping inorganic pyrophosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 11701-11705
- Davies JM, Rea PA, Sanders D** (1991) Vacuolar proton-pumping pyrophosphatase in *Beta vulgaris* shows vectorial activation by potassium. *FEBS Lett* **278**: 66-68
- De Angeli A, Monachello D, Ephritikhine G, Frachisse JM, Thomine S, Gambale F, Barbier-Brygoo H** (2006) The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* **442**: 939-942
- De Leon JLD, Daie J, Wyse R** (1988) Tonoplast Stability and Survival of Isolated Vacuoles in Different Buffers. *Plant Physiol* **88**
- De N** (2001) Plant cell vacuoles, an introduction. CSIRO publishing, Collingwood
- de Vries SC** (2007) 14-3-3 proteins in plant brassinosteroid signaling. *Dev Cell* **13**: 162-164
- Deckert J** (2005) Cadmium toxicity in plants: is there any analogy to its carcinogenic effect in mammalian cells? *Biometals* **18**: 475-481
- DeWald DB, Torabinejad J, Jones CA, Shope JC, Cangelosi AR, Thompson JE, Prestwich GD, Hama H** (2001) Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed arabidopsis. *Plant Physiol* **126**: 759-769
- Dietz KJ, Jager R, Kaiser G, Martinoia E** (1990) Amino Acid Transport across the Tonoplast of Vacuoles Isolated from Barley Mesophyll Protoplasts : Uptake of Alanine, Leucine, and Glutamine. *Plant Physiol* **92**: 123-129
- Dougherty MK, Morrison DK** (2004) Unlocking the code of 14-3-3. *J Cell Sci* **117**: 1875-1884
- Du L, Poovaiah BW** (2005) Ca²⁺/calmodulin is critical for brassinosteroid biosynthesis and plant growth. *Nature* **437**: 741-745
- Ducruix C, Junot C, Fievet JB, Villiers F, Ezan E, Bourguignon J** (2006) New insights into the regulation of phytochelatin biosynthesis in *A. thaliana* cells from metabolite profiling analyses. *Biochimie* **88**: 1733-1742
- Dunkley TP, Hester S, Shadforth IP, Runions J, Weimar T, Hanton SL, Griffin JL, Bessant C, Brandizzi F, Hawes C, Watson RB, Dupree P, Lilley KS** (2006) Mapping the Arabidopsis organelle proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 6518-6523
- Dunn BM** (2002) Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chem Rev* **102**: 4431-4458
- Dutilleul C, Jourdain A, Bourguignon J, Hugouvieux V** (2008) The Arabidopsis putative selenium-binding protein family: expression study and characterization of SBP1 as a potential new player in cadmium detoxification processes. *Plant Physiol* **147**: 239-251

E

- Emmerlich V, Linka N, Reinhold T, Hurth MA, Traub M, Martinoia E, Neuhaus HE** (2003) The plant homolog to the human sodium/dicarboxylic cotransporter is the vacuolar malate carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 11122-11126
- Endler A, Meyer S, Schelbert S, Schneider T, Weschke W, Peters SW, Keller F, Baginsky S, Martinoia E, Schmidt UG** (2006) Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and Arabidopsis mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiol* **141**: 196-207
- Ezaki B, Sasaki K, Matsumoto H, Nakashima S** (2005) Functions of two genes in aluminium (Al) stress resistance: repression of oxidative damage by the AtBCB gene and promotion of efflux of Al ions by the NtGDI1 gene. *J Exp Bot* **56**: 2661-2671

F

- Felle H** (1988) Cytoplasmic free calcium in *Riccia fluitans* L. and *Zea mays* L.: Interaction of Ca²⁺ and pH? *Planta* **176**: 248-255
- Felle H** (1989) Ca-Selective Microelectrodes and Their Application to Plant Cells and Tissues. *Plant Physiol* **91**: 1239-1242
- Ferro M, Salvi D, Brugiére S, Miras S, Kowalski S, Louwagie M, Garin J, Joyard J, Rolland N** (2003) Proteomics of the chloroplast envelope membranes from Arabidopsis thaliana. *Mol Cell Proteomics* **2**: 325-345
-

- Ferro M, Salvi D, Riviere-Rolland H, Vermat T, Seigneurin-Berny D, Grunwald D, Garin J, Joyard J, Rolland N** (2002) Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: identification and subcellular localization of new transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 11487-11492
- Frangne N, Eggmann T, Koblishcke C, Weissenbock G, Martinoia E, Klein M** (2002) Flavone glucoside uptake into barley mesophyll and Arabidopsis cell culture vacuoles. Energization occurs by H(+)-antiport and ATP-binding cassette-type mechanisms. *Plant Physiol* **128**: 726-733
- Fraser CM, Rider LW, Chapple C** (2005) An expression and bioinformatics analysis of the Arabidopsis serine carboxypeptidase-like gene family. *Plant Physiol* **138**: 1136-1148
- Fukuda A, Yazaki Y, Ishikawa T, Koike S, Tanaka Y** (1998) Na⁺/H⁺ Antiporter in Tonoplast Vesicles from Rice Roots. *Plant Cell Physiol* **39**: 196-201
- Furuichi T, Cunningham KW, Muto S** (2001) A putative two pore channel AtTPC1 mediates Ca²⁺ flux in Arabidopsis leaf cells. *Plant Cell Physiol* **42**: 900-905

G

- Gampala SS, Kim TW, He JX, Tang W, Deng Z, Bai MY, Guan S, Lalonde S, Sun Y, Gendron JM, Chen H, Shibagaki N, Ferl RJ, Ehrhardt D, Chong K, Burlingame AL, Wang ZY** (2007) An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in Arabidopsis. *Dev Cell* **13**: 177-189
- Garbarino J, Dupont FM** (1989) Rapid Induction of Na/H Exchange Activity in Barley Root Tonoplast. *Plant Physiol* **89**: 1-4
- Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D, Pugin A** (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 711-724
- Gerbeau P, Guclu J, Ripoche P, Maurel C** (1999) Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *Plant J* **18**: 577-587
- Goerlach J, Willms-Hoff I** (1992) Glycine Uptake into Barley Mesophyll Vacuoles Is Regulated but Not Energized by ATP. *Plant Physiol* **99**: 134-139
- Golldack D, Vera P, Dietz KJ** (2003) Expression of subtilisin-like serine proteases in Arabidopsis thaliana is cell-specific and responds to jasmonic acid and heavy metals with developmental differences. *Physiol Plant* **118**: 64-73
- Gong JM, Lee DA, Schroeder JI** (2003) Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatin and cadmium in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10118-10123
- Grabov A, Blatt MR** (1999) A steep dependence of inward-rectifying potassium channels on cytosolic free calcium concentration increase evoked by hyperpolarization in guard cells. *Plant Physiol* **119**: 277-288
- Granstedt RC, Huffaker RC** (1982) Identification of the Leaf Vacuole as a Major Nitrate Storage Pool. *Plant Physiol* **70**: 410-413
- Grant CA, Clarke JM, Duguid S, Chaney RL** (2008) Selection and breeding of plant cultivars to minimize cadmium accumulation. *Sci Total Environ* **390**: 301-310
- Grill E, Löffler S, Winnacker EL, Zenk MH** (1989) Phytochelatin, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 6838-6842
- Grotz N, Fox T, Connolly E, Park W, Guerinot ML, Eide D** (1998) Identification of a family of zinc transporter genes from Arabidopsis that respond to zinc deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7220-7224
- Grzam A, Martin MN, Hell R, Meyer AJ** (2007) gamma-Glutamyl transpeptidase GGT4 initiates vacuolar degradation of glutathione S-conjugates in Arabidopsis. *FEBS Lett* **581**: 3131-3138
- Gu YQ, Pautot V, Holzer FM, Walling LL** (1996) A Complex Array of Proteins Related to the Multimeric Leucine Aminopeptidase of Tomato. *Plant Physiol* **110**: 1257-1266
- Gueguen V, Macherel D, Jaquinod M, Douce R, Bourguignon J** (2000) Fatty acid and lipoic acid biosynthesis in higher plant mitochondria. *J Biol Chem* **275**: 5016-5025

H

- Ha SB, Smith AP, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O'Connell MJ, Goldsbrough PB, Cobbett CS** (1999) Phytochelatin synthase genes from Arabidopsis and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* **11**: 1153-1164
- Hajibagheri MA, Flowers TJ** (1989) X-ray microanalysis of ion distribution within root cortical cells of the halophyte *Suaeda maritima* (L.) Dum. *Planta* **177**: 131-134
- Haring V, Gray JE, McClure BA, Anderson MA, Clarke AE** (1990) Self-incompatibility: a self-recognition system in plants. *Science* **250**: 937-941
- Harris NS, Taylor GJ** (2004) Cadmium uptake and translocation in seedlings of near isogenic lines of durum wheat that differ in grain cadmium accumulation. *BMC Plant Biol* **4**: 4
- Hasan SA, Hayat S, Ali B, Ahmad A** (2007) 28-Homobrassinolide protects chickpea (*Cicer arietinum*) from cadmium toxicity by stimulating antioxidants. *Environ Pollut*
- Hatsugai N, Kuroyanagi M, Yamada K, Meshi T, Tsuda S, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* **305**: 855-858
- Hawker JS, Smith GM, Phillips H, Wiskich JT** (1987) Sucrose Phosphatase Associated with Vacuole Preparations from Red Beet, Sugar Beet, and Immature Sugarcane Stem. *Plant Physiol* **84**: 1281-1285
- Hayashi Y, Yamada K, Shimada T, Matsushima R, Nishizawa NK, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2001) A proteinase-storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **42**: 894-899
- He Z, Wang ZY, Li J, Zhu Q, Lamb C, Ronald P, Chory J** (2000) Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1. *Science* **288**: 2360-2363
- Heazlewood JL, Howell KA, Whelan J, Millar AH** (2003) Towards an analysis of the rice mitochondrial proteome. *Plant Physiol* **132**: 230-242
- Heineke D, Wildenberger K, Sonnewald U, Willmitzer L, Heldt HW** (1994) Accumulation of hexoses in leaf vacuoles: Studies with transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in the cytosol, vacuole or apoplast. *Planta* **194**
- Heinemeyer J, Eubel H, Wehmhoner D, Jansch L, Braun HP** (2004) Proteomic approach to characterize the supramolecular organization of photosystems in higher plants. *Phytochemistry* **65**: 1683-1692
- Henrissat B** (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* **280** (Pt 2): 309-316
- Herbette S, Taconnat L, Hugouvieux V, Piette L, Magniette ML, Cuine S, Auroy P, Richaud P, Forestier C, Bourguignon J, Renou JP, Vavasseur A, Leonhardt N** (2006) Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of Arabidopsis roots and shoots. *Biochimie* **88**: 1751-1765
- Herman E, Schmidt M** (2004) Endoplasmic reticulum to vacuole trafficking of endoplasmic reticulum bodies provides an alternate pathway for protein transfer to the vacuole. *Plant Physiol* **136**: 3440-3446
- Hill J, Phylip LH** (1997) Bacterial aspartic proteinases. *FEBS Lett* **409**: 357-360
- Hirai MY, Yano M, Goodenowe DB, Kanaya S, Kimura T, Awazuhara M, Arita M, Fujiwara T, Saito K** (2004) Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10205-10210
- Hirschi KD, Zhen RG, Cunningham KW, Rea PA, Fink GR** (1996) CAX1, an H⁺/Ca²⁺ antiporter from Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 8782-8786
- Homeyer U, Schultz G** (1988) Transport of phenylalanine into vacuoles isolated from barley mesophyll protoplasts. *Planta* **176**
- Hopp W, Seitz HU** (1987) The uptake of acylated anthocyanin into isolated vacuoles from a cell suspension culture of *Daucus carota*. *Planta* **170**: 74-85
- Howden R, Goldsbrough PB, Andersen CR, Cobbett CS** (1995) Cadmium-sensitive, cad1 mutants of Arabidopsis thaliana are phytochelatin deficient. *Plant Physiol* **107**: 1059-1066

Hunter PR, Craddock CP, Di Benedetto S, Roberts LM, Frigerio L (2007) Fluorescent reporter proteins for the tonoplast and the vacuolar lumen identify a single vacuolar compartment in Arabidopsis cells. *Plant Physiol* **145**: 1371-1382

Hutchins MU, Klionsky DJ (2001) Vacuolar localization of oligomeric alpha-mannosidase requires the cytoplasm to vacuole targeting and autophagy pathway components in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**: 20491-20498

Hüve K, Dittrich A, Kindermann G, Slovik S, Heber U (1995) Detoxification of SO₂ in conifers differing in SO₂-tolerance. *Planta* **195**

I

Igarashi D, Miwa T, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K, Ohsumi C (2003) Identification of photorespiratory glutamate:glyoxylate aminotransferase (GGAT) gene in Arabidopsis. *Plant J* **33**: 975-987

Imamura H, Nakano M, Noji H, Muneyuki E, Ohkuma S, Yoshida M, Yokoyama K (2003) Evidence for rotation of V1-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 2312-2315

Ishikawa T (1992) The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem Sci* **17**: 463-468

J

Jansch L, Krufft V, Schmitz UK, Braun HP (1996) New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria. *Plant J* **9**: 357-368

Jaquinod M, Villiers F, Kieffer-Jaquinod S, Hugouvieux V, Bruley C, Garin J, Bourguignon J (2007a) A proteomics dissection of Arabidopsis thaliana vacuoles isolated from cell culture. *Mol Cell Proteomics* **6**: 394-412

Jaquinod M, Villiers F, Kieffer-Jaquinod S, Hugouvieux V, Bruley C, Garin J, Bourguignon J (2007b) A proteomics approach highlights a myriad of transporters in the Arabidopsis thaliana vacuolar membrane. *Plant Signaling & Behavior* **2**: 296 - 298

Jauh GY, Phillips TE, Rogers JC (1999) Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuolar functions. *Plant Cell* **11**: 1867-1882

Johannes E, Brosnan JM, Sanders D (1992) Parallel pathways for intracellular Ca²⁺ release from the vacuole of higher plants. *The Plant Journal* **2**: 97-102

Johanson U, Karlsson M, Johansson I, Gustavsson S, Sjoval S, Fraysse L, Weig AR, Kjellbom P (2001) The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in Arabidopsis provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol* **126**: 1358-1369

Juge N (2006) Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes. *Trends Plant Sci* **11**: 359-367

K

Kagale S, Divi UK, Krochko JE, Keller WA, Krishna P (2007) Brassinosteroid confers tolerance in Arabidopsis thaliana and Brassica napus to a range of abiotic stresses. *Planta* **225**: 353-364

Kaiser G, Martinoia E, Wiemken A (1989) Active transport of sulfate into the vacuole of plant cells provide halotolerance and can detoxify SO₂. *J Plant Physiol* **133**

Kasprzewska A (2003) Plant chitinases--regulation and function. *Cell Mol Biol Lett* **8**: 809-824

Kataoka T, Watanabe-Takahashi A, Hayashi N, Ohnishi M, Mimura T, Buchner P, Hawkesford MJ, Yamaya T, Takahashi H (2004) Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 2693-2704

Kawachi M, Kobae Y, Mimura T, Maeshima M (2008) Deletion of a histidine-rich loop of AtMTP1, a vacuolar Zn(2+)/H(+) antiporter of Arabidopsis thaliana, stimulates the transport activity. *J Biol Chem* **283**: 8374-8383

Kawasaki-Nishi S, Nishi T, Forgac M (2003) Proton translocation driven by ATP hydrolysis in V-ATPases. *FEBS Lett* **545**: 76-85

Keller F, Frehner M, Wiemken A (1988) Sucrose Synthase, a Cytosolic Enzyme in Protoplasts of Jerusalem Artichoke Tubers (*Helianthus tuberosus* L.). *Plant Physiol* **88**: 239-241

- Kim DY, Bovet L, Maeshima M, Martinoia E, Lee Y** (2007) The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. *Plant J* **50**: 207-218
- Kiyosue T, Beetham JK, Pinot F, Hammock BD, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (1994) Characterization of an Arabidopsis cDNA for a soluble epoxide hydrolase gene that is inducible by auxin and water stress. *Plant J* **6**: 259-269
- Klahre U, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Yokota T, Nomura T, Yoshida S, Chua NH** (1998) The Arabidopsis DIMINUTO/DWARF1 gene encodes a protein involved in steroid synthesis. *Plant Cell* **10**: 1677-1690
- Klapheck S, Flegner W, Zimmer I** (1994) Hydroxymethyl-phytochelatins [(gamma-glutamylcysteine)n-serine] are metal-induced peptides of the Poaceae. *Plant Physiol* **104**: 1325-1332
- Klein M, Geisler M, Suh SJ, Kolukisaoglu HU, Azevedo L, Plaza S, Curtis MD, Richter A, Weder B, Schulz B, Martinoia E** (2004) Disruption of AtMRP4, a guard cell plasma membrane ABCC-type ABC transporter, leads to deregulation of stomatal opening and increased drought susceptibility. *Plant J* **39**: 219-236
- Kloetzel PM** (2004) Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat Immunol* **5**: 661-669
- Kobae Y, Sekino T, Yoshioka H, Nakagawa T, Martinoia E, Maeshima M** (2006) Loss of AtPDR8, a plasma membrane ABC transporter of Arabidopsis thaliana, causes hypersensitive cell death upon pathogen infection. *Plant Cell Physiol* **47**: 309-318
- Koizumi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Tsuji H, Shinozaki K** (1993) Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in Arabidopsis thaliana. *Gene* **129**: 175-182
- Kordic S, Cummins I, Edwards R** (2002) Cloning and characterization of an S-formylglutathione hydrolase from Arabidopsis thaliana. *Arch Biochem Biophys* **399**: 232-238
- Koren'kov V, Park S, Cheng NH, Sreevidya C, Lachmansingh J, Morris J, Hirschi K, Wagner GJ** (2007) Enhanced Cd²⁺-selective root-tonoplast-transport in tobaccos expressing Arabidopsis cation exchangers. *Planta* **225**: 403-411
- Korenkov V, Hirschi K, Crutchfield JD, Wagner GJ** (2007) Enhancing tonoplast Cd/H antiport activity increases Cd, Zn, and Mn tolerance, and impacts root/shoot Cd partitioning in Nicotiana tabacum L. *Planta* **226**: 1379-1387
- Korshunova YO, Eide D, Clark WG, Guerinot ML, Pakrasi HB** (1999) The IRT1 protein from Arabidopsis thaliana is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol Biol* **40**: 37-44
- Kovermann P, Meyer S, Hortensteiner S, Picco C, Scholz-Starke J, Ravera S, Lee Y, Martinoia E** (2007) The Arabidopsis vacuolar malate channel is a member of the ALMT family. *Plant J* **52**: 1169-1180
- Krämer U, Cotter-Howells JD, Charnock JM, Baker AJM, Smith JAC** (1996) Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *nature* **379**: 635-638
- Krishna P** (2003) Brassinosteroid-Mediated Stress Responses. *J Plant Growth Regul* **22**: 289-297
- Krotz RM, Evangelou BP, Wagner GJ** (1989) Relationships between Cadmium, Zinc, Cd-Peptide, and Organic Acid in Tobacco Suspension Cells. *Plant Physiol* **91**: 780-787
- Kulaev I, Vagabov V, Kulakovskaya T** (1999) New aspects of inorganic polyphosphate metabolism and function. *J Biosci Bioeng* **88**: 111-129
- Kupper H, Lombi E, Zhao FJ, McGrath SP** (2000) Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator Arabidopsis halleri. *Planta* **212**: 75-84
- Kuroyanagi M, Yamada K, Hatsugai N, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2005) Vacuolar processing enzyme is essential for mycotoxin-induced cell death in Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* **280**: 32914-32920

L

- Lane TW, Saito MA, George GN, Pickering IJ, Prince RC, Morel FM** (2005) Biochemistry: a cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature* **435**: 42
- Lanquar V, Lelievre F, Bolte S, Hames C, Alcon C, Neumann D, Vansuyt G, Curie C, Schroder A, Kramer U, Barbier-Brygoo H, Thomine S** (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *Embo J* **24**: 4041-4051

- Larsen PB, Cancel J, Rounds M, Ochoa V** (2007) Arabidopsis ALS1 encodes a root tip and stele localized half type ABC transporter required for root growth in an aluminum toxic environment. *Planta* **225**: 1447-1458
- Latz A, Becker D, Hekman M, Muller T, Beyhl D, Marten I, Eing C, Fischer A, Dunkel M, Bertl A, Rapp UR, Hedrich R** (2007) TPK1, a Ca(2+)-regulated Arabidopsis vacuole two-pore K(+) channel is activated by 14-3-3 proteins. *Plant J* **52**: 449-459
- Lazzaroni JC, Dubuisson JF, Vianney A** (2002) The Tol proteins of Escherichia coli and their involvement in the translocation of group A colicins. *Biochimie* **84**: 391-397
- Lee EJ, Iai H, Sano H, Koizumi N** (2005) Sugar responsible and tissue specific expression of a gene encoding AtCIPK14, an Arabidopsis CBL-interacting protein kinase. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**: 242-245
- Lee EK, Kwon M, Ko JH, Yi H, Hwang MG, Chang S, Cho MH** (2004) Binding of sulfonylurea by AtMRP5, an Arabidopsis multidrug resistance-related protein that functions in salt tolerance. *Plant Physiol* **134**: 528-538
- Lee S, Kang BS** (2005) Expression of Arabidopsis phytochelatin synthase 2 is too low to complement an AtPCS1-defective Cad1-3 mutant. *Mol Cells* **19**: 81-87
- Lehfeldt C, Shirley AM, Meyer K, Ruegger MO, Cusumano JC, Viitanen PV, Strack D, Chapple C** (2000) Cloning of the SNG1 gene of Arabidopsis reveals a role for a serine carboxypeptidase-like protein as an acyltransferase in secondary metabolism. *Plant Cell* **12**: 1295-1306
- Li ZS, Lu YP, Zhen RG, Szczypka M, Thiele DJ, Rea PA** (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in Saccharomyces cerevisiae: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 42-47
- Lombi E, Zhao FJ, McGrath SP, Young SD, Sacchi GA** (2001) Physiological evidence for a high-affinity cadmium transporter highly expressed in a Thlaspi caerulescens ecotype. *New Phytol* **149**: 53-60
- Lu YP, Li ZS, Drozdowicz YM, Hortensteiner S, Martinoia E, Rea PA** (1998) AtMRP2, an Arabidopsis ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with Atmrp1. *Plant Cell* **10**: 267-282
- Lu YP, Li ZS, Rea PA** (1997) AtMRP1 gene of Arabidopsis encodes a glutathione S-conjugate pump: isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 8243-8248

M

- Macherel D, Bourguignon J, Forest E, Faure M, Cohen-Addad C, Douce R** (1996) Expression, lipoylation and structure determination of recombinant pea H-protein in Escherichia coli. *Eur J Biochem* **236**: 27-33
- Maeshima M** (2001) TONOPLAST TRANSPORTERS: Organization and Function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 469-497
- Mano J, Belles-Boix E, Babiychuk E, Inze D, Torii Y, Hiraoka E, Takimoto K, Slooten L, Asada K, Kushnir S** (2005) Protection against photooxidative injury of tobacco leaves by 2-alkenal reductase. Detoxication of lipid peroxide-derived reactive carbonyls. *Plant Physiol* **139**: 1773-1783
- Maretzki A, Thom M** (1986) A Group Translocator for Sucrose Assimilation in Tonoplast Vesicles of Sugarcane Cells. *Plant Physiol* **80**: 34-37
- Mari S, Gendre D, Pianelli K, Ouerdane L, Lobinski R, Briat JF, Lebrun M, Czernic P** (2006) Root-to-shoot long-distance circulation of nicotianamine and nicotianamine-nickel chelates in the metal hyperaccumulator Thlaspi caerulescens. *J Exp Bot* **57**: 4111-4122
- Marrs KA, Alfenito MR, Lloyd AM, Walbot V** (1995) A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2. *Nature* **375**: 397-400
- Martinec J, Feltl T, Scanlon CH, Lumsden PJ, Machackova I** (2000) Subcellular localization of a high affinity binding site for D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate from Chenopodium rubrum. *Plant Physiol* **124**: 475-483
- Martinoia E, Heck U, Wiemken A** (1981) Vacuoles as storage compartments for nitrate in barley leaves. *Nature* **272**
- Martinoia E, Thume M, Vogt E, Rentsch D, Dietz KJ** (1991) Transport of Arginine and Aspartic Acid into Isolated Barley Mesophyll Vacuoles. *Plant Physiol* **97**: 644-650
- Mathys W** (1977) The Role of Malate, Oxalate, and Mustard Oil Glucosides in the Evolution of Zinc-Resistance in Herbage Plants. *Physiol. plant.* **40**: 130-136

- Matsui M, Fowler JH, Walling LL** (2006) Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *Biol Chem* **387**: 1535-1544
- Matsui M, Stoop CD, von Arnim AG, Wei N, Deng XW** (1995) Arabidopsis COP1 protein specifically interacts in vitro with a cytoskeleton-associated protein, CIP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 4239-4243
- Maurel C, Verdoucq L, Luu DT, Santoni V** (2008) Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 595-624
- Mayne RG, Kende H** (1986) Ethylene biosynthesis in isolated vacuoles of *Vicia faba* L. - requirement for membrane integrity. *Planta* **167**: 159-165
- Meijer AH, Lopes Cardoso MI, Voskuilen JT, de Waal A, Verpoorte R, Hoge JH** (1993) Isolation and characterization of a cDNA clone from *Catharanthus roseus* encoding NADPH:cytochrome P-450 reductase, an enzyme essential for reactions catalysed by cytochrome P-450 mono-oxygenases in plants. *Plant J* **4**: 47-60
- Meuwly P, Thibault P, Schwan AL, Rauser WE** (1995) Three families of thiol peptides are induced by cadmium in maize. *Plant J* **7**: 391-400
- Minic Z** (2008) Physiological roles of plant glycoside hydrolases. *Planta* **227**: 723-740
- Minic Z, Jouanin L** (2006) Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. *Plant Physiol Biochem* **44**: 435-449
- Moreau P, Bessoule JJ, Mongrand S, Testet E, Vincent P, Cassagne C** (1998) Lipid trafficking in plant cells. *Prog Lipid Res* **37**: 371-391
- Mori M, Yoshida K, Ishigaki Y, Matsunaga T, Nikaido O, Kameda K, Kondo T** (2005) UV-B protective effect of a polyacylated anthocyanin, HBA, in flower petals of the blue morning glory, *Ipomoea tricolor* cv. Heavenly Blue. *Bioorg Med Chem* **13**: 2015-2020
- Morishita R, Kawagoshi A, Sawasaki T, Madin K, Ogasawara T, Oka T, Endo Y** (1999) Ribonuclease activity of rat liver perchloric acid-soluble protein, a potent inhibitor of protein synthesis. *J Biol Chem* **274**: 20688-20692
- Moriyasu Y, Tazawa M** (1988) Degradation of Proteins Artificially Introduced into Vacuoles of *Chara australis*. *Plant Physiol* **88**: 1092-1096
- Morsomme P, Dambly S, Maudoux O, Boutry M** (1998) Single point mutations distributed in 10 soluble and membrane regions of the *Nicotiana plumbaginifolia* plasma membrane PMA2 H⁺-ATPase activate the enzyme and modify the structure of the C-terminal region. *J Biol Chem* **273**: 34837-34842
- Muller M, Irkens-Kiesecker U, Rubinstein B, Taiz L** (1996) On the mechanism of hyperacidification in lemon. Comparison of the vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase activities of fruits and epicotyls. *J Biol Chem* **271**: 1916-1924
- Munford RS, Sheppard PO, O'Hara PJ** (1995) Saposin-like proteins (SAPLIP) carry out diverse functions on a common backbone structure. *J Lipid Res* **36**: 1653-1663

N

- Nagata N, Min YK, Nakano T, Asami T, Yoshida S** (2000) Treatment of dark-grown *Arabidopsis thaliana* with a brassinosteroid-biosynthesis inhibitor, brassinazole, induces some characteristics of light-grown plants. *Planta* **211**: 781-790
- Napier RM, Fowke LC, Hawes C, Lewis M, Pelham HR** (1992) Immunological evidence that plants use both HDEL and KDEL for targeting proteins to the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* **102 (Pt 2)**: 261-271
- Navazio L, Mariani P, Sanders D** (2001) Mobilization of Ca²⁺ by cyclic ADP-ribose from the endoplasmic reticulum of cauliflower florets. *Plant Physiol* **125**: 2129-2138
- Neff D, Dencher NA** (1999) Purification of multisubunit membrane protein complexes: isolation of chloroplast FoF1-ATP synthase, CFo and CF1 by blue native electrophoresis. *Biochem Biophys Res Commun* **259**: 569-575
- Nemhauser JL, Chory J** (2004) BRing it on: new insights into the mechanism of brassinosteroid action. *J Exp Bot* **55**: 265-270
- Neuhaus HE** (2007) Transport of primary metabolites across the plant vacuolar membrane. *FEBS Lett* **581**: 2223-2226
- Noda T, Matsuura A, Wada Y, Ohsumi Y** (1995) Novel system for monitoring autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **210**: 126-132
- Nozue M, Yamada K, Nakamura T, Kubo H, Kondo M, Nishimura M** (1997) Expression of a vacuolar protein (VP24) in anthocyanin-producing cells of sweet potato in suspension culture. *Plant Physiol* **115**: 1065-1072

O

- Olbrich A, Hillmer S, Hinz G, Oliviusson P, Robinson DG** (2007) Newly formed vacuoles in root meristems of barley and pea seedlings have characteristics of both protein storage and lytic vacuoles. *Plant Physiol* **145**: 1383-1394
- Orsomando G, de la Garza RD, Green BJ, Peng M, Rea PA, Ryan TJ, Gregory JF, 3rd, Hanson AD** (2005) Plant gamma-glutamyl hydrolases and folate polyglutamates: characterization, compartmentation, and co-occurrence in vacuoles. *J Biol Chem* **280**: 28877-28884
- Ortiz DF, Kreppel L, Speiser DM, Scheel G, McDonald G, Ow DW** (1992) Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *Embo J* **11**: 3491-3499
- Ory S, Zhou M, Conrads TP, Veenstra TD, Morrison DK** (2003) Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites. *Curr Biol* **13**: 1356-1364
- Oven M, Page JE, Zenk MH, Kutchan TM** (2002) Molecular characterization of the homo-phytochelatin synthase of soybean *Glycine max*: relation to phytochelatin synthase. *J Biol Chem* **277**: 4747-4754

P

- Pace HC, Brenner C** (2001) The nitrilase superfamily: classification, structure and function. *Genome Biol* **2**: REVIEWS0001
- Passarinho PA, Van Hengel AJ, Fransz PF, de Vries SC** (2001) Expression pattern of the *Arabidopsis thaliana* AtEP3/AtchitIV endochitinase gene. *Planta* **212**: 556-567
- Pei ZM, Ward JM, Schroeder JI** (1999) Magnesium Sensitizes Slow Vacuolar Channels to Physiological Cytosolic Calcium and Inhibits Fast Vacuolar Channels in Fava Bean Guard Cell Vacuoles. *Plant Physiol* **121**: 977-986
- Peiter E, Maathuis FJ, 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
- Peltier JB, Emanuelsson O, Kalume DE, Ytterberg J, Friso G, Rudella A, Liberles DA, Soderberg L, Roepstorff P, von Heijne G, van Wijk KJ** (2002) Central functions of the luminal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis* determined by experimentation and genome-wide prediction. *Plant Cell* **14**: 211-236
- Pich A, Scholz G, Stephan UW** (1994) Iron-dependent changes of heavy metals, nicotianamine, and citrate in different plant organs and in the xylem exudate of two tomato genotypes. Nicotianamine as possible copper translocator. *Plant Soil* **165**: 189-196
- Plant PJ, Gelli A, Blumwald E** (1994) Vacuolar chloride regulation of an anion-selective tonoplast channel. *J Membr Biol* **140**: 1-12
- Poschenrieder C, Gunse B, Barcelo J** (1989) Influence of Cadmium on Water Relations, Stomatal Resistance, and Abscisic Acid Content in Expanding Bean Leaves. *Plant Physiol* **90**: 1365-1371
- Potocka A, Zimowski J** (2008) Metabolism of conjugated sterols in eggplant. Part 2. Phospholipid : steryl glucoside acyltransferase. *Acta Biochim Pol* **55**: 135-140
- Pottosin, II, Schonknecht G** (2007) Vacuolar calcium channels. *J Exp Bot* **58**: 1559-1569
- Preisser J, Sprügel H, Komor E** (1992) Solute distribution between vacuole and cytosol of sugarcane suspension cells: Sucrose is not accumulated in the vacuole. *Planta* **186**
- Pueyo JJ, Chrispeels MJ, Herman EM** (1995) Degradation of transport-competent destabilized phaseolin with a signal for retention in the endoplasmic reticulum occurs in the vacuole. *Planta* **196**: 586-596

R

- Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV** (1999) Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* **284**: 805-808
- Ramalho-Santos M, Pissarra J, Verissimo P, Pereira S, Salema R, Pires E, Faro CJ** (1997) Cardosin A, an abundant aspartic proteinase, accumulates in protein storage vacuoles in the stigmatic papillae of *Cynara cardunculus* L. *Planta* **203**: 204-212

- Rausser WE** (1995) Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiol* **109**: 1141-1149
- Rautengarten C, Steinhäuser D, Bussis D, Stintzi A, Schaller A, Kopka J, Altmann T** (2005) Inferring hypotheses on functional relationships of genes: Analysis of the Arabidopsis thaliana subtilase gene family. *PLoS Comput Biol* **1**: e40
- Ravanel S, Block MA, Rippert P, Jabrin S, Curien G, Rebeille F, Douce R** (2004) Methionine metabolism in plants: chloroplasts are autonomous for de novo methionine synthesis and can import S-adenosylmethionine from the cytosol. *J Biol Chem* **279**: 22548-22557
- Rawlings ND, Barrett AJ** (1995) Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism. *Methods Enzymol* **248**: 105-120
- Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J, Barrett AJ** (2008) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **36**: D320-325
- Rea PA, Kim Y, Sarafian V, Poole RJ, Davies JM, Sanders D** (1992) Vacuolar H(+)-translocating pyrophosphatases: a new category of ion translocase. *Trends Biochem Sci* **17**: 348-353
- Reese RN, White CA, Winge DR** (1992) Cadmium-Sulfide Crystallites in Cd-(gammaEC)(n)G Peptide Complexes from Tomato. *Plant Physiol* **98**: 225-229
- Reisen D, Marty F, Leborgne-Castel N** (2005) New insights into the tonoplast architecture of plant vacuoles and vacuolar dynamics during osmotic stress. *BMC Plant Biol* **5**: 13
- Renneberg H** (1984) The Fate of Excess Sulfur in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**
- Roberts MR** (2003) 14-3-3 proteins find new partners in plant cell signalling. *Trends Plant Sci* **8**: 218-223
- Rockel B, Peters J, Müller SA, Seyit G, Ringler P, Hegerl R, Glaeser RM, Baumeister W** (2005) Molecular architecture and assembly mechanism of Drosophila tripeptidyl peptidase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 10135-10140
- Rogers JC** (2008) Multiple vacuoles in plant cells. *Plant Physiol* **146**: 1024-1025; author reply 1026-1027
- Ryan CA** (1980) Wound-regulated synthesis and vacuolar compartmentation of proteinase inhibitors in plant leaves. *Curr Top Cell Regul* **17**: 1-23

S

- Sadowski PG, Dunkley TP, Shadforth IP, Dupree P, Bessant C, Griffin JL, Lilley KS** (2006) Quantitative proteomic approach to study subcellular localization of membrane proteins. *Nat Protoc* **1**: 1778-1789
- Saftner RA, Daie J, Wyse RE** (1983) Sucrose Uptake and Compartmentation in Sugar Beet Taproot Tissue. *Plant Physiol* **72**: 1-6
- Salt DE, Wagner GJ** (1993) Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a Cd²⁺/H⁺ antiport activity. *J Biol Chem* **268**: 12297-12302
- Sanchez-Fernandez R, Davies TG, Coleman JO, Rea PA** (2001) The Arabidopsis thaliana ABC protein superfamily, a complete inventory. *J Biol Chem* **276**: 30231-30244
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF** (2002) Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* **14 Suppl**: S401-417
- Sanita di Toppi L, Gabrielli R** (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environmental and experimental botany* **41**: 105-130
- Sarafian V, Kim Y, Poole RJ, Rea PA** (1992) Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump of Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 1775-1779
- Sarret G, Harada E, Choi YE, Isaure MP, Geoffroy N, Fakra S, Marcus MA, Birschwilks M, Clemens S, Manceau A** (2006) Trichomes of tobacco excrete zinc as zinc-substituted calcium carbonate and other zinc-containing compounds. *Plant Physiol* **141**: 1021-1034
- Sarry JE, Chen S, Collum RP, Liang S, Peng M, Lang A, Naumann B, Dzierzinski F, Yuan CX, Hippler M, Rea PA** (2007) Analysis of the vacuolar luminal proteome of Saccharomyces cerevisiae. *Febs J* **274**: 4287-4305
- Sarry JE, Kuhn L, Ducruix C, Lafaye A, Junot C, Hugouvieux V, Jourdain A, Bastien O, Fievet JB, Vailhen D, Amekraz B, Moulin C, Ezan E, Garin J, Bourguignon J** (2006) The early responses of Arabidopsis thaliana cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics* **6**: 2180-2198

- Sazuka T, Keta S, Shiratake K, Yamaki S, Shibata D** (2004) A proteomic approach to identification of transmembrane proteins and membrane-anchored proteins of *Arabidopsis thaliana* by peptide sequencing. *DNA Res* **11**: 101-113
- Schaaf G, Ludewig U, Erenoglu BE, Mori S, Kitahara T, von Wiren N** (2004) ZmYS1 functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore- and nicotianamine-chelated metals. *J Biol Chem* **279**: 9091-9096
- Schagger H, Pfeiffer K** (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J* **19**: 1777-1783
- Schagger H, von Jagow G** (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* **199**: 223-231
- Schaller A, Ryan CA** (1994) Identification of a 50-kDa systemin-binding protein in tomato plasma membranes having Kex2p-like properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 11802-11806
- Schmidt UG, Endler A, Schelbert S, Brunner A, Schnell M, Neuhaus HE, Marty-Mazars D, Marty F, Baginsky S, Martinoia E** (2007) Novel tonoplast transporters identified using a proteomic approach with vacuoles isolated from cauliflower buds. *Plant Physiol* **145**: 216-229
- Schneider S, Beyhl D, Hedrich R, Sauer N** (2008) Functional and Physiological Characterization of *Arabidopsis* INOSITOL TRANSPORTER1, a Novel Tonoplast-Localized Transporter for myo-Inositol. *Plant Cell*
- Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D** (2001) Guard Cell Signal Transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 627-658
- Seay MD, Dinesh-Kumar SP** (2005) Life after death: are autophagy genes involved in cell death and survival during plant innate immune responses? *Autophagy* **1**: 185-186
- Seifert GJ, Roberts K** (2007) The biology of arabinogalactan proteins. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 137-161
- Senden MHMN, van der Meer AJGM, Verburg TG, Wolterbeek HT** (1995) Citric acid in tomato plant roots and its effect on cadmium uptake and distribution. *Plant Soil* **171**: 333-339
- Shah J** (2005) Lipids, lipases, and lipid-modifying enzymes in plant disease resistance. *Annu Rev Phytopathol* **43**: 229-260
- Sheen J, Zhou L, Jang JC** (1999) Sugars as signaling molecules. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 410-418
- Shigaki T, Hirschi KD** (2006) Diverse functions and molecular properties emerging for CAX cation/H⁺ exchangers in plants. *Plant Biol (Stuttg)* **8**: 419-429
- Shimaoka T, Ohnishi M, Sazuka T, Mitsuhashi N, Hara-Nishimura I, Shimazaki K, Maeshima M, Yokota A, Tomizawa K, Mimura T** (2004) Isolation of intact vacuoles and proteomic analysis of tonoplast from suspension-cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **45**: 672-683
- Simoes I, Faro C** (2004) Structure and function of plant aspartic proteinases. *Eur J Biochem* **271**: 2067-2075
- Staal M, Maathuis FJM, Elzenga JTM, Overbeek JHM, Prins HBA** (1991) Na⁺/H⁺ antiport activity in tonoplast vesicles from roots of the salt-tolerant *Plantago maritima* and the salt-sensitive *Plantago media*. *Physiol. plant.* **82**: 179-184
- Stacey G, Koh S, Granger C, Becker JM** (2002) Peptide transport in plants. *Trends Plant Sci* **7**: 257-263
- Strasser R, Bondili JS, Schoberer J, Svoboda B, Liebminger E, Glossl J, Altmann F, Steinkellner H, Mach L** (2007) Enzymatic properties and subcellular localization of *Arabidopsis* beta-N-acetylhexosaminidases. *Plant Physiol* **145**: 5-16
- Sung U, Jennings JL, Link AJ, Blakely RD** (2005) Proteomic analysis of human norepinephrine transporter complexes reveals associations with protein phosphatase 2A anchoring subunit and 14-3-3 proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **333**: 671-678
- Szczyпка MS, Wemmie JA, Moye-Rowley WS, Thiele DJ** (1994) A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *J Biol Chem* **269**: 22853-22857
- Sze H** (1985) H⁺-TRANSLOCATING ATPASES - ADVANCES USING MEMBRANE-VESICLES. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **36**: 175-208
- Sze H, Liang F, Hwang I, Curran AC, Harper JF** (2000) Diversity and regulation of plant Ca²⁺ pumps: insights from expression in yeast. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**: 433-462

Sze H, Schumacher K, Muller ML, Padmanaban S, Taiz L (2002) A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H(+)-ATPase. *Trends Plant Sci* **7**: 157-161

Szponarski W, Sommerer N, Boyer JC, Rossignol M, Gibrat R (2004) Large-scale characterization of integral proteins from Arabidopsis vacuolar membrane by two-dimensional liquid chromatography. *Proteomics* **4**: 397-406

T

Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Smith FW, Blake-Kalff M, Hawkesford MJ, Saito K (2000) The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **23**: 171-182

Talke IN, Hanikenne M, Kramer U (2006) Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator Arabidopsis halleri. *Plant Physiol* **142**: 148-167

Tambasco-Studart M, Titiz O, Raschle T, Forster G, Amrhein N, Fitzpatrick TB (2005) Vitamin B6 biosynthesis in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 13687-13692

Tamura K, Shimada T, Ono E, Tanaka Y, Nagatani A, Higashi SI, Watanabe M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2003) Why green fluorescent fusion proteins have not been observed in the vacuoles of higher plants. *Plant J* **35**: 545-555

Taylor CB, Bariola PA, delCardayre SB, Raines RT, Green PJ (1993) RNS2: a senescence-associated RNase of Arabidopsis that diverged from the S-RNases before speciation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 5118-5122

The Arabidopsis Genome Initiative (AGI) (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature* **408**: 796-815

Theodoulou FL (2000) Plant ABC transporters. *Biochim Biophys Acta* **1465**: 79-103

Thom M, Komor E (1984) Role of the ATPase of sugar-cane vacuoles in energization of the tonoplast. *Eur J Biochem* **138**: 93-99

Thomine S, Lelievre F, Debarbieux E, Schroeder JI, Barbier-Brygoo H (2003) AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant J* **34**: 685-695

Thomine S, Wang R, Ward JM, Crawford NM, Schroeder JI (2000) Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4991-4996

Torii KU (2004) Leucine-rich repeat receptor kinases in plants: structure, function, and signal transduction pathways. *Int Rev Cytol* **234**: 1-46

U

Uemura T, Yoshimura SH, Takeyasu K, Sato MH (2002) Vacuolar membrane dynamics revealed by GFP-AtVam3 fusion protein. *Genes Cells* **7**: 743-753

Urech K, Durr M, Boller T, Wiemken A, Schwencke J (1978) Localization of polyphosphate in vacuoles of Saccharomyces cerevisiae. *Arch Microbiol* **116**: 275-278

V

van den Wijngaard PW, Bunney TD, Roobeek I, Schonknecht G, de Boer AH (2001) Slow vacuolar channels from barley mesophyll cells are regulated by 14-3-3 proteins. *FEBS Lett* **488**: 100-104

van der Rest B, Boisson AM, Gout E, Bligny R, Douce R (2002) Glycerophosphocholine metabolism in higher plant cells. Evidence of a new glyceryl-phosphodiester phosphodiesterase. *Plant Physiol* **130**: 244-255

Vander Willigen C, Postaire O, Tournaire-Roux C, Boursiac Y, Maurel C (2006) Expression and inhibition of aquaporins in germinating Arabidopsis seeds. *Plant Cell Physiol* **47**: 1241-1250

Vatamaniuk OK, Bucher EA, Ward JT, Rea PA (2001) A new pathway for heavy metal detoxification in animals. Phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in Caenorhabditis elegans. *J Biol Chem* **276**: 20817-20820

Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP, Rea PA (1999) AtPCS1, a phytochelatin synthase from Arabidopsis: isolation and in vitro reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 7110-7115

- Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP, Rea PA** (2000) Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase: blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *J Biol Chem* **275**: 31451-31459
- Vazquez-Flota F, Carrillo-Pech M, Minero-Garcia Y, De Lourdes Miranda-Ham M** (2004) Alkaloid metabolism in wounded *Catharanthus roseus* seedlings. *Plant Physiol Biochem* **42**: 623-628
- Vercammen D, Belenghi B, van de Cotte B, Beunens T, Gavigan JA, De Rycke R, Brackenier A, Inze D, Harris JL, Van Breusegem F** (2006) Serpin1 of *Arabidopsis thaliana* is a suicide inhibitor for metacaspase 9. *J Mol Biol* **364**: 625-636
- Verret F, Gravot A, Auroy P, Leonhardt N, David P, Nussaume L, Vavasseur A, Richaud P** (2004) Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Lett* **576**: 306-312
- Vert G, Briat JF, Curie C** (2001) *Arabidopsis* IRT2 gene encodes a root-periphery iron transporter. *Plant J* **26**: 181-189
- Vert G, Grotz N, Dedaldechamp F, Gaymard F, Guerinot ML, Briat JF, Curie C** (2002) IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* **14**: 1223-1233
- Villiers TA** (1967) Cytolysomes in Long-dormant Plant Embryo Cells. *Nature* **214**: 1356-1357
- Vogeli-Lange R, Wagner GJ** (1990) Subcellular Localization of Cadmium and Cadmium-Binding Peptides in Tobacco Leaves : Implication of a Transport Function for Cadmium-Binding Peptides. *Plant Physiol* **92**: 1086-1093
- Voß M, Weidner M** (1988) Uridine 5'-diphospho-D-glucose-dependent vectorial sucrose synthesis in tonoplast vesicles of the storage hypocotyl of red beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *conditiva*). *Planta* **173**: 96-103

W

- Wagner GJ** (1981) Vacuolar Deposition of Ascorbate-derived Oxalic Acid in Barley. *Plant Physiol* **67**: 591-593
- Walker RR, Leigh RA** (1981) Mg²⁺-Dependent, cation-stimulated inorganic pyrophosphatase associated with vacuoles isolated from storage roots of red beet (*Beta vulgaris* L.). *Planta* **153**
- Wang J, Evangelou BP, Nielsen MT, Wagner GJ** (1991) Computer-Simulated Evaluation of Possible Mechanisms for Quenching Heavy Metal Ion Activity in Plant Vacuoles: I. Cadmium. *Plant Physiol* **97**: 1154-1160
- Ward JM, Pei ZM, Schroeder JI** (1995) Roles of Ion Channels in Initiation of Signal Transduction in Higher Plants. *Plant Cell* **7**: 833-844
- Weise A, Barker L, Kuhn C, Lalonde S, Buschmann H, Frommer WB, Ward JM** (2000) A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *Plant Cell* **12**: 1345-1355
- Weschke W, Panitz R, Sauer N, Wang Q, Neubohn B, Weber H, Wobus U** (2000) Sucrose transport into barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation. *Plant J* **21**: 455-467
- Westenberg B, Boller T, Wiemken A** (1989) Lack of arginine- and polyphosphate storage pools in a vacuole-deficient mutant (end 1) of *S. cerevisiae*. *FEBS letters* **254**: 133-136
- Wilson C, Lucas WJ** (1987) Influence of Internal Sugar Levels on Apoplasmic Retrieval of Exogenous Sucrose in Source Leaf Tissue. *Plant Physiol* **84**: 1088-1095
- Winter H, Robinson DG, Heldt HW** (1993) Subcellular volumes and metabolic concentrations in barley leaves. *Planta* **191**
- Winter H, Robinson DG, Heldt HW** (1994) Subcellular volumes and metabolic concentrations in spinach leaves. *Planta* **191**
- Wodzicki TJ, Humphreys WJ** (1973) Maturing pine tracheids. Organization of intravacuolar cytoplasm. *J Cell Biol* **56**: 263-265
- Wormit A, Trentmann O, Feifer I, Lohr C, Tjaden J, Meyer S, Schmidt U, Martinoia E, Neuhaus HE** (2006) Molecular identification and physiological characterization of a novel monosaccharide transporter from *Arabidopsis* involved in vacuolar sugar transport. *Plant Cell* **18**: 3476-3490

RESUME

La vacuole est un organite qui joue un rôle important dans de nombreux processus de la cellule végétale, et en particulier dans la protection contre les toxiques cellulaires. Parmi ceux-ci, le cadmium est un polluant courant qui affecte les fonctions physiologiques de la plante. La vacuole est connue pour sa capacité à séquestrer les ions métalliques présents dans le cytosol. Toutefois, les acteurs protéiques de cette compartimentation, et notamment les transporteurs, ne sont pas bien connus. Afin de mieux comprendre le rôle de cet organite dans les mécanismes de protection contre le stress métallique, nous avons mis en place une série d'outils d'analyse du protéome vacuolaire, dans le but de réaliser une caractérisation protéomique de référence de cet organite, utile pour l'étude de sa dynamique en conditions de stress.

Mon travail a consisté dans un premier temps à mettre au point une méthode de purification de vacuoles à partir de cellules en culture d'*Arabidopsis thaliana*. La pureté des échantillons obtenus a été confirmée à l'aide de tests biochimiques (western-blots et mesures d'activités enzymatiques) et nous avons pu initier l'analyse par spectrométrie de masse des constituants protéiques de la membrane et de la fraction soluble de la vacuole. Celle-ci a permis d'identifier 689 protéines non-redondantes, dont 110 transporteurs. La localisation *in vivo* de 5 d'entre elles a été réalisée *via* l'expression *in planta* de ces protéines fusionnées à la GFP.

Cette première approche protéomique a été complétée d'une étude plus approfondie du protéome vacuolaire, visant à en acquérir des notions quantitatives et organisationnelles. Pour cela, des gels d'électrophorèses bidimensionnelles (IEF / SDS-PAGE) ont été réalisés à partir de la fraction soluble des vacuoles. Les spots résolus ont été quantifiés *via* le logiciel d'analyse d'images PDQuest et identifiés par spectrométrie de masse. Cette étude a permis de mettre en évidence un certain nombre de protéines majeures de ce compartiment et a porté le nombre total de protéines vacuolaires identifiées par nos travaux à 709. Quelques protéines connues pour être cytosoliques ont toutefois été retrouvées, et une cartographie du protéome cytosolique a également été réalisée afin de la comparer avec celle du protéome soluble de la vacuole et tenter de mieux comprendre l'origine de ces protéines. Cette analyse a été complétée d'une expérience préliminaire de digestion de vacuoles intactes par la protéinase K. Les résultats obtenus suggèrent la présence de protéines à l'intérieur de la vacuole (probablement en cours de dégradation), et d'autres associées à la face externe du tonoplaste probablement de façon spécifique. Enfin, la présence de complexes protéiques a été évaluée à travers la réalisation d'électrophorèses en conditions non dénaturantes qui ont permis de retrouver des complexes connus (ATPase vacuolaire) mais aussi de mettre en évidence plusieurs complexes putatifs de protéines diverses (protéases, glycosidases ...).

Un dernier aspect de mon travail a enfin consisté à développer un outil informatique d'exploitation de données d'analyses à haut débit. La confrontation, grâce à cette structure, des résultats de protéomiques vacuolaires et d'autres d'expression génique lors d'un stress cadmium ont permis d'identifier des protéines présentes dans (ou associées à) la vacuole dont le niveau de transcrite est modulé lors d'un stress. Ces analyses croisées ont notamment mis en évidence la protéine DWARF1, qui catalyse une étape de la biosynthèse des brassinostéroïdes, une classe d'hormones. L'étude de l'implication de cette hormone a alors montré que celle-ci est capable de moduler la tolérance au cadmium de plantules, très probablement *via* des mécanismes qui n'ont encore jamais été identifiés.

L'ensemble de ce travail constitue une base pour l'étude ultérieure de la dynamique du protéome vacuolaire. Il propose des méthodes et des outils d'analyse, ainsi qu'une série de données de référence, pour mieux comprendre les processus vacuolaires de la détoxification métallique, et a d'ores et déjà permis de mettre en évidence des aspects nouveaux du fonctionnement de cet organite.
