

MONTPELLIER SUPAGRO
CENTRE INTERNATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES EN SCIENCES AGRONOMIQUES
2 place Viala – 34060 Montpellier Cedex 1 – France

T H É S E

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Formation Doctorale : Biologie Intégrative des Plantes
Ecole Doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences,
Hydrosciences, Environnement.

présentée et soutenue publiquement

par

Mehdi Jabnoune

Le 19 Décembre 2008

Adaptation des plantes au stress salin : caractérisation de transporteurs de sodium et de potassium de la famille HKT chez le riz

Laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes
UMR 5004 CNRS/INRA/SupAgro/Université Montpellier II
2 place Viala
34060 Montpellier Cedex 1

JURY

M. Khaled MASMOUDI , Professeur, CBS, Sfax	Rapporteur
M. Christian MAZARS , Chargé de Recherche, CNRS, Toulouse	Rapporteur
M. Ahmed MLIKI , Professeur, CBBC, Borj cédria	Examineur
M. Bruno TOURAINE , Professeur, Université Montpellier II, Montpellier	Examineur
M. Chedly ABDELLY , Professeur, CBBC, Borj cédria	Co-directeur de thèse
Mlle Anne-Aliénor VERY , Chargée de Recherche, CNRS, Montpellier	Co-directeur de thèse

Remerciements

Cette thèse a été réalisée en cotutelle entre Supagro Montpellier et la Faculté des Sciences de Tunis, avec le soutien financier du Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique et de la Technologie de Tunisie et l'Agence universitaire de la Francophonie (AUF). Les recherches qui font l'objet de ce mémoire ont été réalisées sur deux sites, en Tunisie, au sein du Laboratoire d'Ecophysiologie et de la Valorisation des Plantes Extrêmophiles à Borj Cédria et en France, au sein de l'unité Biochimie et physiologie moléculaire des plantes à Montpellier.

Je tiens à remercier en premier lieu mes deux co-directeurs de thèse M. Chedly ABDELLEY et M^{elle} Anne-Aliénor VERY d'avoir bien assuré la direction et l'encadrement de mes travaux de thèse. Merci pour votre disponibilité, votre gentillesse, votre patience et vos précieux conseils. J'ai beaucoup apprécié travailler à vos côtés tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Je garde toujours beaucoup de plaisir à discuter avec vous et à bénéficier de vos conseils.

Je tiens également à remercier le Professeur Claude GRIGNON pour la confiance qu'il m'a accordé, l'intérêt qu'il a porté à mon égard ainsi qu'à mon travail et surtout son aide précieuse de laquelle j'ai bénéficié pendant les moments difficiles.

Je tiens à remercier spécialement mon directeur d'équipe Hervé SENTENAC...Hervé, je te remercie d'avoir cru en mes capacités, pour le temps et la patience que tu m'as accordé tout au long de ces années en me fournissant d'excellentes conditions logistiques et financières. Je garderai dans mon cœur ta générosité, ta compréhension et ton efficacité. Pour tout ce que tu m'as donné, je te remercie très sincèrement.

Je remercie également Jean-Baptiste THIBAUD. JB, ton expérience, tes conseils, ton humour et ton amitié m'ont été très précieux.

Je remercie M. Khaled MASMOUDI et M. Christian MAZARS d'avoir accepté rapporter cette thèse, en bénéficiant ainsi de leurs remarques pertinentes. Je tiens à leurs exprimer ma considération la plus respectueuse. Merci également à M. Ahmed MLIKI et M. Bruno TOURAINÉ qui ont accepté de juger ce travail en tant qu'examinateur et Président du jury.

Je remercie les membres de l'équipe *Canaux ioniques* pour la sympathie et l'aide qu'ils m'ont témoignés durant ces années de dur labeur.

Un merci tout particulier à mon ami Walid Zorrig, pour nos innombrables et inoubliables conversations toujours plus intéressantes avec mes meilleurs souhaits pour la suite de sa thèse. Un grand merci aussi pour Ali et Khader pour leur aide et leur soutien avec mes sincères souhaits de réussite.

Je souhaite également remercier certaines personnes qui ont été à mes côtés et de qui je garde de si bons souvenirs, mes amis de toujours Nicolas, Julie et Arnaud ainsi que mes proches Sleh et Nihel.

Je dédie ce travail à mes parents, je ne serais trouver les mots pour leur exprimer ma gratitude, mon amour et ma reconnaissance. Je remercie mes deux petites sœurs chéries pour leur soutien moral, leur encouragement et leur affection. A eux tous, je souhaite un avenir plein de joie, de bonheur et de succès en souhaitant que Dieu vous préserve une longue vie.

Le plus intense de mes sentiments revient enfin à Sandra, ma chère et tendre épouse, pour m'avoir supporté et encouragé pendant les moments difficiles, pour avoir été toujours présente jusqu'à la fin de la thèse et tout simplement pour l'amour qu'elle m'apporte au quotidien !

Abréviations

A: ampère	M: mol/litre
ADN: acide désoxyribonucléique	MATB: mixed alkyl trimethyl ammonium bromide
ADNc: acide désoxyribonucléique complémentaire	MES: acide 2-(N-morpholino)ethanesulfonique
ADN-T: ADN de transfert	MF: matière fraîche
ARN: acide ribonucléique	mM: millimoles
ARNm: acide ribonucléique messenger	mOsM: milliosmole
BET: bromure d'éthidium	ng: nanogrammes
BSA: albumine de sérum de bœuf	nl: nanolitre
BTP: 1,3-bis[tris(hydroxyméthyl)méthylamino] propane	nm: nanomètre
C/I: chloroforme/alcool isoamylique	NMDG: N-méthyl-D-glucamine
CCCP: carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone	ORF: open reading frame
CCD: charge-coupled device	ORK: outward rectifying K ⁺ channels
CHX: cation/H ⁺ exchanger	P/C/I: phénol/chloroforme/alcool isoamylique
CNGC: cyclic nucleotide gated channels	p/v: poids/volume
cpm: coups par minute	pb: paire de bases
C _T : cycle threshold	PCR: poly chain reaction
CTAB: bromure d'hexadécyltriméthylammonium	PEG: polyéthylène glycol
dATP: nucléotide deoxyadenosine triphosphate	pmole: picomole par litre
dCTP: nucléotide deoxycytidine triphosphate	ppm: partie par million
ddp: difference de potentiel	PTS: trisodium 3-hydroxy-5, 8,10-pyrenetrisulphonate
DEPC: diéthylpyrocarbonate	PVC: polychlorure de vinyle
dGTP: nucléotide deoxyguanosine triphosphate	RER: rough endoplasmic reticulum
DMSO: diméthylsulfoxyde	RNase: ribonucléase
DNase: désoxyribonucléase	rpm: rotation par minute
dNTP: désoxyribonucléotide triphosphate	RT: reverse transcription
DTT: dithiothréitol	SDS: dodécylsulfate de sodium
dTTP: nucléotide thymidine triphosphate	SSC: standard saline citrate
EDTA: acide éthylène diamine tétra-acétique	ssp.: <i>sub-species</i>
FST: flanking sequence tag	SV: slow vacuolar
GFP: green fluorescent protein	TAE: tris-acide acétique-EDTA
GLR: glutamate-activated channels	Taq: <i>Thermus aquaticus</i> ADN polymérase
ha: hectare	TEA: tétraéthylammonium
HEPES: acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1- piperazineethanesulfonique	T _m : Melting temperature (température de fusion)
IPTG: isopropyl-beta-thio-galactoside	TPK: tandem-pore K ⁺ channel
IRK: inward rectifying K ⁺ channels	TRH: tiny root hair
J: jour	Tris: tris-(hydroxyméthyl)aminoéthane
K.O.: knockout	U.V.: rayonnement ultraviolet
kb: kilobase	UTR: untranslated region
KDa: kilodalton	v/v: volume/volume
KEA: K ⁺ efflux antiporter	V: volt
<i>K_m</i> : constante de Michaelis	xg: acceleration (m.s ⁻¹)
kpb: kilo paire de bases	X-Gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D- galactopyranoside
LB: milieu de Lurina et Bertani	μCi: micro-Curie
	μE: micro-Einstein

Sommaire

SOMMAIRE

CHAPITRE I	9
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	9
I.1 Introduction: Stress salin, stress abiotique majeur en agriculture	10
I.2 Rôles des cations alcalins K^+ et Na^+ chez les plantes	10
I.2.1 Rôle de K^+	10
I.2.2 Rôle de Na^+	11
I.3 Physiologie des transports de K^+ et Na^+ dans la plante	12
I.3.1 Absorption par la racine	12
I.3.2 Transports à longue distance dans le xylème et dans le phloème.....	15
I.3.3 Compartimentation subcellulaire et accumulation sélective de Na^+	19
I.3.4 “exclusion et inclusion”: stratégies d’adaptation à Na^+	21
I.4 Les systèmes de transport membranaires: définitions	21
I.5 Systèmes de transports de K^+ et Na^+ chez les plantes	22
I.5.1 Les canaux.....	23
I.5.2 Les transporteurs	25
I.6 Les transporteurs HKT et résistance à la salinité	29
I.6.1 “ <i>TaHKT1</i> ”, le Premier HKT cloné chez les plantes	29
I.6.2 “ <i>AtHKT1</i> ”, un transporteur spécifique de Na^+	29
I.6.3 La famille HKT du riz.....	30
I.6.4 Membres de la famille HKT identifiés chez d'autres espèces végétales.....	31
I.6.5 Relation structure-fonction des <i>HKTs</i>	32
I.6.6 Rôle des HKTs dans la plante	34
I.7 contexte et objectifs de ma thèse.....	36
CHAPITRE II	38
MATERIELS ET METHODES	38
II.1 Matériel végétal et systèmes de culture	39
II.1.1 Matériel végétal	39
II.1.2 Les différents systèmes de culture de riz	39
II.2 Application des stress	41
II.2.1 Stress salin et carence en K^+ en hydroponie.....	41
II.2.2 Stress de carence en K^+ sur boîtes de petri.....	42
II.3 Prétraitement des racines pour la mesure du potentiel membranaire et des flux nets de K^+ et Na^+	42
II.3.1 Prétraitement pour les mesures de potentiel de racine	42
II.3.2 Prétraitement pour les mesures de flux nets racinaires	42
II.4 Biologie moléculaire.....	42
II.4.1 Extraction, amplification et analyse des acides nucléiques.....	42
II.4.2 PCR “classique”, “semi-quantitative” ou en “temps réel”	47
II.4.3 Méthodes de clonage moléculaire	49
II.5 Purification des lignées mutantes de riz	50

II.5.1 Génotypage des mutants	51
II.5.2 Réalisation du croisement	51
II.5.3 Castration et préparation des plantes femelles	51
II.5.4 Préparation des plantes pollinisatrices	51
II.5.5 Préparation à la pollinisation.....	51
II.5.6 La pollinisation	51
II.5.7 La maturation	52
II.6 Détermination du nombre de copies du transposon <i>tos17</i> dans le génome des plantes mutantes	52
II.6.1 Analyse par southern blot	52
II.6.2 Analyse par pcr en temps réel (PCR quantitative)	52
II.7 Analyses phénotypiques	54
II.7.1 Détermination de la teneur de Na ⁺ et K ⁺ dans les tissus foliaires et racinaires	54
II.7.2 Mesure de flux nets racinaires de sodium et de potassium dans la racine de riz.....	54
II.8 Histologie de la racine de riz	56
II.9 Electrophysiologie	56
II.9.1 Voltage-clamp sur ovocytes de xénope.....	56
II.9.2 Mesure du potentiel de membrane des cellules corticales de la racine de riz	58
CHAPITRE III	60
DIVERSITY IN EXPRESSION PATTERNS AND FUNCTIONAL PROPERTIES IN THE RICE HKT TRANSPORTER FAMILY	
	60
CHAPITRE IV	81
ISOLEMENT ET PURIFICATION DE MUTANTS PERTE DE FONCTION POUR TROIS GENES <i>HKT</i> DE RIZ.....	
	81
IV.1 Introduction.....	82
IV.2 Recherche et choix de mutants d'insertions dans les gènes <i>HKTs</i> chez le riz	82
IV.3 Caractérisation moléculaire des mutants	84
IV.3.1 Détermination du génotype des plantes mutantes par PCR: recherche de plantes homozygotes	84
IV.3.2 Détermination de la position exacte de l'insertion dans le gène d'intérêt	84
IV.3.3 Analyse du nombre initial de copies du transposon <i>tos17</i> par ‘southern blot’	85
IV.3.4 Analyse du nombre de copies du transposon <i>tos17</i> par PCR en temps réel	85
IV.4 Purification des mutants par rétrocroisement successifs	86
IV.5 Analyse du caractère perte de fonction du gène <i>OsHKT1</i> chez les lignées mutantes NC2534, ND4057 et NF7785.....	87
IV.6 Conclusion	88
CHAPITRE V.....	90
OSHKT1 EST IMPLIQUE DANS LE TRANSPORT DE SODIUM ET DE POTASSIUM A HAUTE AFFINITE DANS LA RACINE DE RIZ	
	90
V.1 Introduction	91
V.2 Résultats	91
V.2.1 <i>OsHKT1</i> fonctionne en symport Na ⁺ -K ⁺ dans l'ovocyte à faible concentration externe de Na ⁺ et K ⁺	91
V.2.2 L'inactivation du gène <i>OsHKT1</i> affecte les flux nets racinaires de Na ⁺ et K ⁺	92
V.2.3 La disruption d' <i>OsHKT1</i> n'affecte pas les teneurs racinaires de K ⁺ et Na ⁺	94

V.2.4 Mesure de potentiel de membrane des cellules corticales de la racine sur des plantes sauvages ou mutants invalidés <i>oshkt1</i> : mises au point.	95
V.2.5 Analyse de l'expression de différents systèmes de transports de K ⁺ dans la racine de riz.....	101
V.3 Discussion	101
CHAPITRE VI.....	108
DISCUSSION GENERALE.....	108
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	114

CHAPITRE I
Analyse bibliographique

I.1 Introduction: stress salin, stress abiotique majeur en agriculture

La salinité des sols constitue l'un des principaux stress abiotiques limitant la croissance des plantes cultivées (Epstein *et al.*, 1980; Boyer *et al.*, 1982; Tanji *et al.*, 1990; Abdelly *et al.*, 2008; Munns et Tester, 2008). Cette salinité peut être naturelle ou induite par les activités agricoles comme l'irrigation (avec de l'eau de faible qualité) ou l'utilisation de certains types d'engrais (Bartels et Nelson, 1994; Rubio *et al.*, 1995). Ainsi, chaque année, près de 10 millions d'ha de terres cultivables sont perdus dans le monde du fait de l'accumulation, au cours du temps, de petites quantités de sel contenues dans l'eau d'irrigation.

La conséquence générale de la présence de sels dans les sols est une limitation de la croissance qui provoque une baisse de rendement. Dans les régions semi-arides, la concentration en sel de la solution du sol peut atteindre 100 mM, condition qui inhibe la croissance de la quasi-totalité des plantes cultivées (Greenway et Munns, 1980; Amtmann et Sandres, 1999). Pour des concentrations en sel plus fortes, même la germination peut devenir impossible.

I.2 Rôles des cations alcalins K^+ et Na^+ chez les plantes

I.2.1 Rôle de K^+

Le potassium est l'un des minéraux les plus abondants de la croûte terrestre, constituant approximativement 2,5 % de la lithosphère.

Les molécules constitutives de la cellule vivante contiennent en moyenne 25 fois plus d'oxygène que d'azote (Lehninger, 1975). Cette différence d'abondance relative fait que, globalement, la charge électrique nette des biomolécules est négative. Les cations inorganiques comme K^+ , Na^+ , Mg^{2+} et Ca^{2+} assurent donc la neutralité électrique.

Le potassium, présent à une concentration de 100 à 200 mM dans le cytosol, est le cation inorganique majoritaire du cytoplasme des cellules animales et végétales. Les raisons de son accumulation préférentielle par rapport à Na^+ tiennent probablement au fait que Na^+ est davantage "chaotropique" (du fait de sa plus petite taille et donc du champ électrique plus fort à sa surface) (Clarkson et Hanson, 1980).

I.2.1.1 Rôles physiologiques

En tant que cation inorganique le plus abondant dans le cytoplasme, le potassium est impliqué dans des fonctions cellulaires essentielles. Outre son rôle dans la neutralisation de la charge électrique nette des bio-molécules, il participe, par exemple, au contrôle de la polarisation électrique de la membrane plasmique et au contrôle du potentiel osmotique intracellulaire (Clarkson et Hanson, 1980). Chez les plantes, en liaison avec cette dernière fonction, K^+ est impliqué dans le contrôle de la pression de turgescence (Vorobiev, 1967; Maathuis et Sanders, 1993; Walker *et al.*, 1996a) et les fonctions connexes, élongation cellulaire ou mouvements cellulaires. Enfin, K^+ joue un rôle, direct ou indirect, important dans la régulation d'activités enzymatiques, la synthèse des protéines, la photosynthèse et l'homéostasie du pH cytoplasmique.

Ces différents rôles au niveau cellulaire impliquent le potassium dans des fonctions essentielles au niveau de la plante entière, comme par exemple le contrôle des échanges gazeux *via* la régulation de l'ouverture et de la fermeture des stomates, les nasties, l'ascension de la sève xylémienne par poussée racinaire, l'installation du gradient de potentiel osmotique entraînant le flux de sève phloémienne des organes sources vers les organes puits ou encore le port érigé des espèces herbacées.

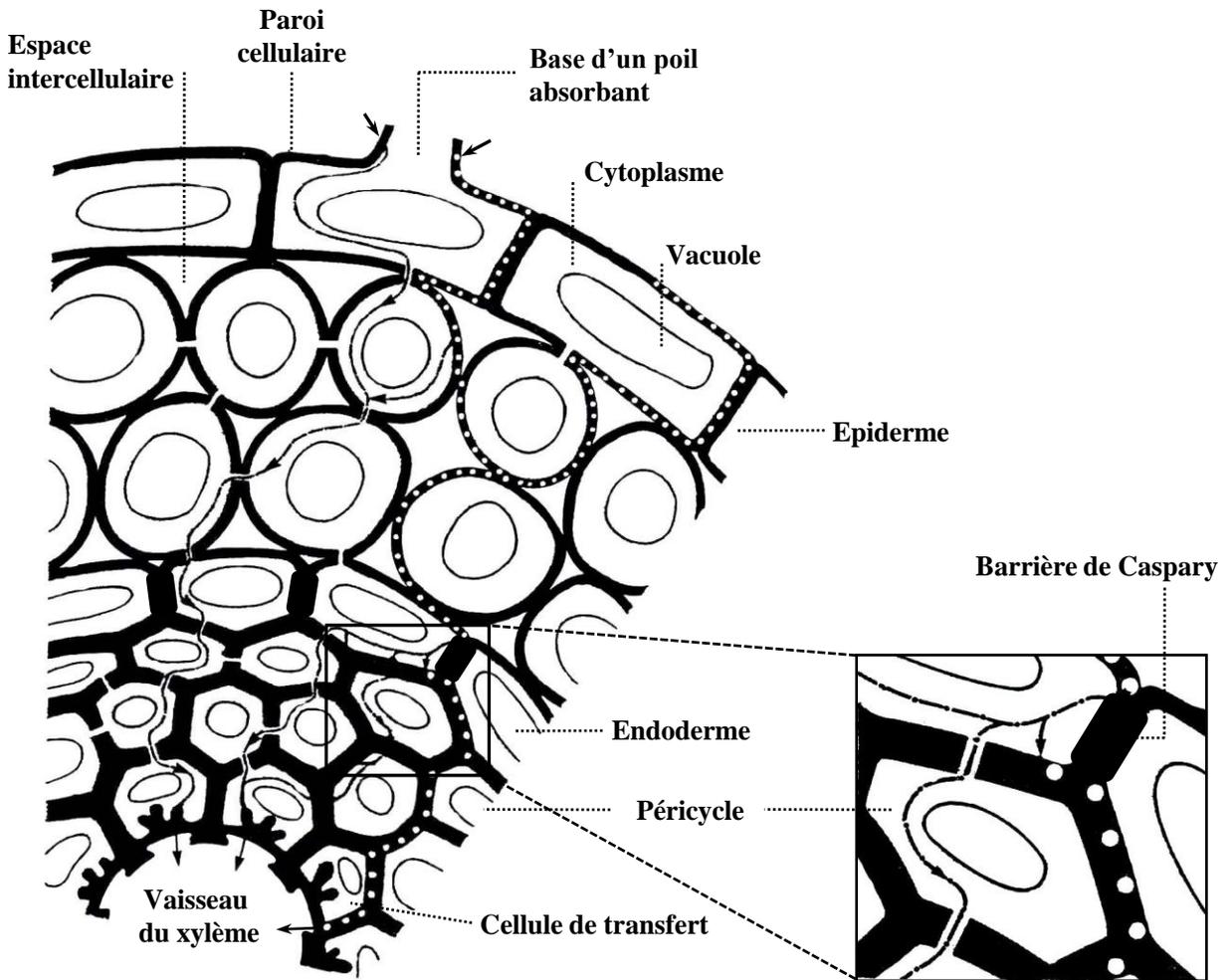


Figure I.1. Voies de transport radial des ions dans la racine (d'après Lacan D., 1992).

Les ions sont absorbés au niveau de l'épiderme ou des poils absorbants et transportés dans la racine jusqu'aux vaisseaux du xylème par deux voies: (i) La voie symplasmique (ligne noire) où les ions pénètrent dans le cytoplasme d'une cellule en passant par des transporteurs membranaires, circulent d'une cellule à l'autre *via* les plasmodesmes, jusqu'à ce qu'ils soient sécrétés dans les vaisseaux du xylème; (ii) la voie apoplasmique (ligne pointillée), qui emprunte l'espace intercellulaire à travers les parois des cellules au niveau de l'apex. Dans les régions matures, la barrière de Caspariy au niveau de l'endoderme, constituée de cellules dont les parois sont subérifiées (encadré à droite), bloque, le passage apoplasmique des ions, les obligeant à emprunter la voie symplasmique pour atteindre le parenchyme xylémien. La barrière de Caspariy permet ainsi de réguler l'entrée des ions, en particulier ceux potentiellement néfastes comme le sodium, dans les parties aériennes. Dans la stèle, les cellules de transfert du xylème (vers le phloème) peuvent également posséder un rôle régulateur.

I.2.1.2 Conséquences de la carence en K^+ sur la physiologie des plantes

Lorsque la plante se trouve dans une situation de carence de K^+ , les flux de sève sont perturbés, ce qui se traduit par une diminution prononcée de la vitesse de circulation de la sève phloémienne. Les photoassimilats s'accumulent alors dans les feuilles. Des symptômes de chlorose et de nécrose provenant de la photooxydation de l'appareil photosynthétique sont fréquemment observés et résultent d'une augmentation de la production de superoxydes (Marschner *et al.*, 1996).

I.2.2 Rôle de Na^+

Na^+ ne constitue pas un (macro)élément nutritif essentiel chez la plupart des plantes supérieures. A forte concentration dans le sol, ce cation devient même toxique pour la plante. A des concentrations plus faibles, la plante peut l'utiliser avec profit en tant qu'osmoticum vacuolaire.

I.2.2.1 Toxicité de Na^+ dans le cytoplasme

La concentration de Na^+ dans le cytosol est maintenue à une valeur inférieure à celle de K^+ , dans les cellules animales comme dans les cellules végétales (Cheeseman, 1988). Dans les cellules animales, la concentration de Na^+ est régulée de façon étroite à une valeur proche de 10^{-2} mole.L⁻¹ (Darnell *et al.*, 1990). Dans les cellules végétales, la concentration de Na^+ ne semble pas être soumise à une homéostasie aussi étroite. Lorsque la plante se développe en présence de Na^+ , l'accumulation de Na^+ dans le cytoplasme au delà d'un certain seuil devient toxique, mais ce seuil n'est pas clairement déterminé.

La toxicité de Na^+ dans le cytosol résulterait de son caractère "chaotropique", par comparaison avec K^+ (Clarkson et Hanson, 1980). Elle impliquerait aussi probablement sa capacité à entrer en compétition avec K^+ dans les processus de fixation sur des protéines importantes. Plus de 50 enzymes nécessitent K^+ pour être actives, et Na^+ n'assurerait pas la même fonction (Bhandal et Malik, 1988). Par conséquent, une concentration élevée de Na^+ dans le cytoplasme inhiberait l'activité de nombreuses enzymes et protéines, entraînant des dysfonctionnements de la cellule. De plus, comme la synthèse de protéines nécessite une concentration élevée en K^+ pour la fixation des ARNt aux ribosomes (Blaha *et al.*, 2000), la traduction serait également affectée.

I.2.2.2 Rôle en tant qu'osmoticum

Si la cellule végétale ne peut pas substituer Na^+ à K^+ dans son cytosol, elle peut le faire, et utiliser Na^+ comme osmoticum, dans ses vacuoles. Différentes études ont effectivement montré que des quantités modérées de Na^+ peuvent améliorer la croissance de nombreuses espèces végétales (Mengel et Kirkby, 1982; Flowers et Läuchli, 1983). Par exemple, un effet "nutritif" bénéfique de Na^+ a été décrit chez la betterave et la tomate (Woolley, 1957; Marschner, 1971; Besford, 1978).

Il est probable que l'effet bénéfique de Na^+ s'observe en particulier dans des conditions de carence en K^+ . Dans ces conditions, une accumulation contrôlée de Na^+ contribue, probablement, à assurer la régulation de la pression de turgescence des cellules (Marschner *et al.* 1981, Subbarao *et al.* 1999). De même, une absorption modérée de Na^+ peut être bénéfique si elle permet à la plante, par exemple, d'ajuster rapidement son potentiel osmotique au début d'un stress salin.

En dépit de ces observations physiologiques, les déterminants génétiques de l'amélioration de la croissance des plantes par le sodium et les gènes susceptible d'intervenir

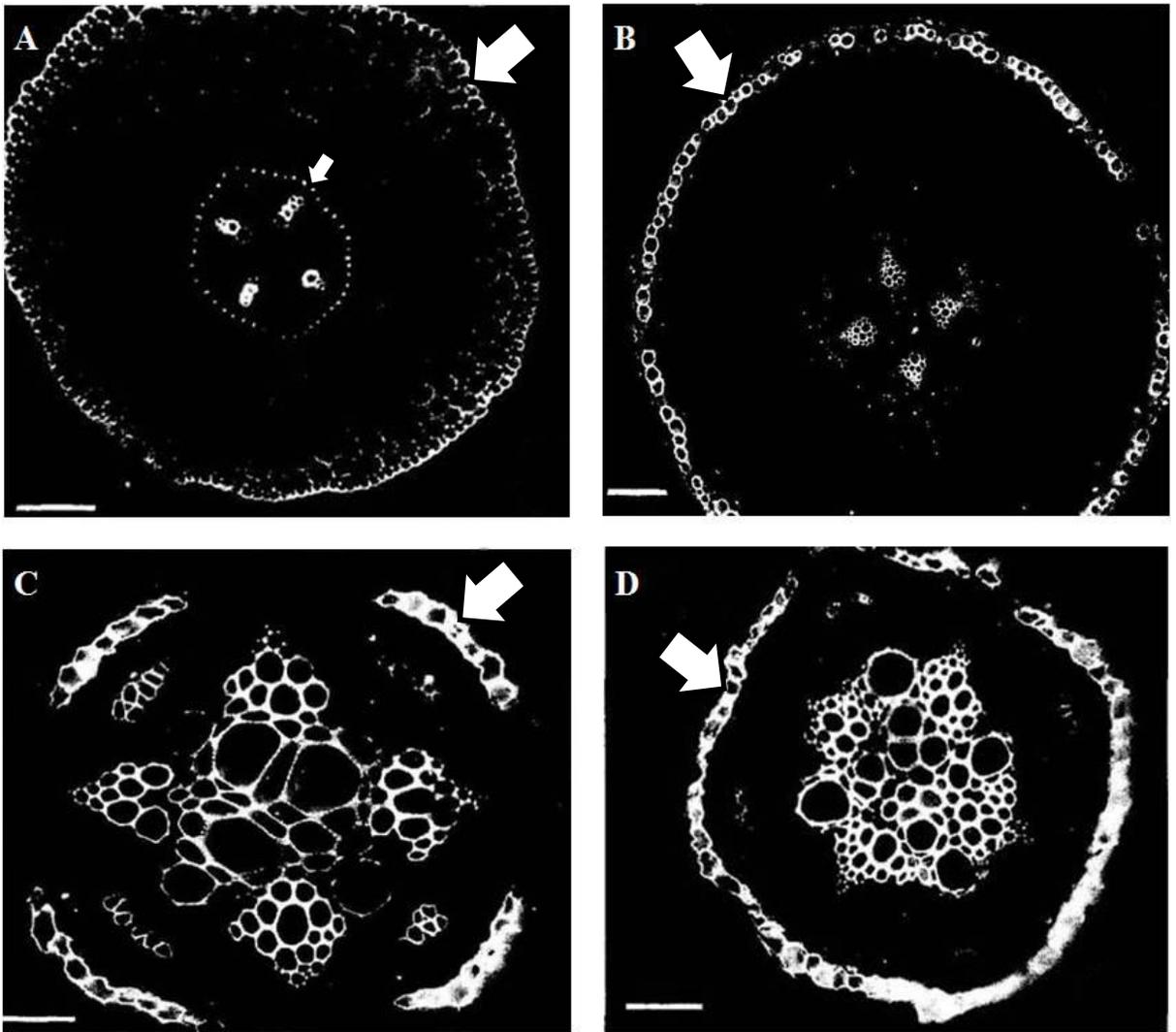


Figure I.2. Effet de la salinité sur l'anatomie des racines chez le cotonnier (D'après Reinhardt et Rost, 1995).

Des plantes de cotonnier (*Gossypium hirsutum*) ont reçu, ou non, un traitement salin (NaCl). Des fluorochromes spécifiques pour le cadre de Caspariy excités sous UV (berbérine, bleu d'aniline, fluorol, jaune d'aniline) sont utilisés pour détecter les modifications des parois cellulaires. **A.** Coupe radiale d'une racine de plante contrôle âgée de 14 jours, à 5 mm de l'apex. La fluorescence de la bande de Caspariy dans les cellules de l'endoderme est indiquée par la petite flèche, celle de l'épiderme par la grande flèche. Échelle, 32 μ m. **B.** Coupe radiale d'une racine de plante âgée de 3 jours soumise à un stress salin de 200 mM. Fluorescence de l'exoderme (grande flèche). Échelle, 228 μ m. **C.** Stèle d'une racine de plante contrôle âgée de 10 jours. Coupe à 200 mm de l'apex. Le cadre de Caspariy est indiqué par la flèche. Échelle, 94 μ m. **D.** Stèle d'une racine de plante âgées de 14 jours traitée avec NaCl 100 mM. Coupe à 250 mm de l'apex. La flèche indique les dépôts de subérine au niveau des cellules de l'endoderme.

dans ces processus sont encore mal caractérisés. Un travail conduit récemment chez le riz (Horie *et al.*, 2007), concernant la fonction *in planta* d'un transporteur de la famille HKT sur laquelle porte cette thèse, fournit cependant une démonstration génétique du fait qu'une accumulation de Na⁺ en condition de carence en K⁺ peut favoriser la croissance de la plante (Cf. § I.6.3).

I.2.2.3 Interaction des transports de K⁺ et Na⁺ et adaptations au stress salin

L'adaptation de la plante à la présence de sel dans le sol et au stress salin implique des processus très variés, intervenant à différents niveaux, de la cellule à l'organisme entier, comme par exemple une modification de l'activité métabolique conduisant à l'accumulation d'osmolytes organiques (Ghars *et al.*, 2008; Larher *et al.*, 1993; Sanada *et al.*, 1995; Hare et Cress 1997; Raychaudhuri et Majumder 1996), ou des modifications morphologiques et développementales des feuilles (Munns et Tester, 2008). Au sein de ce réseau de réponses très complexe (Abdelly *et al.*, 2008; Jellouli *et al.*, 2008), le contrôle des activités de transport membranaire, assurant via des mécanismes très divers une accumulation sélective de K⁺ et une exclusion de Na⁺ (Brini *et al.*, 2007, Blumwald, 2000, Blumwald et al., 2000; Glenn *et al.*, 1999; Barhoumi *et al.*, 2007) apparaît comme un processus central. Ainsi, dans de très nombreux modèles, depuis la culture de cellules isolées (Lefebvre, 1989) jusqu'à la plante entière (Hajibagheri *et al.*, 1987; Wrona et Epstein, 1985), l'adaptation au stress salin apparaît corrélée à la capacité de prélever sélectivement K⁺, de contrôler l'entrée de Na⁺ et de maintenir le rapport K⁺/Na⁺ des teneurs internes de ces deux cations à un niveau élevé. Dans ce contexte, la caractérisation moléculaire et fonctionnelle des systèmes de transport membranaire de K⁺ et Na⁺ constitue donc un objectif prioritaire (Schachtman et Liu, 1999). Il est probable que la capacité des canaux et transporteurs à discriminer K⁺ de Na⁺ repose essentiellement sur la différence d'intensité du champ électrique à la surface de ces deux ions, qui résulte de leur différence de taille et qui se traduit par des énergies d'hydratation différentes. La résolution par cristallographie de la structure du canal potassique bactérien KcsA (Doyle *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2001) fournit un exemple permettant de comprendre comment des groupements carbonyles de la chaîne polypeptidiques peuvent être agencés dans l'espace le long de la voie de perméation pour se substituer, sans barrière d'énergie, à la coque d'hydratation de l'ion.

Les paragraphes qui suivent présentent un résumé des connaissances actuelles concernant l'organisation générale des fonctions de transport de K⁺ et Na⁺ dans la plante et les systèmes de transport membranaires correspondants.

I.3 Physiologie des transports de K⁺ et Na⁺ dans la plante

I.3.1 Absorption par la racine

I.3.1.1 Relation structure–fonction de la racine

Le prélèvement des éléments minéraux par les racines et leur transfert vers les parties aériennes implique au moins deux étapes membranaires : l'absorption *sensu stricto* des ions depuis la solution du sol par les cellules épidermiques, corticales et éventuellement endodermiques, et la sécrétion dans les vaisseaux au niveau des cellules du parenchyme xylémien. Le mouvement radial des ions depuis les cellules périphériques de la racine vers la stèle peut emprunter en principe trois trajets (Pitman, 1977; Clarkson, 1993): la voie apoplasmique (continuum des espaces extracellulaires des tissus), la voie symplasmique (continuum des cytoplasmes de toutes les cellules de la racine interconnectées par les

plasmodesmes) ou un trajet mixte faisant passer les ions alternativement du compartiment apoplasmique au compartiment symplasmique (figure I.1). Au dessus de la zone de différenciation des cellules, le trajet apoplasmique est interrompu par l'endoderme de la racine. Les parois de ces cellules sont imprégnées de lignine et de subérine. Ce dépôt de composés hydrophobes forme le cadre de Caspary et constitue une barrière empêchant le passage de l'eau et des solutés. L'association très étroite de la membrane des cellules endodermiques avec le cadre de Caspary oblige les ions et l'eau à se soumettre à un contrôle membranaire pour passer la barrière endodermique et migrer dans la stèle. Cependant, à plusieurs niveaux dans la racine, les ions peuvent emprunter un trajet apoplasmique direct depuis le milieu extérieur jusqu'au xylème: au niveau de l'apex, où l'endoderme n'est pas encore subérisé, au niveau de la discontinuité de l'endoderme provoquée par l'émergence des racines secondaires (Yeo et Flowers, 1986), et chez certaines espèces, au niveau de quelques cellules endodermiques non subérisées, dites de passage dont le rôle n'est pas encore clairement établi (Peterson et Enstone, 1996). Cette particularité mise à part, dans les régions où l'endoderme est différencié et présente un cadre de Caspary fonctionnel, la composition de flux d'ions en provenance de la solution du sol et arrivant dans la sève xylémienne est donc strictement contrôlé par deux membranes: en amont de l'endoderme lors de l'étape d'absorption et en aval de cette barrière lors de l'étape de sécrétion dans la sève du xylème (Clarkson, 1993). Lorsque cette dernière barrière est franchie, les ions sont entraînés vers les vaisseaux du xylème par le flux d'eau.

Dans les zones racinaires matures de la majorité des plantes, une seconde barrière concentrique de celle formée par l'endoderme est formée en périphérie de la racine sur l'exoderme, couche cellulaire sous épidermique. La subérisation de l'exoderme aurait lieu plus tardivement au cours du développement racinaire que celle de l'endoderme (Salisbury et Ross, 1992). La subérisation de l'endoderme et de l'exoderme serait accélérée en cas de sécheresse (Peterson et Enstone, 1996) ou de stress salin (Schreiber *et al.*, 1999) (figure I.2).

I.3.1.2 Relation structure - fonction de la racine et stress salin

Les données actuelles sur la relation structure-fonction de la racine, comme cela a été discuté ci-dessus, indiquent que les ions sodium peuvent emprunter un trajet apoplasmique direct depuis le milieu extérieur jusqu'au xylème à plusieurs niveaux de la racine, parce que d'une part la subérisation de l'endoderme n'est pas encore en place dans la zone racinaire juvénile, et d'autre part des fuites subsistent au niveau de l'émergence des racines secondaires, qui provoque une discontinuité momentanée de l'endoderme (Yeo et Flowers, 1986 ; Pitman, 1988). Les contributions relatives des voies apoplasmique et symplasmique du transport de Na^+ sont donc largement conditionnées par l'anatomie racinaire et susceptibles de varier selon l'espèce et la salinité du milieu. La voie apoplasmique (appelée aussi fuite apoplasmique) serait prédominante dans le transport de Na^+ en conditions salines.

Des travaux menés sur le riz ont montré qu'il existait une forte corrélation entre le transport du sodium et celui d'un traceur apoplasmique (PTS). Chez deux lignées de riz, une plus tolérante que l'autre au sel, une différence notable dans les proportions de la quantité de sodium et de PTS accumulées dans leurs parties aériennes a été observée (Yeo *et al.*, 1987; Yadav *et al.*, 1996). Ce phénomène résulterait du fait que l'entrée de Na^+ dans le riz se fait essentiellement par migration libre dans l'apoplasme jusqu'à la stèle, aux endroits où la barrière endoplasmique n'est pas fonctionnelle. Cette fuite apoplasmique se produirait aux points de branchement des racines latérales, aux apex des racines avant la différenciation complète du rhizoderme et de l'endoderme, et même dans les zones matures présentant un

endoderme différencié, à cause d'une perméabilité intrinsèque du squelette pariétal (Yeo *et al.*, 1999).

Il a été montré, chez le riz, que le contrôle de la fuite apoplasmique de Na^+ dans les racines est un déterminant critique de la tolérance à la salinité. L'ajout dans le milieu de culture de silicium sous forme de silicate de sodium, qui bloque partiellement la voie apoplasmique, améliore sensiblement la croissance et la photosynthèse du riz soumis à un stress salin, surtout chez la variété sensible GR4 Yeo *et al.* (1999). Cette amélioration est corrélée avec la réduction de la concentration de Na^+ dans les parties aériennes. Par ailleurs, les auteurs ont constaté que l'ajout de silicate de sodium dans le milieu de culture réduit l'accumulation de Na^+ dans les parties aériennes des variétés sensibles et tolérantes au même niveau (Yeo *et al.*, 1999).

L'importance de la voie apoplasmique dans le bilan global d'influx de Na^+ varie avec les espèces. Garcia *et al.* (1997) ont estimé que la contribution de la voie apoplasmique est dix fois plus importante chez le riz que chez le blé. D'ailleurs, il est important de souligner que les halophytes possèdent une anatomie des racines susceptible de limiter l'entrée de Na^+ via la voie apoplasmique. En effet, la bande Caspary chez les halophytes est 2-3 fois plus épaisse que chez les glycophytes, et la couche intérieure des cellules corticales chez les halophytes peut se différencier pour former le second endoderme (Tester et Davenport, 2003). Chez le cotonnier, considéré comme une plante tolérante à la salinité parmi les espèces cultivées, la salinité accélère également la formation de la bande Caspary et induit la formation d'une couche supplémentaire exodermique (Reinhardt et Rost, 1995) (figure I.2).

Tous ces constats montrent qu'il existe une corrélation entre la tolérance des plantes à la salinité et la capacité de contrôle de l'influx apoplasmique de Na^+ dans les racines. Il est donc possible d'imaginer que la réduction de la fuite apoplasmique chez les espèces sensibles comme le riz, constitue une stratégie pour augmenter la tolérance des plantes à la salinité. Dans cette perspective, il est important de noter que le blocage complet de la fuite apoplasmique n'est pas susceptible d'affecter considérablement l'influx d'eau et le prélèvement des ions nutritifs parce que cette fuite contribue peu (moins de 6% chez le riz) aux flux entrants dans les racines (Garcia *et al.*, 1997). D'une façon générale cependant, la contribution des voies apoplasmiques et symplasmiques à la circulation du sodium dans les plantes reste peu explorée dans la littérature. Certains auteurs ont estimé que le flux apoplasmique contribuait à l'alimentation du flux xylémien dans une proportion ne pouvant excéder 1 à 5% (Hanson *et al.*, 1985; Yeo *et al.*, 1987). Cela signifie en particulier, concernant K^+ , que le transport par voie symplasmique assure l'essentiel de la translocation de cet ion de la solution du sol aux vaisseaux xylémiens de la stèle.

I.3.1.3 Disponibilité de K^+ dans le sol et affinité du prélèvement

La concentration de K^+ dans la solution du sol est généralement comprise entre quelques dizaines de $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et quelques mmol.L^{-1} (*i.e* environ 10 à 10^3 fois plus faible que celle de la cellule). Les racines sont donc confrontées à une large gamme de concentrations et les plantes possèdent des systèmes de transport leur permettant de se développer sur des gammes de concentration de K^+ , allant de 10^{-6} à 10^{-1} mol.L^{-1} (Kochian *et al.*, 1988; Maathuis *et al.*, 1996).

Une augmentation de la capacité d'absorption de K^+ par la racine est observée lorsque la disponibilité de cet ion dans le milieu est limitante (Glass et Fernando, 1992). Chez le blé, la privation de K^+ augmente l'efficacité du transport à haute affinité, sans modifier les

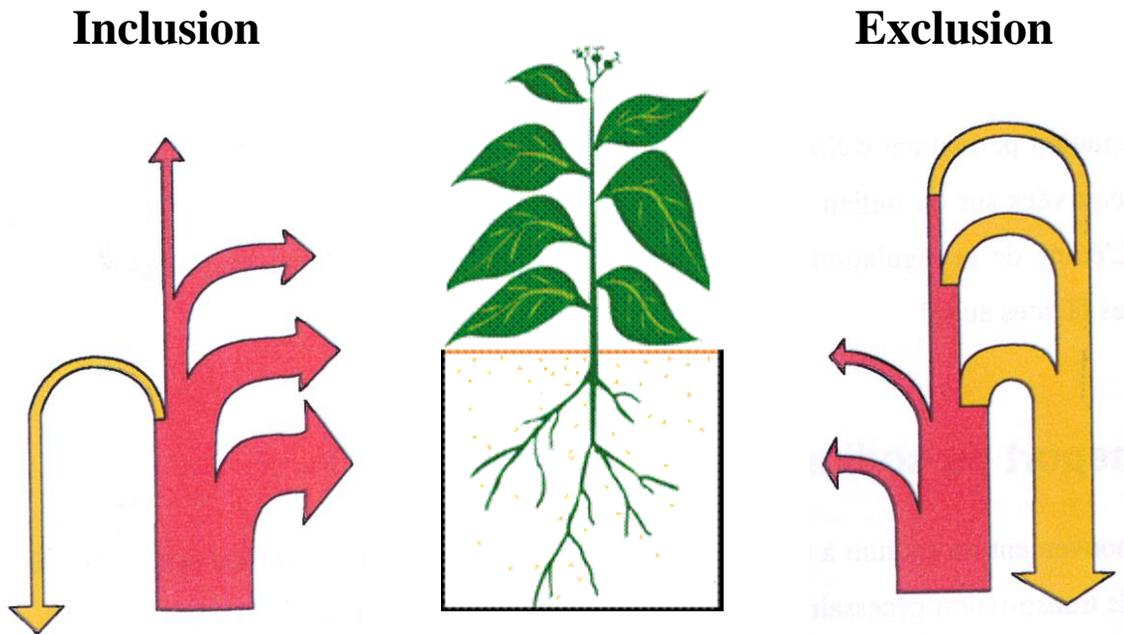


Figure I.3. Illustration des stratégies “Inclusion” et “Exclusion” (D’après Levigneron et *al.*, 1995).

La stratégie “Inclusion” caractérise le fait de favoriser le stockage du sodium dans les feuilles en préservant le méristème apical alors que la stratégie “Exclusion” caractérise le fait de favoriser la recirculation de Na⁺ vers les racines.

caractéristiques du transport à faible affinité (Kochian et Lucas, 1982, 1988). Ce type de réponse a été également observé chez l'orge et l'ivraie (Glass et Dunlop, 1978). Cette réaction n'est cependant pas générale, puisque la privation de potassium stimule les capacités de transport à basse affinité chez *Arabidopsis* (Maathuis et Sanders, 1995), et modifie les capacités de transport à haute et basse affinité chez le tournesol (Benlloch *et al.*, 1989).

Plusieurs phénomènes de nature différente pourraient être impliqués dans l'augmentation de la capacité d'absorption de la racine observée en réponse à la diminution de la disponibilité de K^+ dans le milieu. Un modèle initial permettant de rendre compte de cette réponse propose une régulation allostérique de la capacité d'absorption en fonction de la concentration cytosolique de K^+ , se traduisant par une inhibition par "feed-back" des transporteurs lorsque la disponibilité de cet ion dans le milieu est élevée, conduisant à une augmentation de sa concentration dans le cytoplasme (Glass, 1977). Dans le cadre de ce modèle, une diminution de la disponibilité de K^+ dans le milieu conduirait à une baisse de la concentration de K^+ dans le cytoplasme, ce qui lèverait l'inhibition allostérique du transport, provoquant ainsi une augmentation de la capacité d'absorption. Une autre hypothèse, non exclusive de la précédente, repose sur l'observation de modifications de l'équipement polypeptidique membranaire lorsque les plantes sont cultivées dans un milieu faiblement concentré en potassium, suggérant la mise en place de nouveaux systèmes de transport (chez l'orge, Fernando *et al.*, 1990), notamment de transporteurs à forte affinité (chez l'orge, Santa-Maria *et al.*, 1997; chez l'orge et le blé, Wang *et al.*, 1998; chez *Arabidopsis thaliana*, Kim *et al.*, 1998). Chez *Arabidopsis*, des études par la technique de patch clamp ont révélé que la privation de K^+ provoque une augmentation de l'activité de canaux de type IRK (systèmes de transport de K^+ à faible affinité). Cette augmentation pourrait traduire une augmentation de l'expression du ou des gène(s) correspondant(s), ou l'existence d'un mécanisme de régulation post-traductionnel (*e.g.*, par (dé)phosphorylation, Maathuis et Sanders, 1995). Cependant, la signification physiologique de la stimulation de l'activité de canaux, donc de systèmes de transport passif, en réponse à une diminution de la concentration de K^+ dans le milieu n'est pas claire, même s'il est possible que des canaux puissent participer à la fonction d'absorption à partir d'une concentration externe en K^+ relativement faible. Des potentiels de membrane ont effectivement été trouvés suffisamment négatifs pour pouvoir impliquer des canaux dans l'influx de potassium à partir d'une solution extérieure dont la concentration en K^+ est inférieure à 10 μ M (Hirsh *et al.*, 1998).

I.3.2 Transports à longue distance dans le xylème et dans le phloème

I.3.2.1 Mouvements dans le xylème

La teneur en Na^+ des racines apparaît comme relativement constante durant le stress salin. Cet état stationnaire résulte probablement en partie de la capacité des cellules racinaires à ré-excréter Na^+ dans le milieu extérieur. Il résulte aussi de la translocation de Na^+ dans la stèle et les vaisseaux du xylème, vers les parties aériennes. Les teneurs en sodium du xylème et du phloème peuvent varier au cours de la circulation de la sève de la plante. Un accroissement de la concentration de Na^+ dans la sève xylémienne a été décrit chez une plante de type "includer" (définition: *Cf.* ci-dessous) (figure I.3), *Plantago maitima* (Lacan et Durand, 1996). A l'opposé une diminution de la concentration en Na^+ de la sève xylémienne a été mise en évidence chez des plantes de type "Excluser" (figure I.3): le sodium contenu dans le xylème est réabsorbé au niveau des racines au cours de l'ascension de la sève, et ré-excrété vers le milieu extérieur (Lauchli, 1976; Lacan et Durand, 1995). La quantité de sodium qui

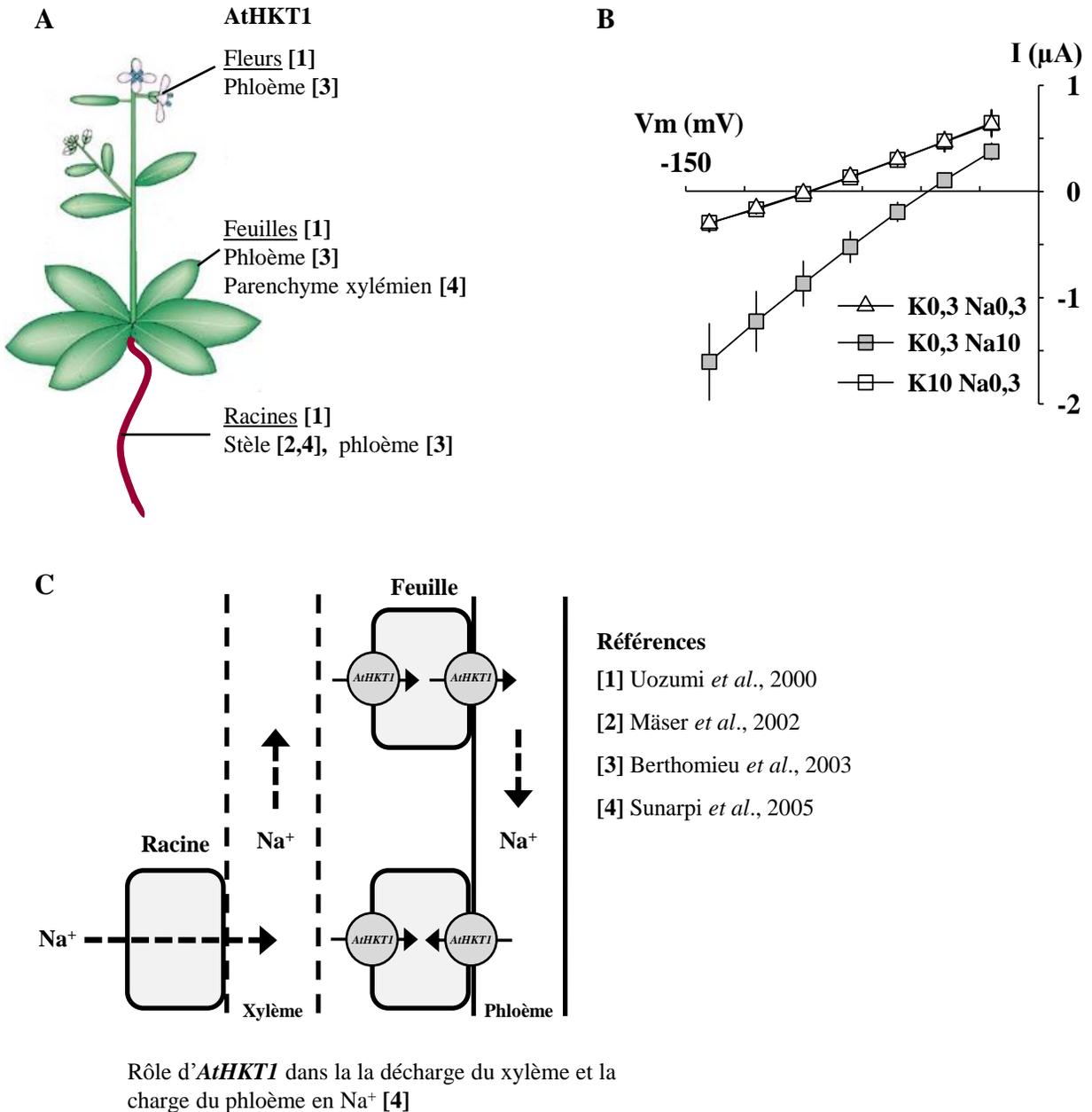


Figure I.4. Rôle d'*AtHKT1* dans le transport de Na⁺ à longue distance.

A. Localisation de l'expression d'*AtHKT1* dans la plante. **B.** Relations courant-voltage (I-V) enregistrées sur des ovocytes de xénope exprimant *AtHKT1*, montrant qu'*AtHKT1* est un transporteur perméable à Na⁺ et non à K⁺. **C.** Schéma proposant un rôle pour *AtHKT1* dans la décharge du xylème et la charge du phloème en Na⁺ (d'après Sunarpi *et al.*, 2005). La plante protège sa capacité de photosynthèse, en limitant la teneur en Na⁺ au niveau de ses parties aériennes. *AtHKT1* pourrait être impliqué à la fois dans le dessalage de la sève xylémienne et dans la réexportation de Na⁺ des feuilles vers les racines par le flux de sève xylémienne.

parvient aux feuilles via la sève xylémienne peut donc être contrôlée lors du transport dans les vaisseaux du xylème.

Nos connaissances sur les mécanismes du transport de Na^+ dans le xylème sont encore malheureusement assez réduites. Cependant, chez *Arabidopsis* en condition de stress salin modéré (NaCl 25 mM), les mutants *sos1* (ayant perdu un système d'antiport H^+/Na^+) accumulent moins de Na^+ dans les parties aériennes que les plantes contrôles de génotype sauvage (Shi *et al.*, 2002). Cela suggère que *SOS1* joue un rôle dans le transport de Na^+ à partir des racines vers les parties aériennes. Or, l'utilisation d'un gène rapporteur révèle que dans les racines, *SOS1* est exprimé préférentiellement dans les cellules parenchymateuses, autour des vaisseaux du xylème (Shi *et al.*, 2002). Dans leur ensemble, ces données suggèrent donc que *SOS1* est impliqué dans la sécrétion de Na^+ dans la sève xylémienne à partir de cellules parenchymateuses de la stèle, en conditions de stress salin modéré.

Chez certaines plantes, on peut observer une réduction de l'accumulation de Na^+ dans les parties aériennes. Cette réduction serait expliquée par le retrait du sodium du xylème avant qu'il n'atteigne le système foliaire. L'existence de cette stratégie chez les plantes a été démontrée par les travaux de Wolf *et al.* (1991). Les auteurs ont mis en évidence que chez l'orge, la concentration en Na^+ de la sève du xylème varie avec la hauteur de la tige. Elle est de 10 mM à la base de la tige et seulement de 2 mM à la 8^{ème} feuille. Cette différence de concentration est particulièrement importante pour maintenir l'activité photosynthétique des jeunes feuilles, ce qui permet en retour la formation et la croissance de nouvelles feuilles. Les mécanismes moléculaires du retrait du Na^+ à partir de la sève du xylème ("désalage" de la sève xylémienne) commencent à être documentés. En particulier, des analyses génétiques ont révélé que deux transporteurs de la famille HKT, AtHKT1 chez *Arabidopsis* (figure I.4) et OsHKT8 chez le riz (figure I.11) sont impliqués dans ce processus de désalage.

La majorité des plantes étant capables de maintenir un rapport K^+/Na^+ élevé dans les parties aériennes, il semble qu'une sélectivité en faveur de K^+ soit assurée lors de la sécrétion. Les ions sont excrétés dans les faisceaux du xylème par l'intermédiaire des cellules de transfert du xylème qui peuvent favoriser, ou retarder, l'efflux de Na^+ dans ce vaisseau. Le contrôle de la concentration de Na^+ dans le xylème peut être réalisé, également, tout au long de la tige par une réabsorption du sodium en échange de potassium dans la sève brute par les cellules du parenchyme (Kramer *et al.*, 1983). Des H^+ -ATPases plasmalemmiques assureraient l'énergisation des différents transports aboutissant à échanger Na^+ contre K^+ . Le gradient de H^+ créé par ces pompes permettrait la sécrétion de K^+ via un antiport H^+/K^+ , et un uniport Na^+ assurerait la réabsorption du sodium (figure I.5).

Concernant le potassium, les ions absorbés au niveau de la membrane plasmique des cellules superficielles de la racine (épidermiques et corticales) sont transportés vers les tissus de la stèle par diffusion d'une cellule à l'autre à travers les plasmodesmes (trajet symplasmique). Après migration au delà de la barrière endodermique, les ions sortent du symplasma en traversant une seconde membrane plasmique, au niveau des dernières cellules vivantes qui bordent les vaisseaux (parenchyme xylémien). Une fois dans l'apoplasme stélaire, les ions sont entraînés par le flux centripète d'eau vers les vaisseaux. Le flux de convection de la sève brute (eau et éléments minéraux) entraîné par la transpiration et/ou la poussée racinaire, les exporte ensuite vers les parties aériennes (Smith *et al.*, 1991; Zimmermann *et al.*, 1994 ; Tanner et Beevers, 1998).

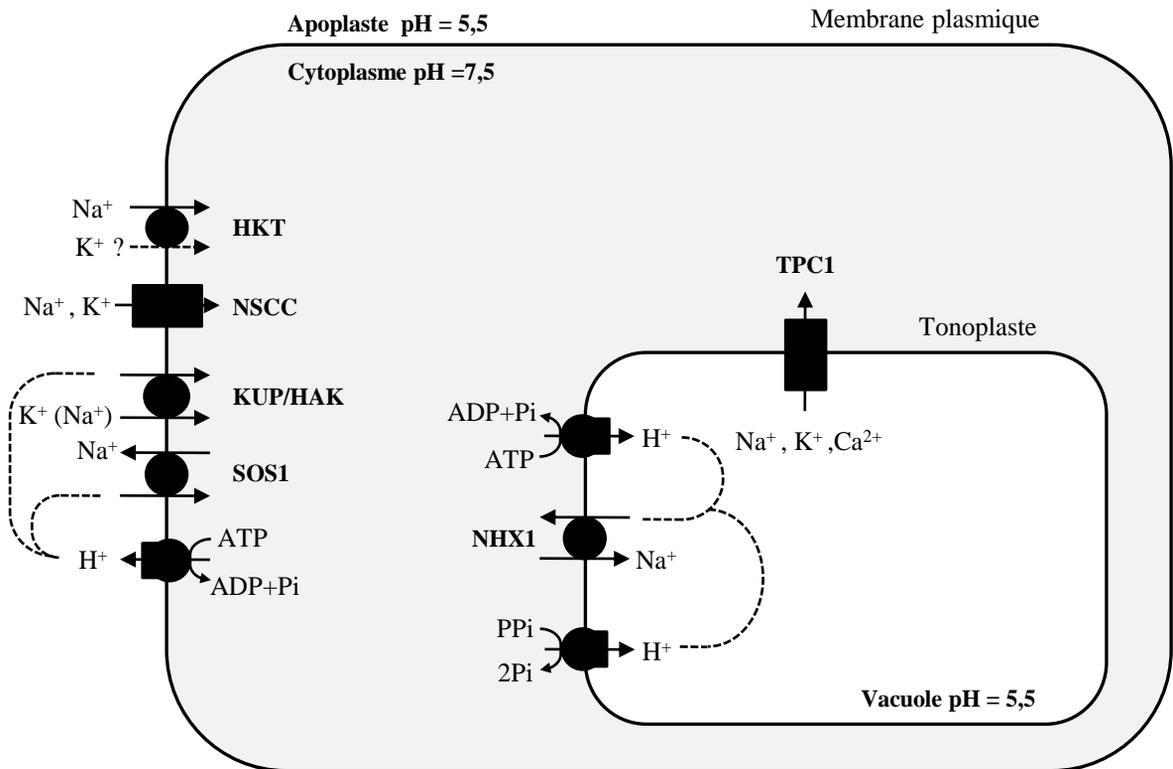


Figure I.5. Transport du sodium au niveau cellulaire.

Représentation schématique des systèmes de transport impliqués dans le transport de Na^+ chez les végétaux à travers la membrane plasmique ou le tonoplaste. Des systèmes de transports primaires constitués d'ATPases pompes à protons sur le plasmalemme et le tonoplaste et d'une pyrophosphatase sur le tonoplaste créent un gradient de pH et une différence de potentiel électrique de part et d'autre des deux membranes (face cytosolique plus alcaline et chargée plus négativement). Les gradients de concentration de protons permettent l'excrétion de Na^+ du cytoplasme vers le milieu extérieur ou la vacuole *via* le fonctionnement d'antiports Na^+/H^+ (appelés SOS1 sur le plasmalemme, ou NHX1 sur la vacuole). Les gradients de potentiel électrique créés par les pompes provoquent l'entrée de Na^+ dans le cytoplasme de la cellule depuis le milieu extérieur ou la vacuole *via* des canaux cationiques non sélectifs (NSCC) (CNGC sur la membrane plasmique? TPC1 sur le tonoplaste) ou éventuellement des transporteurs de type HKT chez certaines espèces. A forte concentration externe, Na^+ pourrait également entrer dans la cellule en empruntant des transporteurs de K^+ de type KUP/HAK.

La position interne des cellules du parenchyme xylémien dans la racine a rendu difficiles les analyses électrophysiologiques utilisant des microélectrodes. De ce fait les mécanismes de sécrétion des ions dans le xylème ont été moins étudiés que les mécanismes impliqués dans l'absorption. Il a longtemps été admis que les tissus de la stèle ne sont pas capables d'accumuler les ions et que ceux-ci, pompés à l'entrée du symplasme, diffusent passivement jusqu'aux vaisseaux. On pensait que cette diffusion passive était la conséquence d'un déficit d'oxygène dans les tissus centraux de la racine qui avait pour conséquence une dépolarisation des cellules (Crafts et Boyer, 1938). Les cellules de la stèle en hypoxie étaient alors incapables de retenir les ions. Cependant Bowling (1973) a montré que l'aération des tissus centraux de la racine permet une oxygénation suffisante des cellules. Le modèle de Craft et Boyer (1938) a également été contredit par les travaux de Pitman (1972) sur la racine d'orge. Le CCCP bloque instantanément l'efflux dans le xylème du $^{36}\text{Cl}^-$ préalablement accumulé mais pas l'efflux vers le milieu à travers l'épiderme. Ces résultats montrent que le CCCP touche le système présent au niveau de la stèle et pas celui situé dans les cellules de l'épiderme. Depuis les années 70, il est clairement établi que l'efflux des ions dans l'apoplasme stélaire est dépendant de transporteurs spécifiques situés sur le plasmalemme des cellules du parenchyme xylémien. Plusieurs données expérimentales indiquent que l'absorption et la sécrétion sont contrôlées séparément.

D'une façon générale, la sécrétion des ions nutritifs dans l'apoplasme stélaire pourrait être dans bien des cas un phénomène passif, catalysé par des canaux. Par exemple, chez *Arabidopsis*, le canal potassique SKOR de la famille Shaker joue un rôle important dans la sécrétion de K^+ dans la sève xylémienne (Gaymard *et al.*, 1998). Les connaissances au niveau moléculaire sur les mécanismes de sécrétion des ions nutritifs dans la sève xylémienne sont cependant encore assez réduites.

I.3.2.2 Transport dans le phloème

La croissance et le développement de la plante nécessite une distribution des produits de la photosynthèse. Ces molécules synthétisées dans les organes dits "sources" (feuilles matures) doivent ensuite être relocalisées vers les organes en croissance et les tissus non photosynthétiques de la plante (organes dits "puits", jeunes feuilles, fleurs, graines, fruits, racines). Cette relocalisation nécessite un transport sélectif à longue distance, qui est assuré par le système phloémien.

Des données obtenues chez l'orge montrent que les teneurs en sodium des sèves xylémiennes et phloémiennes sont modifiées tout au long du transport dans les vaisseaux des parties aériennes (Wolf *et al.*, 1990, 1991). Le sodium xylémien serait absorbé et stocké dans les cellules de la feuille au cours de son parcours, et il y aurait de plus une translocation d'une partie du sodium du xylème vers le phloème dans la feuille, si bien que la sève phloémienne voit sa concentration en sodium augmenter lors de son parcours du sommet de la feuille vers sa base. L'anatomie foliaire, en particulier dans la zone des veines mineures, suggère qu'un tel transfert pourrait avoir lieu soit directement de l'apoplasme au symplasme des cellules du phloème, soit par un transport symplasmique à partir des cellules du parenchyme (Salisbury et Ross, 1992). Cette recirculation des ions du xylème vers le phloème permet ainsi de réduire significativement la teneur en sel des feuilles. Cela a été aussi observé chez quelques espèces tels que le lupin (Munns *et al.*, 1988), le poivrier (Blom-Zandstra *et al.*, 1998) et le maïs (Lohaus *et al.*, 2000).

Récemment, Perez-Alfocea *et al.* (2000) ont constaté que la retranslocation de Na^+ dans le phloème chez *Lycopersicon pennellii*, une espèce de tomate sauvage et tolérante à la salinité, est plus importante que celle observée chez la tomate domestiquée. Cela suggère que la retranslocation de Na^+ dans le phloème serait une stratégie d'adaptation chez les végétaux. Cependant, la direction de la retranslocation de Na^+ et les conditions dans lesquelles elle se produit sont probablement critiques. En effet, il semble crucial que la retranslocation par le phloème n'envoie pas Na^+ vers les tissus juvéniles, sinon cela inhiberait complètement leur croissance. Autrement dit, la retranslocation par le phloème devrait rediriger Na^+ essentiellement vers les racines. Chez le poivrier, il a été montré que la retranslocation de $^{22}\text{Na}^+$ des parties aériennes aux racines ne se produit que quand Na^+ est retiré de la solution nutritive, *i.e* quand il existe un gradient favorable entre phloème et racines (Blom-Zandstra *et al.*, 1998). Chez *Arabidopsis*, il a été montré que le transporteur de sodium AtHKT1, exprimé dans les tissus phloémiens, assure une re-circulation de Na^+ des feuilles vers les racines par le phloème en soustrayant Na^+ du courant ascendant de sève brute au niveau des parties aériennes. Ce système joue, ainsi, un rôle dans le contrôle de l'accumulation de Na^+ dans les feuilles et la résistance de la plante au stress salin (figure I.4) (Berthomieu *et al.*, 2003).

Concernant le potassium, la charge et la décharge du phloème contribue à l'établissement des gradients de potentiels osmotiques (et donc hydriques) créés entre les organes sources (forte concentration en sucres et en ions dans la sève phloémienne) et les organes puits (plus faibles concentrations). Le gradient osmotique est initialisé au niveau des organes sources par la création d'un potentiel électrochimique dû à l'activité des H^+ -ATPases des cellules compagnes qui sont en contact électrique direct avec les cellules des tubes criblés (formant les vaisseaux du phloème) via des plasmodesmes. Cette énergisation de la membrane permet l'influx de sucres (essentiellement de saccharose) et de potassium dans les cellules. En résumé, les données disponibles indiquent que le contrôle du transport de K^+ dans les tissus phloémiens des organes sources et puits contribue à 3 fonctions essentielles: (i) la régulation du potentiel de membrane des cellules phloémienne, tendant à rapprocher sa valeur de celle du potentiel d'équilibre de K^+ (E_K), (ii) l'installation du gradient osmotique responsable du flux de sève entre les organes sources et puits, et (iii) l'alimentation des organes puits (notamment les graines et les fruits) en potassium.

La caractérisation électrophysiologique des conductances potassiques des cellules phloémiennes est encore peu avancée à cause de la difficulté d'obtention de protoplastes. Cette difficulté est moindre avec les racines de maïs dont la stèle est facile à séparer du cortex. Des cellules phloémiennes peuvent ensuite être obtenues par dissection. Sur ce matériel, des conductances potassiques ont été identifiées. Elles sont proches des IRKs au niveau de leur sélectivité et de leurs réponses aux inhibiteurs, mais elles présentent une faible rectification, c'est à dire qu'elles permettent une entrée ou une sortie de potassium selon la valeur du potentiel de membrane. Chez *Arabidopsis*, le gène AKT2 de la famille de canaux potassiques Shaker pourrait coder ce type de conductance (Lacombe *et al.*, 2000; Ivashikina *et al.*, 2003; Deeken *et al.*, 2000, 2002).

Chez *Arabidopsis thaliana*, l'utilisation de plantes exprimant le gène de la GFP sous le contrôle du promoteur du gène *AtSUC2* (actif spécifiquement dans les cellules compagnes phloémiennes), a permis d'isoler des protoplastes de ces cellules et d'identifier deux conductances potassiques: une conductance sortante de type ORK et une conductance entrante de type IRK. Cependant, des conductances qui seraient éventuellement spécifiques aux cellules situées soit dans les régions sources soit dans les régions puits n'ont pas pu encore être mises en évidence.

I.3.3 Compartimentation subcellulaire et accumulation sélective de Na⁺

Deux stratégies contribuent à limiter l'accumulation toxique de Na⁺ dans le cytosol: d'une part, limiter son entrée et, d'autre part, détoxifier le cytoplasme par ré-excrétion vers le milieu extérieur ou par compartimentation dans la vacuole.

La vacuole est le compartiment cellulaire le plus volumineux et permet un stockage massif de Na⁺, sans dommage pour le fonctionnement du reste de la cellule. Lorsque la capacité d'accumulation (vitesse et/ou quantité) de la vacuole est saturée, les ions Na⁺ qui continuent à parvenir aux parties aériennes s'accumulent soit dans le cytoplasme, soit dans les parois cellulaires (Munns, 1993). Ces deux compartiments de faible volume sont alors rapidement saturés. La saturation des parois par un excès d'ions provoque un déséquilibre hydrique qui se traduit par une perte brutale en eau des cellules qui se déshydratent et meurent. La saturation du cytoplasme inhibe le métabolisme ce qui ralentit la croissance et provoque aussi la mort des cellules. Le stockage dans la vacuole apparaît donc comme le seul véritable recours des cellules envahies par le sel et la stratégie la plus efficace pour éviter la toxicité de Na⁺ sur des sites métaboliques dans le cytoplasme. L'accumulation de Na⁺ dans la vacuole réduit également la teneur de Na⁺ dans le xylème et par conséquent minimise les effets du stress osmotique.

L'influx de Na⁺ dans la vacuole se fait par le biais des échangeurs vacuolaires Na⁺/H⁺ et le gradient de H⁺ généré par des protéines H⁺-ATPase et H⁺-PPase (pyrophosphatase) (Blumwald *et al.*, 2000) (figure I.5). Chez l'orge, la tomate, la tulipe, l'activité des échangeurs vacuolaires Na⁺/H⁺ dans les racines augmente lors de l'ajout de Na⁺ dans le milieu (Gabarino et Dupont, 1989; Wilson et Shannon, 1995; Ballesteros *et al.*, 1997). En outre, l'augmentation de l'activité de l'échangeur vacuolaire Na⁺/H⁺ dans les racines durant le stress salin est plus forte chez l'espèce tolérante *Plantago maritima* que chez l'espèce sensible *P. media* (Staal *et al.*, 1991). Ces résultats révèlent donc une implication de ce type d'échangeur dans l'adaptation des plantes à la salinité. Chez *Arabidopsis*, parmi six gènes codant des échangeurs vacuolaires Na⁺/H⁺, *AtNHX1*, *AtNHX2* et *AtNHX5* sont induits dans les conditions de stress salin (Yokoi *et al.*, 2002). La salinité induit également l'activité des pompes à protons H⁺-ATPase et H⁺-PPase chez les espèces tolérantes ainsi que les espèces sensibles (Hasegawa *et al.*, 2000; Maeshima, 2000). De plus, la surexpression constitutive d'un transporteur tonoplastique de Na⁺, *AtNHX1*, améliore l'efficacité de stockage de Na⁺ dans la vacuole et d'augmente fortement la tolérance à la salinité de la plante, chez *Arabidopsis* (Apse *et al.*, 1999), la tomate (Zhang et Blumwald, 2001) et *Brassica napus* (Zhang *et al.*, 2001). La surexpression du gène *AVP1* codant une H⁺-PPase vacuolaire chez *Arabidopsis* a également amélioré la tolérance des plantes à la salinité (Gaxiola *et al.*, 2001). Récemment, Fukuda *et al.* (2004) ont précisé le rôle d'un échangeur vacuolaire Na⁺/H⁺, appelé *OsNHX1*, chez le riz. L'expression d'*OsNHX1* est induite dans les racines et dans les parties aériennes durant le stress salin sévère. Les auteurs ont constaté que la surexpression de ce gène améliore la tolérance à la salinité des cellules et des plantes transgéniques. L'ensemble de ces résultats démontrent donc clairement que la compartimentation de Na⁺ dans la vacuole est essentielle pour la tolérance des plantes à la salinité.

En plus de la compartimentation à l'échelle cellulaire, par stockage dans la vacuole, des mécanismes de contrôle et compartimentation à une échelle plus large contribuent également à limiter aussi l'accès de Na⁺ aux cellules photosynthétiques.

Des études menées sur l'orge ont montré que Na⁺ s'accumule préférentiellement au niveau de l'épiderme des feuilles (Fricke *et al.*, 1996; Karley *et al.*, 2000). Cette compartimentation à l'échelle tissulaire serait due à l'activité de canaux cationiques non

sélectifs à la membrane des cellules épidermiques. Ce processus permet de stocker Na^+ dans les cellules épidermiques, qui présentent de grandes vacuoles, au lieu de le stocker dans les cellules du mésophylle chargées, elles, de l'activité photosynthétique. L'évitement de l'accumulation de Na^+ dans les tissus juvéniles en pleine croissance est considéré aussi comme une stratégie d'adaptation à la salinité chez plusieurs plantes, dont le riz (Yeo et Flowers, 1982). Les cellules de ces tissus possèdent souvent de petites vacuoles qui sont inadaptées pour une compartimentation massive des ions. De plus, les processus métaboliques dans ces cellules, par exemple la synthèse des protéines, sont particulièrement sensibles à la présence de Na^+ . Dans ce contexte, il est intéressant d'observer que les tissus juvéniles présentent généralement une faible concentration en Na^+ . Ceci peut être expliqué par une faible vitesse de transpiration des jeunes feuilles, et une durée d'existence au stade juvénile relativement court. Cependant, ce phénomène serait lié, au moins chez quelques espèces, à l'accumulation préférentielle de Na^+ dans des tissus aériens spécifiques, en particulier dans les vieilles feuilles. Cette accumulation préférentielle impliquerait un déplacement de Na^+ via le phloème ou via le xylème vers les tissus "cibles". Par ailleurs, il a été montré qu'il existe une sélectivité de mouvement des solutés dans le phloème (Tester et Davenport, 2003). Chez le soja, le traceur ^{32}P (^{32}Pi) peut circuler librement à travers des tissus juvéniles alors que $^{22}\text{Na}^+$ ne pénètre pas dans les parties jeunes des racines et des feuilles. Cela démontre que Na^+ est sélectivement "retiré" des flux de sève avant qu'il n'atteigne les tissus juvéniles de la plante.

Chez le riz, Na^+ est accumulé surtout dans les gaines foliaires (Yeo et Flowers, 1982 ; Asch *et al.*, 1997). Ce processus permet de baisser la teneur de Na^+ dans les limbes foliaires sous le seuil critique pour maintenir l'activité photosynthétique. Dans les vieilles feuilles, le limbe lui-même peut participer à compartimenter Na^+ et à limiter ainsi le transfert de cet ion vers les organes juvéniles (Yeo et Flowers, 1982). En comparant le comportement de trois variétés contrastées au niveau de la tolérance à la salinité, Yeo et Flowers (1982) ont mis en évidence que la stratégie d'accumulation préférentielle de Na^+ dans les vieilles feuilles est particulièrement utilisée chez les variétés tolérantes Pokkali et IR4630. La variété sensible IR28 est incapable de maintenir la teneur en Na^+ des jeunes feuilles sous le seuil de 1 mmol/g de matières sèches. Cette corrélation entre la tolérance et la capacité de maintenir une faible teneur en Na^+ dans les jeunes feuilles suggère que l'accumulation préférentielle de Na^+ dans les feuilles les plus âgées serait une stratégie d'adaptation importante chez le riz. Cependant, cette étude n'a pas abordé la question de l'influence de la transpiration dans le processus de compartimentation par les feuilles âgées. Par conséquent, on ne sait pas si ce processus implique uniquement une régulation différentielle de la transpiration ou également une sélectivité d'accumulation de Na^+ dans les vieilles feuilles. Toutefois, des données suggèrent que la transpiration ne peut pas expliquer la différence d'accumulation de Na^+ entre les variétés du riz (Asch *et al.*, 1999). Les panicules des variétés sensibles à la salinité accumulent Na^+ même avant que la transpiration des panicules ne débute. Tous ces résultats montrent que chez le riz, la stratégie d'accumulation préférentielle de Na^+ dans les gaines foliaires et les vieux limbes est importante pour l'adaptation de cette plante à la salinité. Grâce à cette stratégie, les variétés tolérantes de riz peuvent maintenir les activités photosynthétiques dans les feuilles les plus récentes ainsi que l'initiation et la croissance de nouvelles feuilles pour compenser les vieilles feuilles mortes à cause de l'excès de Na^+ . La maintenance de la croissance exerce aussi un effet "dilution" pour réduire la teneur de Na^+ dans les tissus juvéniles.

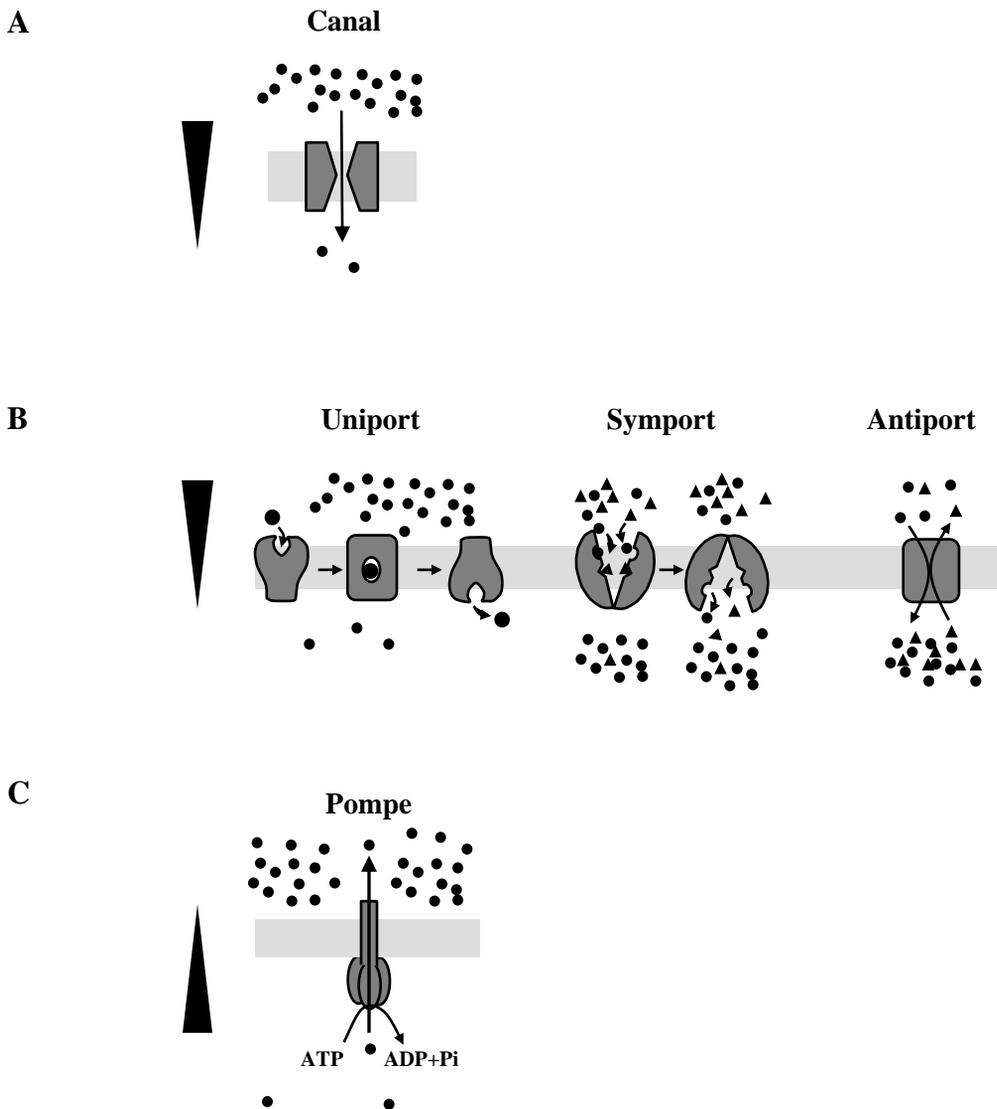


Figure I.6. Les différents systèmes de transport: classification thermodynamique et mécanistique.

Présentation schématique des trois types de systèmes de transport: **A.** Les canaux, systèmes de transport passifs où l'ion est transporté dans le sens de la dissipation de son gradient de potentiel électrochimique ("sens de son gradient"). Les canaux peuvent être activés par différents stimuli comme une modification du potentiel de membrane, la fixation d'un ligand, ou la variation de la tension membranaire. **B.** Les transporteurs. Il en existe 2 grands types: les uniports permettant le transport d'un ion dans le sens de son gradient de potentiel électrochimique, et les co-transporteurs qui peuvent assurer le transfert d'un ion (ronds) contre son gradient, grâce à un apport d'énergie fournie par le co-transport d'un autre ion dans le sens de son gradient (triangles). Parmi les co-transporteurs, le symport permet le transfert des deux espèces ioniques dans la même direction et l'antiport permet le transfert des deux espèces ioniques dans des directions opposées. **C.** Les pompes ioniques. Elles permettent le transport actif des ions (contre leur gradient de potentiel électrochimique). Ce type de transport nécessite de l'énergie, qui est fournie par la rupture d'une liaison covalente comme, par exemple ici, l'hydrolyse de l'ATP.

I.3.4 “Exclusion et inclusion”: stratégies d’adaptation à Na⁺

La capacité d’une plante à compartimenter Na⁺ au niveau cellulaire entraîne une différence de gestion du Na⁺ au niveau de la plante entière. On peut distinguer deux comportements des plantes vis-à-vis du sel, les comportements dits “inclure” et “exclure” (figure I.3). Ces stratégies caractérisent des comportements types mais qui ne s’excluent pas mutuellement. Les plantes “exclure” sont généralement sensibles à la salinité et sont incapables de contrôler le niveau de Na⁺ cytoplasmique. Cet ion est transporté dans le xylème, véhiculé vers les feuilles par le courant de transpiration, puis en partie “re-circulé” par le phloème pour être ramené vers les racines. Ces espèces sensibles contiennent donc peu de Na⁺ dans les feuilles et un excès dans les racines. Au contraire, les plantes “inclure” résistantes au NaCl, accumulent le Na⁺ dans les feuilles où il est séquestré (dans la vacuole, l’épiderme foliaire, les limbes âgés...). Il faut noter cependant que les plantes de type “exclure” accumulent également le Na⁺ dans la vacuole des cellules racinaires et de la tige. Bien entendu ces deux types de comportements sont extrêmes, et une espèce donnée peut intégrer des comportements caractéristiques de l’un et de l’autre des deux types de stratégie “inclure” et “exclure”.

I.4 Les systèmes de transport membranaires: définitions

Les systèmes de transport membranaires sont des protéines intrinsèques de la membrane lipidique qui permettent le passage des métabolites. La bicouche lipidique est imperméable aux molécules hydrophiles. Cela permet à la cellule de conserver son contenu, ses gradients ioniques et ainsi son “identité” par rapport à l’extérieur. Les systèmes de transport membranaire assurent et contrôlent, dans ce contexte, les échanges de solutés avec le milieu extérieur.

Les progrès de la biologie moléculaire, de la biochimie et de la biophysique ont permis de s’intéresser directement aux mécanismes de fonctionnement des systèmes de transport et à leur relation structure-fonction. Dans ce cadre, il est commode de définir, de façon simplifiée, trois types de systèmes de transport: les pompes ioniques, les canaux et les transporteurs (figure I.6).

Une **pompe ionique** est définie comme un système de transport dont le fonctionnement implique l’hydrolyse, à chaque cycle de transport, d’une liaison covalente (appartenant à une molécule riche en énergie, ATP par exemple).

Les canaux et les transporteurs sont des systèmes dépourvus d’activité d’hydrolyse. La distinction entre transporteur et canal est la suivante.

Un **transporteur** est un système qui passe par un changement conformationnel à chaque fois qu’il transporte un substrat (ou co-transporte deux substrats). La protéine fixe son substrat sur une face de la membrane et, par un changement conformationnel, l’emmène sur l’autre face où elle le libère.

Un **canal** est un système qui passe d’un état inactif (fermé) à un état actif (ouvert) par un changement conformationnel, conduisant à l’ouverture d’un pore aqueux en son sein. Un autre changement conformationnel le fait ensuite passer de l’état ouvert à l’état fermé. Cependant, lorsqu’il est ouvert, les ions (auxquels le canal est perméable) migrent dans le pore aqueux, d’un côté à l’autre de la membrane, sans qu’il n’y ait de changement conformationnel à chaque

fois qu'un ion traverse la membrane. Il en résulte que la vitesse de transport d'un ion dans un canal peut être très élevée (de l'ordre de 10^7 ions transportés par seconde), au moins 1000 fois plus grande que dans le cas d'un transporteur.

Les évènements qui déclenchent l'ouverture ou la fermeture du pore du canal sont de divers type, par exemple une variation du potentiel électrique de part et d'autre de la membrane ou la fixation d'un ligand. Il faut savoir cependant que la distinction entre transporteur et canal n'est pas aussi tranchée qu'elle n'apparaît dans les définitions ci-dessus. En effet, certains systèmes de transport peuvent fonctionner à la fois selon des mécanismes de type canal ou de type transporteur, en fonction des conditions ioniques.

Les pompes constituent des systèmes de transport *actif*: elles transportent leur substrat contre son gradient de potentiel électrochimique. Parmi les pompes les plus connues, chez les animaux, figure la pompe Na^+/K^+ (ou Na^+/K^+ ATPase) qui expulse trois ions sodium et fait entrer deux ions potassium pour chaque molécule d'ATP hydrolysée. Cette pompe est très importante dans la cellule animale car elle assure la création et le maintien du gradient électrochimique membranaire et est indirectement à l'origine de la plupart des mouvements transmembranaire. Si cette pompe s'arrête, le gradient électrochimique disparaît et les mouvements ioniques s'arrêtent de part et d'autre de la membrane plasmique. Il est important de noter qu'aucune ATPase Na^+/K^+ n'a été identifiée à ce jour chez les plantes, ni par des approches biochimiques ni par analyse *in silico* des génomes séquencés. La cellule végétale énergise la membrane plasmique grâce à des ATPases pompes à protons. Ces pompes hydrolysent l'ATP pour énergiser le transport de protons H^+ du cytosol vers le milieu extérieur. Elles créent ainsi à la fois une différence de potentiel électrique et une différence de pH de part et d'autre de la membrane, et donc une différence de potentiel électrochimique de H^+ . C'est cette différence, appelée gradient de potentiel électrochimique transmembranaire de H^+ , qui énergise les flux à travers les canaux et transporteurs.

Les canaux assurent un transport *passif* de molécules à travers la membrane. Le passage des solutés à travers un canal obéit strictement aux lois de la diffusion.

Les transporteurs assurent le transport passif (*uniport*) ou actif (*symport* ou *antiport*) des solutés. Dans ce dernier cas, l'énergie nécessaire est fournie par le gradient électrochimique de l'espèce co-transportée, qui suit son gradient électrochimique. Ce phénomène nécessite donc la création préalable et le maintien du gradient électrochimique de l'espèce co-transportée (en général H^+ chez les plantes et Na^+ chez les animaux) par des pompes. Selon le sens de déplacement respectif des deux substrats transportés, on parle de *symport* (les deux espèces transportées traversent la membrane dans le même sens) ou d'*antiport* (les deux espèces se déplacent en sens inverse). Ce type de transport actif couplé est aussi appelé "transport actif secondaire".

I.5 Systèmes de transports de K^+ et Na^+ chez les plantes

Les caractéristiques cinétiques des systèmes de transport de K^+ ont été étudiées à partir de la fin des années 50, à l'aide des traceurs $^{42}\text{K}^+$ et $^{86}\text{Rb}^+$, en particulier par Epstein et ses collaborateurs. L'analyse de la vitesse d'incorporation du traceur dans les racines d'orge excisées, en fonction de la concentration externe, fait apparaître une cinétique complexe qui présente deux phases (Epstein, 1963). Cette cinétique, qui peut s'analyser selon le formalisme de Michaelis-Menten, suggère l'existence de deux mécanismes d'absorption. Le premier mécanisme correspondrait à un système saturable à haute affinité (K_m de l'ordre de $20 \mu\text{M}$),

qui permettrait l'influx de K^+ à partir de concentrations faibles dans le milieu (inférieur à 1 mM). Le deuxième mécanisme correspondrait à un système à faible affinité (K_m de l'ordre de 10 mM), qui serait responsable de l'absorption des ions à partir de fortes concentrations. Le deuxième mécanisme d'absorption se différencie du premier par le fait qu'il est peu sélectif de K^+ (vis-à-vis de Na^+), et que sa capacité à transporter K^+ dépend de la nature de l'anion d'accompagnement (Epstein, 1966; Rains et Epstein, 1967). Les données électrophysiologiques obtenues sur racines suggèrent que des symports H^+-K^+ sont responsables du transport de K^+ à haute affinité (Maathuis et Sanders, 1996). L'absorption à faible affinité est passive et fait intervenir des canaux.

Pour le sodium, il est désormais établi que son entrée initiale à partir du milieu extérieur dans le cytoplasme des cellules corticales des racines est passive (Cheeseman, 1982) et se fait, soit via des canaux cationiques non sélectifs voltage dépendent (NSCCs) (Amtmann et Sanders, 1999; Tester et Davenport, 2003) soit, probablement, via certains membres de familles de transporteurs de sodium (Haro *et al.*, 2005; Laurie *et al.*, 2002) (figure I.7). Plusieurs familles de canaux et de transporteurs impliqués dans le transport de K^+ et Na^+ ont été identifiés au niveau moléculaire chez les végétaux (Mäser *et al.*, 2001).

I.5.1 Les canaux

Les canaux Shakers. Ces canaux existent chez les végétaux, les champignons, les bactéries et chez les animaux. C'est d'ailleurs chez ces derniers que les premiers membres de cette famille ont été identifiés.

Ces canaux sont formés de quatre sous-unités, qui s'organisent autour d'un pore central. La région hydrophobe de chaque sous-unité comprend six segments transmembranaires (STM). Une boucle membranaire (appelée P, pour pore) entre le cinquième et le sixième STM participe à la constitution de la paroi du pore central (figure I.8). Les sous unités peuvent s'assembler en homotétramères ou en hétérotétramères. Ces canaux sont tous régulés par le voltage et actifs sur la membrane plasmique. Ils sont très sélectifs de K^+ vis à vis de Na^+ . Chez les plantes supérieures, plusieurs canaux du type Shaker ont été clonés et caractérisés. On compte 9 membres chez *Arabidopsis*, possédant des propriétés fonctionnelles, des patrons d'expression et des localisations différentes (Pilot *et al.*, 2003). Les deux premiers canaux Shaker identifiés chez les plantes sont *AKT1* et *KAT1*, clonés en 1992 chez *Arabidopsis* (Anderson *et al.*, 1992; Sentenac *et al.*, 1992). De façon très intéressante, la caractérisation fonctionnelle de ces systèmes a montré qu'ils agissent comme des canaux rectifiant entrants (Véry *et al.*, 1995) malgré une forte homologie avec des canaux animaux voltage dépendants, très sélectifs de K^+ , qui agissent comme des canaux sortants. Cette observation a suscité beaucoup d'intérêt et déclenché de nombreuses études sur la relation structure-fonction de ces canaux, avec pour objectifs principaux la compréhension des mécanismes d'ouverture-fermeture du pore et de la régulation par le voltage (Miller et Aldrich, 1996; Marten et Hoshi, 1998; Zei et Aldrich, 1998; Latorre *et al.*, 2003).

On distingue trois grands type fonctionnels de canaux shaker: les canaux à rectification entrante, (familles *KAT*, *AKT1* et *ATKCI*), les canaux à rectification sortante (famille *SKOR*) et les canaux à faible rectification (famille *AKT2*). Le 4^{ème} TMS, porteurs de résidus chargés positivement (R ou K) est à la base de la sensibilité du canal au voltage. Des études faites sur la boucle pore (P) par mutagenèse dirigée ont permis d'identifier un motif (TxGYG) impliqué dans la sélectivité ionique.

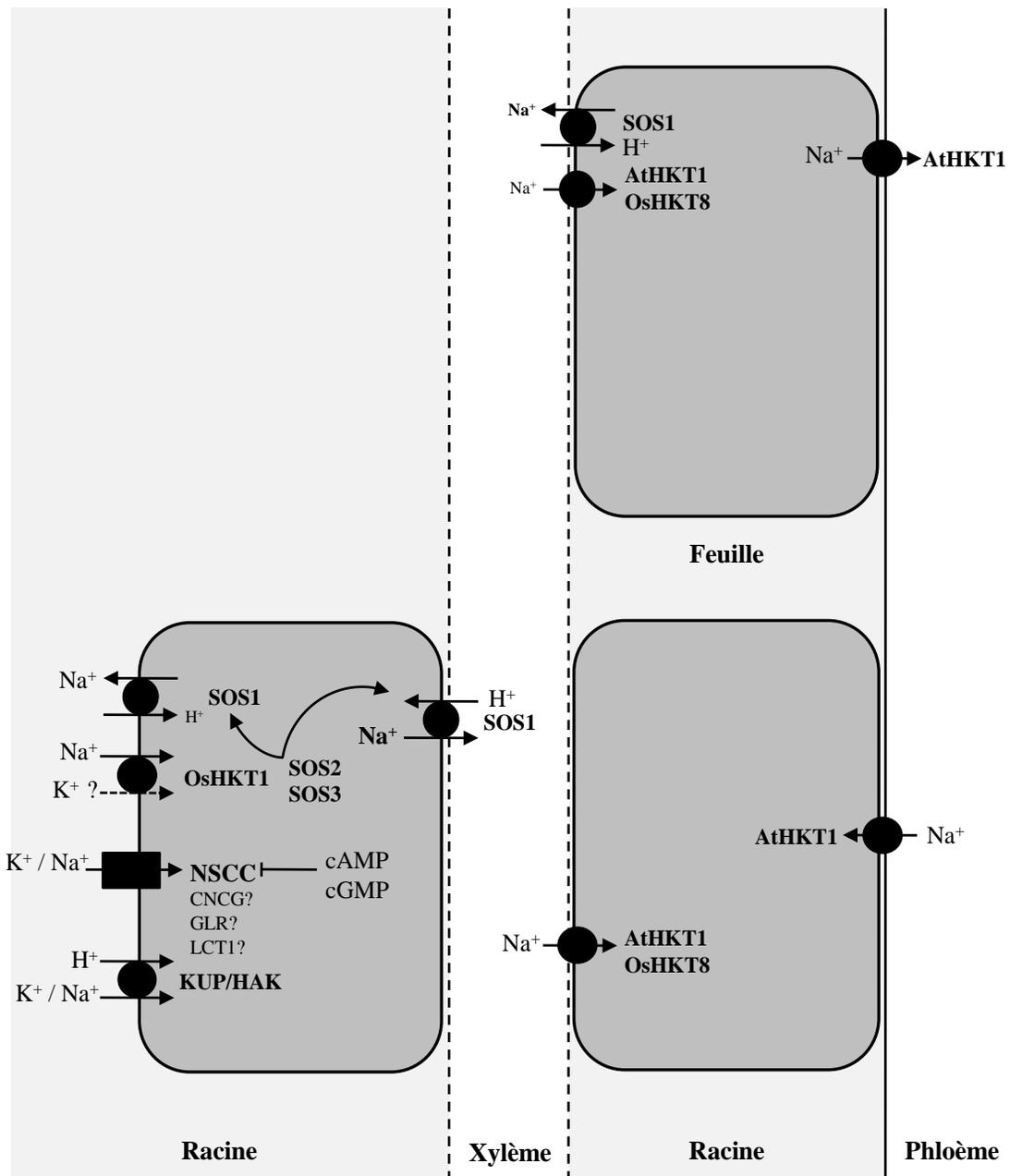


Figure I.7. Transport de Na⁺ au niveau de la plante entière (D'après Pardo et Quintero, 2002).

Les ions sodium peuvent entrer dans les cellules de la racine à travers des canaux non sélectifs ("NSCC") non formellement identifiés au niveau moléculaire, dont certains semblent inactivés par les nucléotides cycliques (cAMP et cGMP; Maathuis et Sanders 2001), des transporteurs HKT et à forte concentration de Na⁺, des transporteurs KUP/HAK. L'excrétion de Na⁺ des cellules racinaires vers la solution du sol ou vers les vaisseaux du xylème implique l'antiport H⁺/Na⁺ SOS1, dont l'activité est régulée par la protéine CBL SOS3 associée à la kinase SOS2. Des transporteurs HKT permettent le désalage de la sève xylémienne et la charge du phloème en Na⁺ au niveau des feuilles.

Le rôle dans la plante de plusieurs Shaker d'*Arabidopsis* a été analysé par génétique inverse. D'une façon générale, ces canaux permettent les échanges massifs de K^+ (influx ou efflux), entre le symplasma et l'apoplasme (entrée de K^+ de la cellule pour les canaux entrants, sortie pour les canaux sortants, entrée et sortie par les canaux faiblement rectifiants. Ils jouent ainsi un rôle par exemple dans le prélèvement de K^+ à partir de la solution du sol (canaux AKT1 et AtKC1 chez *Arabidopsis*), les transports de K^+ à longue distance dans le xylème et le phloème (canaux SKOR et AKT2), ou dans le transport de K^+ dans les cellules de garde à l'origine des mouvements stomatiques (canaux GORK, KAT1, KAT2...) (Véry et Sentenac, 2003; Lebaudy *et al.*, 2007). Les canaux Shaker dominant la conductance potassique du plasmalemma, ils participent en parallèle à la régulation de la concentration potassique cellulaire, au contrôle du potentiel membranaire et à la régulation du potentiel osmotique.

Les canaux KCO. Les KCO (ou TPK) constituent la seconde famille de canaux spécifiques de K^+ identifiés chez les végétaux. Ces canaux sont probablement formés de soit de deux sous-unités (famille KCO-2P), soit de quatre sous-unités (famille KCO-1P), qui s'organisent autour d'un pore central associant 4 domaines P (pour "Pore") (figure I.8). Chez *Arabidopsis*, la famille KCO-2P (deux domaines P par sous unité) compte cinq membres, et la famille KCO-1P (1 domaine pore par sous-unité) possède un seul membre (Lebaudy *et al.*, 2007). Le premier membre de la famille KCO-2P, *KCO1*, a été découvert *in silico* via l'utilisation du motif GYGD très conservé chez les canaux Shaker (Czempinski *et al.*, 1997). Il a été exprimé dans des cellules d'insectes, où il se comporte comme un canal sélectif de K^+ . Au niveau subcellulaire, AtKCO1 a été localisé au niveau du tonoplaste (Czempinski *et al.*, 1999 ; Scöknnecht *et al.*, 2002), suggérant qu'il joue un rôle différent de celui des canaux Shaker dans le transport de K^+ à travers les membranes intracellulaires. L'analyse électrophysiologique de courants vacuolaires sur des mutants invalidés *kco1* suggère que *KCO1* contribue aux courants du type SV, qui sont des courants vacuolaires sortants et lents (Scöknnecht *et al.*, 2002).

Canaux cationiques non sélectifs: NSCCs. Ces canaux, moins sélectifs de K^+ que les Shaker, ont été caractérisés dans différents types cellulaires (Hedrich *et al.*, 1996; Schachtman, 2000; Tester, 1990). Parmi les NSCCs figureraient les *CNGCs* et les *GLRs* qui sont cependant encore mal caractérisés. Un indice de l'implication des *CNGCs* dans l'influx de Na^+ vient du fait que l'ajout d'analogues de nucléotides cycliques dans le milieu inhibe l'influx de Na^+ ainsi que l'activité des canaux cationiques non sélectifs (Maathuis et Sanders, 2001). D'une façon similaire, la participation des *GLRs* dans l'influx de Na^+ a été suggérée par le fait que l'ajout de glutamate dans le milieu augmente l'influx de Na^+ et l'activité des canaux cationiques non sélectifs (Tester et Davenport, 2003). Chez les animaux, les *CNGCs* sont des canaux cationiques non sélectifs impliqués dans la transduction des signaux en réponse à différents stimuli. Ils sont perméables à Ca^{2+} , Na^+ et K^+ (Eismann *et al.*, 1994; Gamel et Torre, 2000). L'activation de ces canaux conduit à une dépolarisation de la membrane et à une augmentation de la concentration du calcium cytoplasmique, activant ainsi les voies de signalisation dépendantes de cet ion. Ces canaux ont une structure similaire aux canaux potassiques voltage-dépendants de type Shaker, présentant comme eux un domaine hydrophobe constitué de 6 STM (nommés S1 à S6), et un domaine P formant le pore entre le 5^{ème} et le 6^{ème} STM. Dans leurs extrémités N- et C-terminales hydrophiles, ils possèdent respectivement un domaine de fixation de la calmoduline (CaMBD) et un domaine de liaison des nucléotides cycliques (CNBD) (figure I.8).

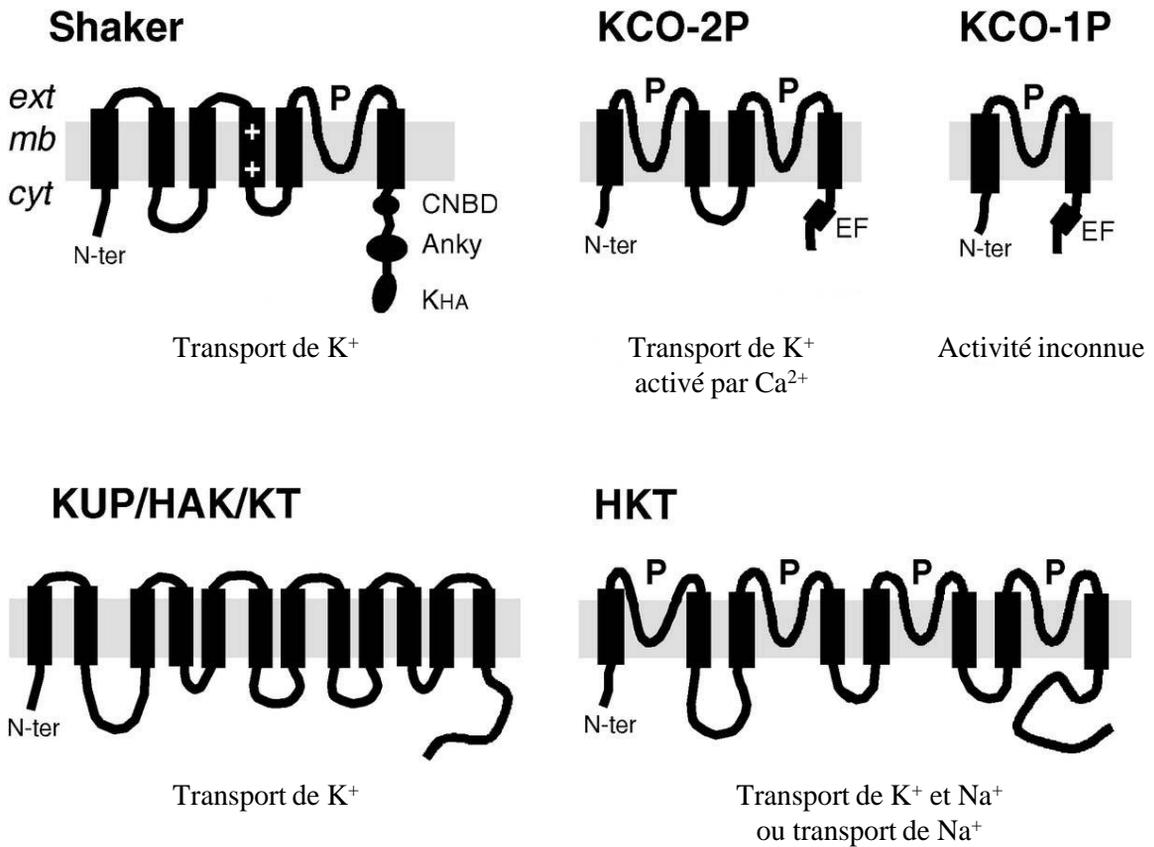


Figure I.8. Topologie des systèmes de transport de K^+ identifiés chez les plantes (D'après Véry et Sentenac, 2003).

Les modèles topologiques proposés pour les trois familles de canaux potassiques identifiées chez les plantes, Shaker, KCO-2P et KCO-1P dérivent des modèles décrits chez leurs homologues animaux, respectivement, Shaker, KCNK et KIR. Les transporteurs KUP/HAK/KT sont apparentés aux transporteurs de K^+ bactériens KUP et aux transporteurs fongiques HAK. La topologie proposée est basée seulement sur les profils d'hydrophobicité. La topologie présentée pour les transporteurs HKT est celle proposée par Durell *et al.* (1999) pour la superfamille comprenant les transporteurs HKT (plantes), TRK (champignons) et KtrB (bactéries).
 Abréviations : ext/cyt, côté extracellulaire/cytoplasmique, mb, membrane; ++, acides aminés positivement chargés dans le segment senseur de voltage; P, CNBD, Anky, KHA, EF, respectivement, domaine pore, site putatif de fixation des nucléotides cycliques, domaine ankyrine, domaines putatifs de fixation de Ca^{2+} de type EF-hand.

Chez les végétaux, une famille de canaux ioniques homologues aux canaux *CNGCs* animaux a été identifiée à la fin des années 90. Le premier ADNc codant un canal appartenant à cette famille a été cloné chez l'orge par criblage d'une banque d'expression en recherchant des protéines interagissant avec la calmoduline, et a été nommé *HvCBT1* (Schuurink *et al.*, 1998). Le deuxième membre de la famille a été isolé chez le tabac par la même approche (Arazi *et al.*, 1999). Cet ADNc, nommé *NtCBP4*, présente 61,2 % d'identité avec *HvCBT1*. Chez *Arabidopsis*, vingt membres de la famille, nommés *CNGC-1* à *-20*, ont été identifiés *in silico* par homologie de séquences (Köhler *et al.*, 1999 ; Mäser *et al.*, 2001). Il faut noter que les données disponibles dans la littérature sur les propriétés fonctionnelles des *CNGCs* végétaux sont peu nombreuses et controversées. Cependant, certaines observations montrent que chez *Arabidopsis*, les canaux *AtCNGC1* et *AtCNGC2* introduits dans des plasmides d'expression dans la levure semblent compléter un mutant de levure déficient pour le transport de K^+ (Köhler *et al.*, 1999; Leng *et al.*, 1999). Chez le tabac, la sur-expression de *NtCBP4* confère aux plantes transgéniques une tolérance au nickel et une hypersensibilité au plomb qui traduirait une diminution de l'accumulation de Ni^{2+} et une augmentation de l'accumulation de Pb^{2+} (Arazi *et al.*, 1999). Il a été montré, par la suite, que *NtCBP4* est exprimé sur la membrane plasmique de cellules de tabac (Arazi *et al.*, 1999). L'hypothèse est que *NtCBP4* serait un système de transport (peut-être perméable à Ca^{2+}) permettant une entrée de Pb^{2+} dans la cellule.

Des données sur la fonction *in planta* d'un CNGC ont été obtenues de façon indirecte suite à une analyse génétique sur un mutant d'*Arabidopsis* altéré dans la réponse à un pathogène (Yu *et al.*, 1998). Cette étude a permis de mettre en évidence, pour la première fois, l'implication d'un canal ionique de type CNGC dans une voie de signalisation. D'une façon générale, les *CNGCs* sont probablement impliqués, comme leurs homologues chez les animaux, dans la signalisation cellulaire (Demidchik *et al.*, 2002 ; Véry et Sentenac, 2002). Ils seraient perméables aux cations monovalents et/ou à Ca^{2+} , et régulés par les nucléotides cycliques et la calmoduline. Chez les CNGC végétaux, le domaine de fixation des nucléotides cycliques et le domaine de fixation de la calmoduline sont tous les deux situés dans la région cytoplasmique C-terminale, où ils se chevauchent légèrement (Véry et Sentenac, 2003).

Les récepteurs *GLRs* chez les plantes forment une famille de polypeptides homologues aux *GLRs* animaux. Chez *Arabidopsis*, cette famille compte vingt membres. Ils possèdent tous la même structure, avec 2 STM et 1 domaine P, et un site de fixation du ligand. Cependant le domaine P est différent entre les GLR animaux et végétaux. Il semble probable que les GLR végétaux soient, comme leurs homologues animaux, des canaux perméables à K^+ , Na^+ et/ou à Ca^{2+} (Lesage *et al.*, 1996; Nakanishi *et al.*, 1990). Chez *Arabidopsis*, tous les *GLRs* sont exprimés dans les racines (Chiu *et al.*, 2002). Leur rôle dans la plante demeure encore inconnu.

I.5.2 Les transporteurs

La famille *KUP/HAK/KT*. Un transporteur appartenant à une nouvelle famille de systèmes de transport de K^+ a été identifié chez *E. coli* (*KUP1*) (Schleyer et Bakker, 1993) puis chez la levure *Schwanniomyces occidentalis* (*SoHAK1*) (Bañuelos *et al.*, 1995). L'expression de *SoHAK1* dans une souche de *S. cerevisiae* mutée pour les systèmes d'absorption de K^+ a permis de restaurer la croissance sur un milieu à faible concentration de K^+ (Bañuelos *et al.*, 1995). *SoHAK1* semble donc être un transporteur de K^+ à haute affinité. Les homologues chez les plantes, appelés selon les auteurs *KUP*, *HAK* ou *KT* (pour " K^+ uptake", "High Affinity K^+ transporter" et K^+ Transporter, respectivement), forment une large famille contenant par

exemple 13 membres chez *Arabidopsis* (Mäser *et al.* 2001) et au moins 17 membres chez le riz (Bañuelos *et al.*, 2002). La structure de ces transporteurs est mal connue. Les profils d'hydrophobicité suggèrent qu'ils possèdent 12 STM et une longue boucle cytoplasmique entre le deuxième et le troisième segment (figure I.8).

Chez les plantes, un premier gène de la famille *HAK/KT/KUP*, nommé *HvHAK*, a été cloné chez l'orge par RT-PCR, avec des amorces correspondant aux régions conservées des transporteurs *KUP1* d'*E. coli* et *SoHAK1* (Santa-Maria *et al.*, 1997). Chez *Arabidopsis*, les premiers membres identifiés dans la famille *HAK/KT/KUP* ont été clonés par complémentation d'un mutant de levure (Fu et Luan, 1998) ou par recherche de séquences homologues à *KUP1* et *HvHAK* dans les banques de données (Quintero et Blatt, 1997; Kim *et al.*, 1998). La surexpression des ADNc *AtKUP1* et *AtKUP2* provoque une augmentation de l'influx de $^{86}\text{Rb}^+$ chez la levure ou dans les cellules d'*Arabidopsis* en culture (Quintero et Blatt, 1997; Fu et Luan, 1998; Kim *et al.*, 1998). Pour *AtKUP1*, la cinétique d'absorption en fonction de la concentration présente une allure Michaélienne dans le domaine des faibles concentrations (inférieures à $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$), évoquant la cinétique associée au mécanisme I dans la racine (Fu et Luan, 1998; Kim *et al.*, 1998). Cette similitude a suggéré que les systèmes de type KUP sont responsables du transport actif de K^+ à forte affinité dans les cellules végétales. Cependant, l'analyse des cinétiques d'absorption par le système *AtKUP1* en fonction de la concentration de K^+ révèle aussi une activité de transport à faible affinité (Kim *et al.*, 1998). Autrement dit, le système *AtKUP1* peut générer à lui seul une cinétique d'absorption biphasique, qui évoque les cinétiques observées dans les racines (mécanisme I plus mécanisme II). La dualité de la cinétique du transport par *AtKUP1* pourrait traduire deux modes de fonctionnement différents pour ce système (Kim *et al.*, 1998). Aucun courant n'a été détecté par expression hétérologue d'*AtKUP1* dans l'ovocyte de *Xénope*, et les mécanismes du transport n'ont pas pu être déterminés (Kim *et al.*, 1998). Il faut cependant noter que l'influx de K^+ généré par les protéines *HvHAK1* et *AtKUP1* dans la levure est inhibé par la présence de Na^+ dans le milieu (Santa-Maria *et al.*, 1997; Fu et Luan, 1998). La localisation de l'expression du gène *AtKUP1*, analysée par northern blot, a conduit à des résultats variables : selon les équipes l'ARNm est indétectable dans les racines mais présent dans les parties aériennes (Kim *et al.*, 1998), majoritairement exprimé dans les racines (Fu et Luan, 1998) ou non détectable dans toute la plante (Quintero et Blatt, 1997). Ces variations pourraient provenir de différences dans les conditions de culture des plantes. Cela signifierait que l'accumulation de l'ARNm *AtKUP1* dépend fortement des conditions environnementales.

Par une approche de génétique classique reposant sur la recherche de mutants altérés dans la croissance des poils absorbants, Rigas *et al.* (2001) ont isolé un autre membre de la famille, nommé *TRH1*, ou *AtKUP4* selon la nomenclature de Mäser *et al.* (2001). Le mutant *trh1* présente une diminution de l'absorption de $^{86}\text{Rb}^+$. Le phénotype de croissance des poils absorbants des plantes mutantes n'est pas restauré lorsque celles-ci sont cultivées sur un milieu contenant K^+ 50 mM. La fonction de transporteur de K^+ à haute affinité de *TRH1* a été démontrée par complémentation de mutant de levure *trk1*. *TRH1* est exprimé dans les racines et dans les parties aériennes. Il pourrait être impliqué dans la formation des poils absorbants, en permettant l'influx de K^+ nécessaire à la croissance et l'élongation de ces cellules. Son rôle dans les parties aériennes n'a pas été encore identifié.

D'une façon générale, tous ces transporteurs *HAK/KT/KUP* sont assez peu caractérisés au niveau fonctionnel, en raison de difficultés à les exprimer en système hétérologue (quelques rares membres s'expriment cependant dans la levure *S. cerevisiae* et/ou dans la bactérie *E. coli*). Dans la plante, ils sont présents dans de nombreux types cellulaires et

semblent pouvoir être rencontrés à la fois sur la membrane plasmique et sur la membrane vacuolaire (Bañuelos *et al.*, 2002; Qi *et al.*, 2008; Senn *et al.*, 2001).

Les transporteurs CHX (Monovalent Cation/H⁺ Exchanger). Ces systèmes de transport ont été identifiés chez les plantes sur la base de leur homologie avec des systèmes précédemment caractérisés chez d'autres organismes, comme les bactéries, les levures ou les algues. Seuls les transporteurs impliqués dans la compartimentation de sodium dans la vacuole des plantes sont maintenant relativement bien connus.

Comme chez les organismes unicellulaires, les transports à travers le tonoplaste sont activés par une pompe H⁺-ATPase qui établit un gradient de protons (Loew *et al.*, 1996; Barkla *et al.*, 1999). Le fonctionnement des CHXs est électroneutre, et ne perturbe donc pas la différence de potentiel à travers la membrane. Ces systèmes sont probablement impliqués à la fois dans l'homéostasie des cations monovalents et la régulation du pH cytoplasmique et/ou vacuolaire (Cellier *et al.*, 2004).

D'un point de vue biochimique, une activité tonoplastique antiport Na⁺/H⁺, qui pourrait être impliquée dans la compartimentation vacuolaire du sodium, a été initialement mise en évidence par le groupe de Blumwald, chez plusieurs espèces (Blumwald et Poolle, 1985; Mennen *et al.*, 1990). Cette activité antiport Na⁺/H⁺ a été associée à une protéine vacuolaire de 170 KDa identifiée chez *Beta vulgaris*, dont l'accumulation est augmentée par les traitements avec NaCl (Barkla et Blumwald, 1991). Des anticorps dirigés contre cette protéine inhibaient l'activité antiport Na⁺/H⁺. Cette protéine était donc un bon candidat pour l'activité antiport détectée sur le tonoplaste mais le gène qui la code reste inconnu.

Du point de vue moléculaire, un ADNc d'*Arabidopsis*, nommé *AtNHX1*, apparenté à la protéine *ScNHX1* de levure a constitué le premier système caractérisé. Seul cet antiport Na⁺/H⁺ tonoplastique d'*Arabidopsis* a pour l'instant été clairement impliqué dans la compartimentation vacuolaire du sodium (Blumwald et Poolle, 1985; Garbarino et DuPont, 1988; Gaxiola *et al.*, 1999; Apse *et al.*, 1999). L'expression de cet ADNc de plante complémente des levures déficientes dans le transporteur Na⁺/H⁺ présent sur la membrane vacuolaire (Gaxiola *et al.*, 1999). Chez *Arabidopsis*, la sur-expression d'*AtNHX1* confère aux plantes transgéniques une tolérance à des concentrations externes en Na⁺ supérieures à 200 mM (Apse *et al.*, 1999). *AtNHX1* est exprimé dans tous les tissus de la plante et se trouve sur le tonoplaste et sur les membranes du système interne (RER, Golgi...). Le séquençage systématique du génome d'*Arabidopsis thaliana* a permis d'identifier 35 gènes pouvant coder des protéines ressemblant à des antiports Na⁺/H⁺. La surexpression constitutive d'*AtNHX1* améliore la tolérance à la salinité aussi chez la tomate (Zhang et Blumwald, 2001) et *Brassica napus* (Zhang *et al.*, 2001). Plus récemment, Fukuda *et al.* (2004) ont identifié un homologue d'*AtNHX1* chez le riz, *OsNHX1*. L'expression d'*OsNHX1* est induite dans les racines et dans les parties aériennes durant un stress salin sévère. Les auteurs ont constaté que la surexpression d'*OsNHX1* améliore la tolérance à la salinité des cellules et des plantes transgéniques.

Les systèmes d'antiport Na⁺/H⁺ de la membrane plasmique sont encore peu caractérisés. Les seuls éléments d'information concernent la protéine *SOS1* chez *Arabidopsis*, qui présente des homologies de séquence avec les antiports Na⁺/H⁺ et qui serait impliquée dans l'efflux de sodium au niveau du plasmalemma (Zhu, 2000). La preuve a en effet été apportée que *SOS1* est effectivement dotée d'une activité d'antiport Na⁺/H⁺ (Shi *et al.*, 2002). En utilisant le système gène rapporteur GUS, Shi *et al.* (2002) ont mis en évidence une localisation de

transcrits *SOS1* dans les cellules de l'épiderme racinaire, à l'extrémité de l'apex racinaire et dans les cellules du parenchyme bordant les vaisseaux du xylème dans les tissus conducteurs des racines, tiges et feuilles.

Le mutant d'*Arabidopsis* hypersensible au sodium *sos1* présente, lorsqu'il est cultivé en présence de concentrations en NaCl modérées (25 mM), des teneurs en Na⁺ dans ses racines supérieures à celles observées chez la plante contrôle de génotype sauvage. Par ailleurs, en utilisant le système gène rapporteur, les auteurs ont mis en évidence la localisation de *SOS1* dans les cellules de l'épiderme à l'extrémité de la racine. Ces résultats suggèrent l'implication de *SOS1* dans l'efflux de Na⁺ à partir des racines dans le milieu. De plus, il est intéressant de noter que la surexpression de *SOS1* chez *Arabidopsis* améliore sensiblement la tolérance des plantes à la salinité. *AtSOS1* est donc un déterminant important de la sensibilité au sel chez les plantes. L'activité d'*AtSOS1* est contrôlée par *AtSOS2* et *AtSOS3*. *AtSOS3* (une protéine affine de Ca²⁺ appartenant à la famille CBL) interagit directement avec *AtSOS2* qui est une sérine/thréonine protéine kinase (Halfer *et al.*, 2000). L'interaction d'*AtSOS3* et *AtSOS2* déclenche l'activité de protéine kinase de *AtSOS2*, qui phosphoryle et active *SOS1*.

Au sein de la famille des *CHXs*, certains membres peuvent être de bons candidats pour le transport de K⁺. C'est le cas, chez *Arabidopsis*, des *AtKEAs* qui ressemblent aux antiports K⁺/H⁺ bactériens *KefB* et *KefC*. Cependant, aucune donnée expérimentale concernant ces systèmes n'est disponible, à l'exception de données d'expression dans les tissus d'*Arabidopsis*. Sur les 28 gènes *KEA* que compte cette plante, 18 sont spécifiquement exprimés durant la phase de microgamétoγένèse ou dans les tissus sporophytiques, suggérant que les protéines *CHXs* sont impliquées dans la régulation de l'homéostasie potassique dans la phase de développement du pollen et de la germination (Sze *et al.*, 2004). Deux *CHXs* ont été caractérisés plus en détail. *AtCHX17* semble préférentiellement s'exprimer dans les racines en conditions de stress, *i.e.* fortes concentrations de sel, faible pH externe, faible concentration externe de K⁺, ou traitement par l'acide abscisique (Cellier *et al.*, 2004). L'analyse du mutant AND-T *atnhk17* suggère que ce gène a une fonction dans l'homéostasie potassique, puisque les plantes mutantes accumulent moins de potassium que les sauvages. Quand il est exprimé dans la levure, *AtNHX17* co-localise avec des marqueurs de l'appareil de Golgi et complémente la sensibilité au pH d'une souche de levure mutante *kha1* (Maresova *et al.*, 2006) ce qui suggère un rôle dans l'homéostasie potassique et la régulation du pH en conditions de stress. La deuxième protéine *CHX* caractérisée chez *Arabidopsis* est *AtCHX23*, localisée dans l'enveloppe chloroplastique (Song *et al.*, 2004). Des mutants perte de fonction de ce gène ont montré une altération dans l'ultrastructure du chloroplaste avec une forte diminution du taux de chlorophylle dans les feuilles, et une augmentation du pH cytosolique dans les cellules de garde. La croissance des mutants *atnhx23* a été améliorée par l'ajout des fortes concentrations de K⁺ dans le milieu, mais altérée par l'ajout de NaCl (Song *et al.*, 2004). Toutes ces données suggèrent qu'*AtNHX23* est un antiport K⁺(Na⁺)/H⁺ actif au niveau de l'enveloppe chloroplastique et impliqué dans l'homéostasie potassique et peut-être dans la régulation du pH du stroma.

Les transporteurs HKT (Cf. § I.6). Mon travail de thèse portant sur les transporteurs de cette famille chez le riz, les connaissances concernant ces systèmes de transport chez les plantes sont mises en valeur dans un paragraphe individualisé, ci-dessous.

I.6 Les transporteurs HKT et résistance à la salinité

Les transporteurs HKT possèdent des homologues chez les champignons (les *TRK*) et chez les bactéries.

Leur structure globale prédite, en se basant sur des analyses de séquences, s'apparente à celle de canaux potassiques (à 2 STM) qui existent par exemple chez les bactéries. La région hydrophobe des polypeptides HKT comprend 4 répétitions du module [1 STM/ 1 P/ 1 STM]. Dans la protéine fonctionnelle les quatre boucles [P] seraient arrangées de façon à constituer un pore central (Durell et Guy 1999) (figure I.8).

Tous les transporteurs HKT caractérisés jusqu'à présent chez les végétaux sont perméables à Na^+ , et certains le sont également à K^+ . Le rôle de ces transporteurs dans le transport *in planta* de K^+ n'a pas encore été précisé. Par contre, plusieurs études ont mis en évidence un rôle de ces systèmes dans le transport *in planta* de Na^+ et ont révélé que des HKTs sont impliqués dans la tolérance des plantes à la salinité. Les données bibliographiques correspondantes sont résumées ci-dessous.

I.6.1 “*TaHKT1*”, le premier HKT cloné chez les plantes

Le premier système de transport à haute affinité de K^+ , nommé *TaHKT1*, a été cloné chez le blé par complémentation de levures déficientes pour les protéines *TRK1* et *TRK2* impliquées dans l'absorption de K^+ (Schachtman et Schröder, 1994). La séquence protéique de *TaHKT1* présente environ 20 % d'homologie avec les systèmes *TRK* identifiés chez la levure et sa structure intègrerait 10 à 12 régions hydrophobes susceptibles de correspondre à des STM.

L'expression de *TaHKT1* dans l'ovocyte de Xénope provoque un courant activé par l'ajout de K^+ ou d'autres cations dans le milieu extérieur. L'intensité de ce courant augmente quand le pH extérieur est abaissé. Cela a initialement conduit à l'hypothèse d'un fonctionnement de type symport $\text{H}^+\text{-K}^+$ (Schachtman et Schröder, 1994). Cependant, l'analyse de plantes transgéniques sur-exprimant *TaHKT1* n'a pas permis de mettre en évidence une contribution de ce système à la fonction d'absorption de K^+ par la racine (Laurie *et al.*, 2002). Des analyses ultérieures ont révélé une sensibilité du transport à la présence de Na^+ dans le milieu. Ces données ont suggéré que *TaHKT1* fonctionnerait plutôt comme un symport $\text{Na}^+\text{:K}^+$ à forte affinité pour K^+ (*ca.* 10 μM), énergisé par le gradient électrochimique transmembranaire de Na^+ (Rubio *et al.*, 1995), un mécanisme de couplage énergétique complètement inattendu chez les plantes. Il semblerait, en plus, que ce type de fonctionnement soit limité aux conditions de faible concentration extérieure de Na^+ .

Lorsque la concentration de Na^+ est plus élevée, le transport de K^+ par *TaHKT1* serait bloqué et ce système fonctionnerait comme un transporteur de Na^+ à faible affinité (*K_m* voisin de 5 mM) (Rubio *et al.*, 1995; Gassmann *et al.*, 1996). La signification physiologique de ce résultat demeure encore obscure puisque les analyses *in vivo* du transport de K^+ chez les plantes supérieures n'ont jamais révélé d'activité de type symport $\text{Na}^+\text{-K}^+$ (par exemple, l'addition de Na^+ dans le milieu ne stimule pas le prélèvement de K^+).

I.6.2 “*AtHKT1*”, un transporteur spécifique de Na^+

L'unique membre de la famille *HKT* chez *Arabidopsis*, orthologue du gène *TaHKT1* du blé, a été identifié et désigné sous le nom *AtHKT1*. L'expression de ce gène dans des souches de levures dépourvues du système d'efflux de Na^+ aggrave leur sensibilité à Na^+ , mais elle ne

OsHKT1 ----- -MTS IYHDFIHNKLSQSFGRIGRYFVNFVV 28
 OsHKT2 ----- -MTS IYQEFIHTKQCSFRS IGRYVLSIV 28
 OsHKT3 ----- -MP IRLHI FVNSARHAINSSA 20
 OsHKT4 MHP PSLVLDTLKR I KLY IAMKLLLPNSEVPR IYWEKAQHLCGFLSMKLI SRARCVA SSVK 60
 OsHKT6 ----- -MNHCLVVS ----- -HKKLQTRTFPAASKFS SFTKSAQKSIK 35
 OsHKT7 ----- -MPTSR ----- 6
 OsHKT8 ----- -MSSLDATTPRYDFK 15
 OsHKT9 ----- -MP IRLHI FVSSARHAINSSA 20

M₁A
P_A

OsHKT1 LAHRFIALHIHFFFWIQLSYFLLISILGSVLMLFLKPSNPEFRPGCYIDMLFLSTSAALTLS 87
 OsHKT2 L IYRFVLSLHVHFFFWIQLSYFLLISILGSVLMLFLKPSNPEFRPGCYIDMLFLSTSAAMTVS 87
 OsHKT3 F ICRFIAYHLSPLL I HLSYFLI IDILGFVSLVVL RPSNHKYN -PRYVDMFFLSTSAVTVI 79
 OsHKT4 QSY SFLVCKSNPLV VQLVYFVI I SFAGELAKNLKPQKPG - -PRDLLLFTS VSTLTVS 118
 OsHKT6 YSEQFIYQ -NNEFLVHVAYFAL I SFAGYGLKVLKPRDKSNT - LKDLLVLFSTVSASTVS 93
 OsHKT7 - - - -ALAGGAL SMHVAYFLA I SCLGGLGLV LKVPREGAA - -PRRIDRFFTAVS AATVS 59
 OsHKT8 R IYHLFLFHAHFFFWQLLYFLFI S L GFLMLKALPMKTSMVPRPMDLLDIFTVSAATVS 75
 OsHKT9 L ICRFIAFHLSPLL I HLSYFLI I DVLGFVALV L RPSNHKYN - -PRYIDMFFLSTSAVTVI 79

P_A
M₂A

OsHKT1 SL I T I E M E V L S S S Q I V V I T L L M L L G G E V F V S F L G I M L R L N H K H N P E F S G D K V S S V P I - - - 144
 OsHKT2 G L S T I E M E V L S S S Q I V V L T L L M L V G G E V F V S F L G I M L R L K H K H N P E F S G D R V S S V P I - - - 144
 OsHKT3 G L A T I Q M E D L S S Q I A I L T L L M F L D S K M F L S F L G L V L E S S K Q N K H D P E N R R V S - - - - 132
 OsHKT4 S M A T V E M E D L S D R Q L W V L I L L M L M G G E V F T S M L G L Y F N N A N A N R N E N S Q R S L P S I S L - - - 175
 OsHKT6 S M A T V E M E D F S S A Q L W V L T I L M L I G G E V F T S M L G I H F M R A E F G T K E S D V S T R D H S P C I - - - 150
 OsHKT7 S M S T V E M E V F S N G L V V L T V L M L L G G E V F V S L V G L A S K W S K L R S D A M D R S R R V E S H G - - - 116
 OsHKT8 S M N A V E M E S F S N S Q L L L I T L L M L L G G E V F T S I L G L Y F T N A K Y S S K M I A T L P D D D D H G G S G 135
 OsHKT9 G L A T T Q M E D L S S S Q I A V L T L L M F L G S E M F L S F L G L V L E S S K Q N K H D P E N R R V S - - - - 132

OsHKT1 ----- E L D T I N S A S T V I S C H E L ----- Q L E A A T P E V P ----- S S 173
 OsHKT2 ----- E I D T I E P T R T V M S S E B L ----- Q I E A A A P D V P ----- S S 173
 OsHKT3 ----- - S V T V C K Q S ----- Q L E E A T P Q T P ----- S M 152
 OsHKT4 ----- D I E F N S P A N N G D H K I T H C G ----- Q S E E T M S Q N Q ----- V Q 206
 OsHKT6 ----- D I E S I T S T K P G - - P S T Q G T ----- K V T V S F S E L R ----- M E 179
 OsHKT7 ----- - D V A L A D I D G G D V E N T S S G ----- - E E A A S R R R ----- P M 145
 OsHKT8 K P P P P T T S P S S T L V E L E L A P P M D V V V N F T T T A T T H D E V E L G L G R R N K R G C T C T T T H T S S 195
 OsHKT9 ----- - S V T V C E Q S ----- H L E E A T P Q T P ----- S M 152

M₁B
P_B

OsHKT1 T I K D L K R S K R L R W F L G F V V F S Y F V I H V A G F L L V L W Y I S R V S S A K A P L K K K G I N I A L F S F 233
 OsHKT2 T I K D L K R S K R L R W F L G F V V F S Y F V I H V V G F L L V L W Y I S R V S S A K A P L K K K G I N I A L F S F 233
 OsHKT3 N S I D I K K R - - C L K Y L V F V V L A Y M I I I L V T G S L L V F M Y I A H V S S A R D V L T R K S I N K A L F S I 210
 OsHKT4 Q N K S I T Y N - - P C A V L V R I V T G Y F V A T V I S S S V I I I Y F W I D S D A R N V L K S K E I N M Y T F C I 264
 OsHKT6 N G G H V E P K - - T I K F L G F V V M G Y L L I T N L G S L L I Y L Y L N L V P S A H K I L K R K G I G I I V F S V 237
 OsHKT7 D A D T L R H N - - A V R A L F Y I V L A I F A V V H V G A V A M A A Y V L A S P G A R T L G D K S N T W T F A V 203
 OsHKT8 S S S A S K T T - - T T R L L M F V V M G Y H A V V H A G Y T A I V V Y L S A V G G A G A V V A G K G I S A T F A I 253
 OsHKT9 N S T D I K R S - - C H K Y L V F V V L A Y M I I I L V T G S L L V F M Y I A H V S S A R D V L T R K S I N K A L F S I 210

P_B
M₂B

OsHKT1 S V T V S S F A N V G L V P T N E N M A I F S K N P G L L L L F I G Q I L A G N T L Y P L F R L I L I W F L G - - K V T 291
 OsHKT2 S V T V S S F A N G L V P T N E N M A I F S K N P G L L L L F I G Q I L A G N T L Y P L F R L I L I W F L G - - K V T 291
 OsHKT3 S V T V S S F T N G L L P T N E S M V V F S S N N G L L L L I G Q I L A G S T L F P V E L R I V I W A L R G L R L A 270
 OsHKT4 F T A V S S F A N C G F T P L N S N M Q P F R K N W V L L L V I P Q I L A G N T L F S P L R L I C V W V L G - - K V S 322
 OsHKT6 F T A I S S V G N C G F P V N E N M I I F Q K N S I L L L L I L P Q I L A G N T L F A P C L R I M V W S L E - - K I T 295
 OsHKT7 F T V S T F S N C G F M P T N E N M V V F K R D A P L Q L L L V P Q V L A G N T L F A P L L A A C V W A A A - - A A T 261
 OsHKT8 F T V S T F A N C G F V P T N E G M V S F R S E P G L L L L V M P H V L L G N T L F P V F L R I A I A A L E - - R V T 311
 OsHKT9 S V T V S S F T N G C L L P T N E S M A V F S S N N G L L L L I G Q I L A G S T L L P M F R L I V I W A L R G L R L A 270

M₁C

OsHKT1 K L R E L K L M I K N P - - E E L Q Y D Y L L P K I P T A F L A S T V I G L M A S I V T L F G A V D W N S S V F D G L 348
 OsHKT2 K L K D L K L M I K N S - - D E L Q Y D Y L L P K I P T A F L A S T V I G L M A S I V T L F G S V D W N S S V F D G L 348
 OsHKT3 K A E E P D F M M N S - - S A V G E S H L L P N L C T I F L A V V E V A F V A M T V I L F C C I N W D S V F A G L 270
 OsHKT4 G K A E Y A Y I L Q H P - - G E T G Y K H L H V R R N S V Y I V L S V T G L I L L Q V M F I C S F E W N S B S L E G M 379
 OsHKT6 G K K D C R Y I L E Y P - - K A I G Y K H L M S T R E S V Y L T L T V V S L I I L Q V L F L S I E W S S V A L D G M 352
 OsHKT7 R R E B E L V E M A R E G G R A A A G Y A H L M P A R R C W M L A A T V A A F V A V L M A L V C G M E W G G - A L Q G M 320
 OsHKT8 C W P E L G E L L I R K R R G G G E G Y H H L L P S S R T R F L A L T V A V L V A Q L A L F C A M E W G S D G L R L G 371
 OsHKT9 K A E E P D F M M N S - - S V G E S H L L P N L C T I F L A V E V A F V G M T V I L F C C I N W D S A V F A G L 327

P_C
M₁C

OsHKT1 S S Y O K I I N A L F M A V N A R H S G E N S I D C S L I A P A V L V L F I I L M Y L P S S T T P A L S N G D E K T A N 408
 OsHKT2 S S Y O K I I N A L F M A V N A R H S G E N S I D C S L I A P A V L V L F I I L M Y L P S S T T P A L S N G D E K T A N 408
 OsHKT3 S S L O K I I N A L F M A V N A R H S G E N S I D C S L V A P A A L V L F M V M M Y T P S L T K L F S A C Q D H K R I G 387
 OsHKT4 N W L O K I V G L L F Q S V N T R C A G E S I L D I S T L S E S T L L L E A V V M Y L P S D A S F L T A N A N Q P L T 439
 OsHKT6 S N Y O K I V S A L F Q S V N A R H A G E S V T D D S N L S S A I L V L Y T I M M Y L P G Y T S F L P R H D G E D S K T 412
 OsHKT7 S P A W K I V N A L F A V N A R H T G E S V T D D S L I L A P A I L V L F V L M M Y L P P Y T T F W P F E E N S T T K D 380
 OsHKT8 T A G O K I V G A L F M A V N S R H S G E M V L D L S T V S S A V V V L Y V V M M Y L P P Y T T F V P V Q D K H Q O T G 431
 OsHKT9 T S L O K I I T N A L F M A V S A R C A G E N S I D C S L V A P A A L V L F M V M M Y T P S L T K L F S A C Q D H K Q I G 387

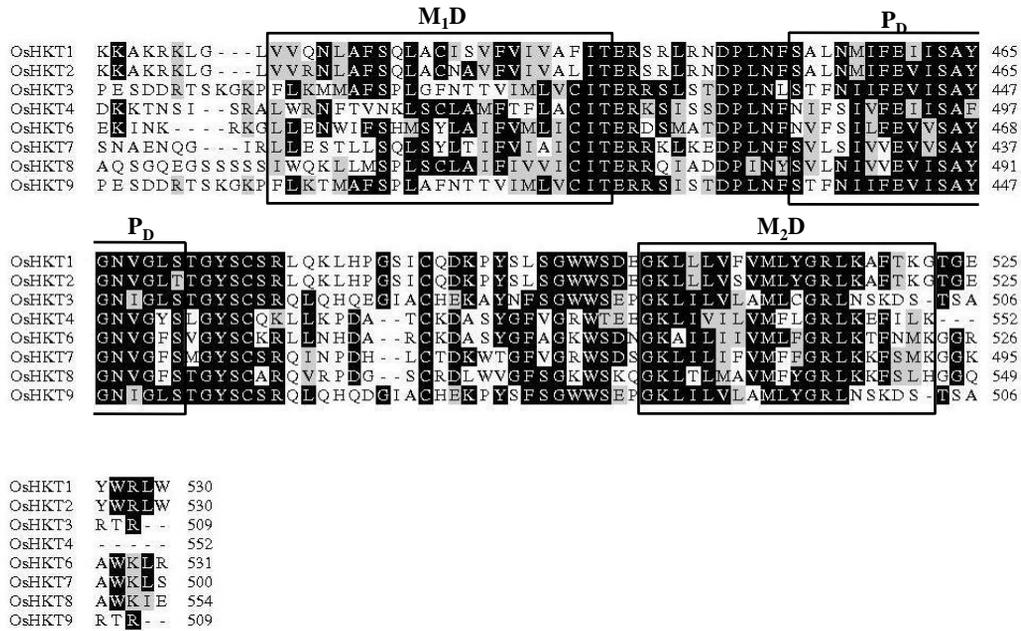


Figure I.9. Alignements des séquences protéiques des transporteurs HKT de riz.

Les segments transmembranaires des transporteurs, déterminés d'après Durell *et al.* (1999), sont notés M₁A, M₂A, M₁B, M₂B, M₁C, M₂C et M₁D, M₂D, les quatre domaines pores sont notés P_A, P_B, P_C et P_D. Les résidus identiques sont indiqués par un fond noir et ceux appartenant au même groupe de substitution par un fond gris. Les 7 groupes de substitution sont : K et R; D et E; N et Q; A et G, S et T; I, M, et V; et F, W et Y. Les tirets correspondent à des décalages introduits pour maximiser l'alignement. Les séquences protéiques qui ont été utilisées dans ces alignements ont été récupérées dans GenBank. Les programmes utilisés pour l'alignement et pour la mise en forme sont respectivement Clustalw et Boxshade.

supprime pas la déficience du transport de K^+ chez les mutants *trk1* et *trk2* qui ont des difficultés d'absorber le potassium (Uozumi *et al.*, 2000).

Quand il est exprimé dans l'ovocyte de Xénope, AtHKT1 présente une activité de transport strictement sélective de Na^+ , sans aucune perméabilité à K^+ . De même, l'expression d'*AtHKT1* ne complémente pas un type de mutant d'*E. coli* incapable d'absorber K^+ , ce qui contribue à démontrer qu'AtHKT1 ne transporte que Na^+ .

AtHKT1 est exprimé dans les tissus vasculaires de la racine et des parties aériennes, au niveau du phloème et du parenchyme xylémien (Berthomieu *et al.*, 2003; Sunarpi *et al.*, 2005).

1.6.3 La famille HKT du riz

Alors que le gène *AtHKT1* est unique chez *Arabidopsis*, il est intéressant de constater que la famille *HKT* chez le riz compte de 7 à 9 membres, selon les cultivars (Garciadeblás *et al.*, 2003). L'analyse des séquences polypeptidiques des transporteurs codés par ces gènes montre une divergence assez importante entre les membres: à part 2 paires de transporteurs très homologues (OsHKT3/OsHKT9 et OsHKT1/OsHKT2, 93 et 91% d'identité, respectivement) (figure I.11.A), le pourcentage d'identité entre les différents transporteurs se situe entre 40 et 50%. Chez le cultivar séquencé par le consortium international, Nipponbare (*ssp.* japonica), *Ni-OsHKT2* et *Ni-OsHKT5*, ne codent probablement pas des transporteurs fonctionnels à cause d'importantes délétions ou de la présence de codons "stop" en phase dans le cadre de lecture. Cependant *OsHKT2* est identifié chez un autre cultivar (indica) et code pour un transporteur fonctionnel, *Po-OsHKT2* (Horie *et al.*, 2001).

Au niveau structural, les alignements de séquences protéiques présentées dans la figure I.9 montrent que les séquences formant les 4 modules MPM, déterminés par analogie au modèle topologique proposé pour KscA et indiqués sur la figure I.10.A, sont bien conservées entre les membres de la famille.

Il est important de noter que les études sur ces systèmes sont rares et concernent principalement *OsHKT1* et *OsHKT8*. Des études de localisation par analyse de plantes transformées avec une fusion promoteur::GUS ont montrées que ces deux *HKTs* sont exprimés au niveau des tissus vasculaires. Plus précisément, l'ensemble des données disponibles (incluant des analyses par hybridation *in situ*) révèlent qu'*OsHKT1* est localisé au niveau des tissus vasculaires foliaires mais également au niveau du cortex et de l'endoderme racinaires (Horie *et al.*, 2007), alors qu'*OsHKT8* est principalement localisé au niveau du parenchyme xylémique, dans les racines et dans les feuilles (Ren *et al.*, 2005).

Les données les plus détaillées au niveau fonctionnel concernent OsHKT1. Ce système est l'un des plus proches homologues chez le riz du premier *HKT* caractérisé, *TaHKT1* (du blé), qui est un transporteur de K^+ et Na^+ (OsHKT1 et TaHKT1 présentent 67% d'identité). OsHKT1 a été caractérisé par trois équipes différentes, conduisant à des résultats contradictoires. Exprimé dans l'ovocyte de Xénope, OsHKT1 est décrit comme un système de transport cationique, peu discriminant vis à vis des différents cations alcalins (Golldack *et al.*, 2002), ou comme un transporteur très sélectif de Na^+ (Horie *et al.*, 2001). Exprimé dans la levure, il est décrit soit comme un système de transport perméable à K^+ (Golldack *et al.*, 2002), soit comme un système de transport de Na^+ bloqué par K^+ (Garciadeblás *et al.*, 2003). L'expression d'*OsHKT1* dans des mutants de levure *S. cerevisiae* déficientes pour le transport

de K^+ n'a permis aucune croissance sur un milieu pauvre en K^+ (KCl 0.1 mM). Le test d'inhibition de la croissance sur les souches de levures G19 de *S. cerevisiae*, très sensibles à Na^+ suite à la disruption des gènes *ENA* (qui codent des ATPases excrétrices de Na^+), a révélé que les cellules exprimant *OsHKT1* présentaient plus de sensibilité à Na^+ que celles exprimant *TaHKT1* en présence de 50 et 100 mM de NaCl.

Concernant les autres *HKTs* de riz, quelques données fonctionnelles sont disponibles pour OsHKT2, OsHKT4 et OsHKT8. OsHKT2 n'existe pas chez Nipponbare (*Cf. ci-dessus*) mais a été caractérisé chez le cultivar Pokalli.

L'identité des séquences polypeptidiques de Ni-OsHKT1 est de 91% avec Po-OsHKT2, et les deux systèmes partagent 66–67% d'identité avec TaHKT1. Exprimés dans l'ovocyte de Xénope, OsHKT2 semble fonctionner comme TaHKT1, c'est-à-dire selon un mécanisme de symport Na^+K^+ (Horie *et al.*, 2001), alors qu'OsHKT8 transporte Na^+ exclusivement, à la fois chez la variété tolérante "Nona Bokra" et la variété sensible "Koshihikari" à NaCl. Toutefois, les capacités de transport d'OsHKT8 sont supérieures chez la variété tolérante (Ren *et al.*, 2005). OsHKT4 a été exprimé dans la levure, et il a été décrit comme un transporteur de Na^+ à faible affinité, bloqué par K^+ (Garcia-deblás *et al.*, 2003).

Quelques données concernant l'expression de ces transporteurs dans la plante sont déjà disponibles. Elles ont principalement été obtenues par RT-PCR à partir d'ARNs extraits soit de racines soit de parties aériennes (Horie *et al.*, 2001; Garcia-deblás *et al.*, 2003). Ces données indiquent que, d'une façon générale, le niveau de transcrits des gènes *OsHKTs* dans les feuilles reste assez constant et insensible aux changements de la concentration de K^+ et Na^+ dans la solution externe. Dans les racines, l'expression est moins élevée que celle observée dans les feuilles, à l'exception de celle d'*OsHKT4* et *OsHKT1* chez les plantes carencées en potassium. D'autres données indiquent que l'accumulation de l'ARNm d'*OsHKT1* augmente en conditions de faible concentration en potassium (inférieur à 3 mM) (Horie *et al.*, 2001; Gollack *et al.*, 2002). L'accumulation de l'ARNm d'*OsHKT1* est par contre réprimée par la présence de sodium à forte concentration (supérieure à 30 mM) (Horie *et al.*, 2001).

En résumé, l'ensemble de ces analyses indique que les patrons d'expression des membres de la famille HKT peuvent être très différenciés, certains transporteurs étant exprimés plutôt dans la racine alors que d'autres le sont plutôt dans la feuille. Différents types tissulaires sont concernés par leur expression: épiderme, parenchyme xylémien, phloème. De plus, les données disponibles montrent que la régulation de l'expression de ces gènes lors d'un stress salin est variable: par exemple, l'expression d'*OsHKT1* et *OsHKT2* est réprimée, alors que celle d'*OsHKT8* est activée (Horie *et al.*, 2001, Ren *et al.*, 2005).

I.6.4 Membres de la famille HKT identifiés chez d'autres espèces végétales

D'autres *HKTs* ont été isolés chez plusieurs autres espèces. Chez *Mesembryanthemum crystallinum*, *McHKT1* code pour une protéine montrant 41 à 61% d'identité avec les autres *HKTs* décrits précédemment (Su *et al.*, 2003). Exprimé dans la levure, McHKT1 semble présenter une activité de transport de Na^+ et K^+ avec une sélectivité ionique similaire à celle observée sur TaHKT1. Dans l'ovocyte de Xénope, McHKT1 présenterait la séquence de sélectivité suivante $Rb^+ > Cs^+ > [K^+ = Na^+ = Li^+]$. Ce transporteur a été exclusivement localisé sur la membrane plasmique. L'isoforme isolée est très fortement exprimée dans les feuilles. Elle est également présente dans la tige, les fleurs et dans les gousses de graines,

mais totalement absente au niveau des racines. Une seconde isoforme est exprimée dans les racines seulement. D'après les données immunologiques, un fort signal est détecté dans les feuilles au niveau des tissus vasculaires et entourant les cellules du mésophylle. Dans les racines, le signal semble être confiné au niveau de l'endoderme et de la stèle. Lors d'un stress salin, le niveau de transcrits *McHKT1* augmente d'abord pendant les premières heures (6-10 heures), puis décline et regagne un niveau de pré-stress, avec des cinétiques qui pourraient rendre compte des variations de la capacité de transport de Na^+ chez cette halophyte. D'après ces données, *McHKT1* pourrait donc jouer un rôle dans l'homéostasie ionique chez les halophytes.

Un transporteur HKT a été aussi isolé chez l'orge, à partir des racines (Haro *et al.*, 2005). Ce gène a été nommé *HvHKT1*. Chez l'orge, aucune absorption de sodium à haute affinité n'est détectée lorsque les plantes sont cultivées en présence de fortes concentrations de potassium. Par contre, une telle capacité d'absorption apparaît rapidement après exposition des plantules à un milieu carencé en potassium. Quand il est exprimé dans la levure, *HvHKT1* présente soit une activité d'uniport à Na^+ (ou K^+), soit une activité de symport Na^+-K^+ , dépendant de la construction à partir de laquelle le transporteur est exprimé. L'uniport à Na^+ est insensible à K^+ externe, mimant ainsi le transport de Na^+ par les racines non carencées en K^+ . L'uniport à K^+ est observé seulement quand les levures sont fortement carencées en potassium, et il disparaît quand la teneur de potassium interne augmente. Il est intéressant de remarquer que la mutation du codon AUG initiateur de *HvHKT1* en CUC permet de passer d'un fonctionnement type uniport vers un fonctionnement type symport, qui n'est cependant observé que chez les levures fortement carencées en potassium alors que l'uniport est observé quelques soient les concentrations extérieures. Les auteurs pensent que le fonctionnement en mode symport ne peut pas avoir lieu *in planta*, et considèrent qu'il est très probablement lié à l'expression dans un système hétérologue.

Chez l'eucalyptus, deux ADNc isolés à partir d'*E. camaldulensis* codent des protéines appartenant au groupe des HKT transportant K^+ et Na^+ . Les ADNc ont été exprimés dans l'ovocyte de xénope et une première caractérisation fonctionnelle a été établie (Fairbairn *et al.*, 2000). L'expression des *EcHKTs* dans l'ovocyte de Xénope provoque un transport de K^+ amélioré par Na^+ mais le potassium est transporté aussi en absence de sodium (Fairbairn *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001). Na^+ est transporté en absence de K^+ comme observé chez *TaHKT1* ou *AtHKT1*. Les deux HKTs montrent des similitudes et des différences par rapport à *TaHKT1* ou *AtHKT1*, au niveau de la sélectivité ionique. Parmi les différences, figure la sensibilité aux changements de l'osmolarité de la solution externe. Les solutions hypotoniques (sorbitol à forte concentration) induiraient de forts courants sur des ovocytes exprimant les *EcHKTs*, alors que le même traitement n'induit aucun courant sur des ovocytes exprimant *TaHKT1* ou non injectés (contrôle positif ou négatif) (Liu *et al.*, 2001). Ces courants sensibles au statut osmotique ne sont pas stimulés par le voltage et sont probablement impliqués dans les flux d'eau. La fonction physiologique de ces courants pourrait être en relation avec la nature des niches écologiques occupées par *E. camaldulensis*, qui sont périodiquement immergées. Les caractéristiques fonctionnelles originales des *EcHKTs* pourraient constituer un avantage dans le maintien d'une homéostasie potassique sous certaines conditions environnementales.

I.6.5 Relation structure-fonction des HKTs

Les informations structurales disponibles sur les HKTs sont peu nombreuses à cause, certainement, de la difficulté des analyses par approches biochimiques vu leur faible niveau

d'expression. Les principales données proviennent de prédictions faites *in silico* ou de quelques expériences de mutagenèse.

Les transporteurs HKT semblent dériver de canaux ancestraux apparentés au canal potassique bactérien KcsA. La résolution par cristallographie de la structure du canal KcsA de *Streptomyces lividans* a permis de révéler l'organisation structurale de ce type de système de transport (Doyle *et al.*, 1998). Ce canal possède une structure tétramérique. Chaque unité KcsA est formée de deux segments transmembranaires séparés par une région pore (P). Des analyses *in silico* ont conduit à proposer une structure et un mode de fonctionnement communs aux transporteurs eucaryotes de type TrK ou HKT et aux transporteurs procaryotes *ctrB* et *TrkH* (Durell *et al.*, 1999; Durell et Guy., 1999) (figure I.10). Ces transporteurs seraient en fait constitués de 4 motifs MPM (pour membrane/pore/membrane) répétés, chaque domaine étant formé d'un premier segment transmembranaire (M1), suivie d'une boucle P (ancrée dans la membrane plasmique mais ne la traversant pas entièrement) et d'un second segment transmembranaire (M2). Les 4 domaines MPM seraient assemblés de manière à former une protéine présentant un pore central. Les 4 segments P joueraient un rôle crucial dans la formation "du pore", et seraient responsables de la sélectivité du transporteur. Ce modèle structural est en accord avec les données issues de la caractérisation topologique d'*AtHKT1* (Kato *et al.*, 2001) ou d'*OsHKT8* (Ren *et al.*, 2005), mais elle est incompatible avec les résultats des analyses topologiques faites sur *TaHKT1*, proposant une structure en 10 segments transmembranaires, sans domaines P et réduisant la longueur des extrémités N et C-terminales (Liu *et al.*, 2000).

Les bases moléculaires de la perméabilité au potassium chez les HKTs ne sont pas encore complètement précisées. Cependant, un premier déterminant de la sélectivité Na^+/K^+ a été identifié chez ces transporteurs. Mäser *et al.* (2002) ont mis en évidence, par des études de mutagenèse couplées à des études fonctionnelles, que la présence d'une glycine très conservée dans chacune des quatre boucles P est fortement corrélée à une perméabilité au potassium. Chez les transporteurs HKTs exclusivement perméables à Na^+ , la glycine de la première boucle P est remplacée par une sérine (Figure I.10.B).

L'importance de ce résidu dans la sélectivité des transporteurs à Na^+/K^+ a été confirmée par des expériences de mutagenèse dirigée effectuées en parallèle sur *TaHKT1* (du blé) et ou *AtHKT1* (d'*Arabidopsis*). Dans ces expériences, la glycine a été remplacée par une sérine chez *TaHKT1* et inversement chez *AtHKT1* (Mäser *et al.*, 2002). Il est intéressant de remarquer que les conclusions de ces études prévoient qu'*OsHKT1*, le premier membre de la famille HKT identifié chez le riz, devrait être uniquement perméable à Na^+ puisque son premier domaine pore possède une sérine à la place de la glycine. Les données fonctionnelles que j'ai obtenues dans l'ovocyte de Xénope au cours de ma thèse (Cf. Chapitre III), indiquent cependant clairement que ce transporteur est aussi perméable à K^+ . Il en découle que la nature glycine ou sérine du résidu à cette position du pore ne constitue probablement pas le déterminant moléculaire unique de la perméabilité à K^+ chez les HKTs. Récemment, une équipe espagnole (Haro *et al.*, 2005) a mené une étude allant dans ce sens, montrant chez *HvHKT1* que la mutation d'un codon AUG initiateur en CUC, susceptible donc d'affecter fortement le niveau d'expression de la protéine, provoque le passage d'une activité de type uniport de ce transporteur à une activité de type symport. Cette observation intrigante suggère peut-être que des différences dans le niveau d'expression de la protéine *HvHKT1* conduisent (dans l'ovocyte de xénope ou dans la levure) à des modifications post-traductionnelles (phosphorylations?) se traduisant par des propriétés de perméation différentes. Pris dans leur ensemble, ces résultats démontrent clairement l'existence d'autres déterminants moléculaires

de la sélectivité ionique et du mode de fonctionnement que celui identifié initialement par Mäser *et al.* (2002)

I.6.6 Rôle des HKTs dans la plante

Tous les HKTs caractérisés jusqu'à présent, dans les systèmes hétérologues ou par des mesures directes *in planta*, sont perméables à Na⁺. Certains d'entre eux semblent exclusivement perméables à Na⁺, et les autres le sont également à K⁺. Le rôle de ces transporteurs dans le transport *in planta* de K⁺ n'a pas encore été précisé. Par contre, plusieurs études ont mis en évidence un rôle dans le transport *in planta* de Na⁺ (Laurie *et al.*, 2002; Berthomieu *et al.*, 2003; Ren *et al.*, 2005; Sunarpi *et al.*, 2005), révélant que ces systèmes sont des déterminants importants de la tolérance des plantes à la salinité (figures I.4 et I.11).

Les données bibliographiques correspondantes à l'étude du rôle des quatre HKT de plantes les mieux étudiés sont résumées ci-dessous.

I.6.6.1 TaHKT1 chez le blé

L'absence d'études *in planta* de la fonction de *TaHKT1*, via par exemple l'utilisation de plantes mutantes affectées dans son activité, ne permet pas de conclure précisément sur le rôle de ce transporteur. Cependant, la localisation de l'expression de ce système au niveau du cortex racinaire et au niveau des cellules bordant les tissus vasculaires dans les feuilles (Schachtman et Schröder, 1994) rajouté au fait que le niveau de ses transcrits est augmenté en situation de croissance sur milieu pauvre en K⁺ (Wang *et al.*, 1998) suggère que *TaHKT1* pourrait jouer un rôle important dans l'absorption racinaire de K⁺ à haute affinité, et donc dans le maintien de la concentration cytoplasmique de K⁺ dans les cellules corticales lorsque la concentration de K⁺ dans le milieu extérieur diminuerait. L'analyse de plantes transgéniques surexprimant *TaHKT1* n'a cependant pas permis de mettre en évidence un rôle de ce système dans le transport de K⁺ (Laurie *et al.*, 2002). Au niveau des cellules bordant les tissus vasculaires, *TaHKT1* jouerait un rôle dans la redistribution du potassium du xylème vers les cellules du mésophylle (Schachtman et Schröder, 1994; Schachtman, 2000).

I.6.6.2 AtHKT1 chez Arabidopsis

L'inhibition de l'activité de ce transporteur ou la disruption du gène qui le code se traduisent par une sur-accumulation de Na⁺ dans les feuilles en réponse au stress salin et une augmentation de la sensibilité à NaCl (Berthomieu *et al.*, 2003; Sunarpi *et al.*, 2005). Un rôle d'*AtHKT1* dans le transport de Na⁺ *in planta* a été également mis en évidence par un criblage visant à identifier des suppresseurs de la sensibilité à NaCl chez des mutants *sos3* d'*Arabidopsis* (Rus *et al.*, 2001). Les auteurs ont créé des lignées d'insertion d'ADN-T à partir du mutant *sos3* et ont réalisé ensuite un criblage de la tolérance des lignées vis-à-vis de la salinité. Une série de lignées transformées présentant une tolérance accrue et une faible teneur en Na⁺ a été obtenue. Toutes ces lignées possèdent une activité réduite d'*AtHKT1*.

L'ensemble des données supporte donc l'hypothèse qu'*AtHKT1* est impliqué dans le transport de Na⁺ dans la plante. Ce système constitue un transporteur sélectif de Na⁺.

L'origine de la suraccumulation observée dans les feuilles des mutants n'est pas complètement élucidée. Elle s'explique en partie par une diminution de la recirculation de Na⁺ des feuilles vers la racine par le phloème (Berthomieu *et al.*, 2003). Une augmentation de l'arrivée de Na⁺ dans les feuilles via la sève xylémique chez ces mutants semble également

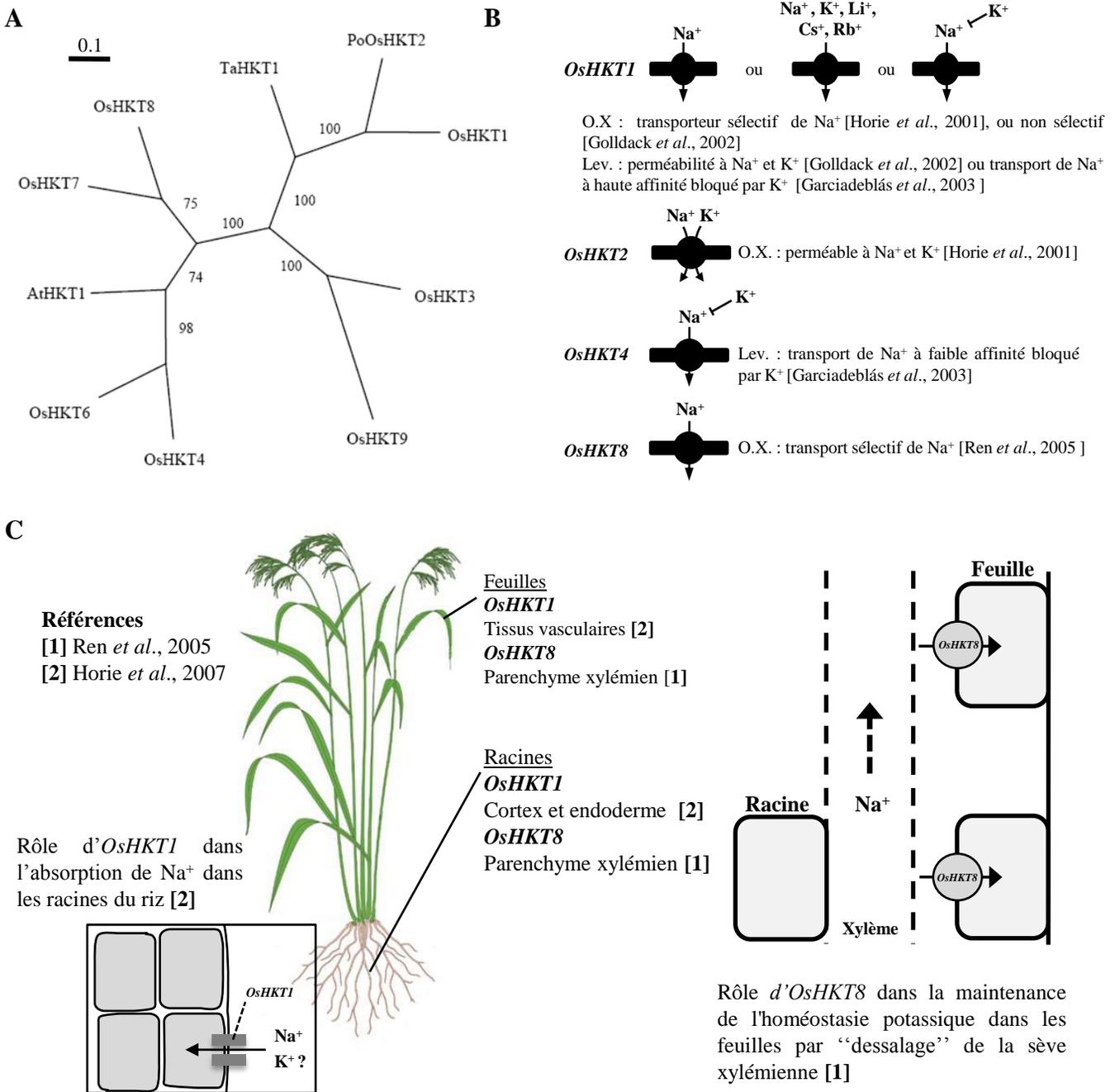


Figure I.11. Les transporteurs de la famille HKT chez le riz.

A. Arbre phylogénétique des transporteurs HKT de riz. En plus des séquences protéiques prédites des gènes *HKT* de riz, celle du transporteur HKT d'*Arabidopsis* et celle transporteur HKT de blé ont été utilisées. L'alignement multiple des séquences protéiques a été réalisé à l'aide du logiciel MUSCLE sur le site www.phylogeny.fr. L'arbre phylogénétique a été construit par la méthode de vraisemblance avec le logiciel Phylip et dessiné avec le logiciel Dendroscope. La représentation est celle de l'arbre consensus présentant les branches les plus fréquemment obtenues sur 100 arbres construits. Les nombres au niveau de chaque branche indiquent les valeurs de bootstrap. Echelle: distance génétique correspondant à 1 différence de séquence pour 10 acides aminés. Abréviations: At, *Arabidopsis thaliana*; Os, *Oryza sativa*; Po, Pokkali, Ta, *Triticum aestivum*. **B.** Données fonctionnelles disponibles sur les membres de la famille HKT chez le riz. Pour *OsHKT1*, différentes caractérisations dans l'ovocyte de xénope (O.X.) ou la levure (Lev.) ont conduit à différentes conclusions. **C.** Localisation de l'expression de différents *HKT* de riz et fonctions proposées des protéines *in planta*.

contribuer à ce phénomène (Sunarpi *et al.*, 2005). *AtHKT1* pourrait donc être impliqué dans la maintenance de faibles concentrations de Na^+ dans les feuilles à la fois en permettant une réabsorption du Na^+ de la sève xylémique au niveau du parenchyme bordant les vaisseaux et en chargeant en Na^+ la sève phloémienne pour permettre sa recirculation vers les racines.

En conclusion, *AtHKT1*, peut être vu comme un système de ré-excrétion de Na^+ à l'échelle de la plante entière, qui prévient une accumulation toxique de cet ion dans les tissus aériens (figure I.4).

I.6.6.3 *OsHKT1* et *OsHKT8* chez le riz

OsHKT1 et *OsHKT8* sont les seuls membres de la famille HKT du riz dont les rôles *in planta* commencent à être élucidés.

L'isolement de deux mutants de riz invalidés dans *OsHKT1* par insertion de transposon *tos17* (Horie *et al.*, 2007) a permis de montrer que l'absence d'expression fonctionnelle de ce gène n'a pas d'effet sur la croissance des plantes dans les conditions standard. Une réduction de la croissance des plantes mutantes est cependant observée, par comparaison avec des plantes de génotype sauvage, lorsque la solution nutritive contient une très faible concentration en K^+ (ce qui est connu pour induire un fort niveau d'expression d'*OsHKT1*) en présence de concentrations en Na^+ relativement faibles (*ca.* 500 μM). Dans ces conditions, la mutation provoque une forte réduction de l'accumulation de Na^+ , à la fois dans les tissus racinaires et dans les tissus foliaires, ainsi qu'une réduction de la croissance des plantes. Des mesures d'influx unidirectionnel de $^{22}\text{Na}^+$ et de Rb^+ sur des plantes entières ont révélé que la mutation réduit fortement l'influx de Na^+ dans les racines et dans les feuilles, mais n'a aucun effet significatif sur les teneurs en potassium (Horie *et al.*, 2007). Rappelons qu'*OsHKT1* est fortement exprimé en conditions de carence en K^+ au niveau des cellules corticales ou au niveau de l'endoderme dans les racines. Dans les feuilles il semble bien s'exprimer autour des tissus vasculaires.

Au niveau fonctionnel, si on ne tient pas compte des contradictions existantes sur la perméabilité au potassium, on remarque que tous le monde s'accorde sur le fait que dans l'ovocyte de Xénope, *OsHKT1* se comporte comme un système perméable à Na^+ bloqué par K^+ . L'ensemble de ces données indique qu'*OsHKT1* est directement impliqué dans l'entrée initiale de Na^+ dans les racines du riz, dans des conditions où la concentration externe de Na^+ n'est pas élevée, conditions dans lesquelles l'utilisation de Na^+ comme osmoticum vacuolaire, en substitution à K^+ , peut devenir bénéfique pour la plante (figure I.11).

Dans un travail récent, des équipes chinoises ont croisé une variété de riz tolérante au sel et une variété sensible. Un QTL, dans la descendance F2, se traduisant par la maintenance ("homéostasie" ionique) de fortes concentrations de K^+ dans les feuilles lors d'un stress salin, a été repéré. La cartographie de ce QTL a montré qu'il correspond à *OsHKT8* (Ren *et al.*, 2005). D'autre part, la localisation de l'expression d'*OsHKT8* dans les tissus xylémiens de la plante, l'analyse de ses propriétés fonctionnelles, montrant une perméabilité stricte à Na^+ et l'analyse de la composition en Na^+ et K^+ de la sève xylémique (Ren *et al.*, 2005) suggèrent que ce transporteur remplit chez le riz des fonctions analogues à celles d'*AtHKT1* chez *Arabidopsis*. La différence de sensibilité au sel entre la variété de riz sensible au sel et la variété résistante proviendrait d'une différence du niveau d'activité du transporteur.

En résumé, toutes les données obtenues sont compatibles avec l'hypothèse qu'OshKT8 jouerait un rôle dans la maintenance de l'homéostasie potassique dans les feuilles en "dessalant" la sève xylémique (figure I.11).

I.7 Contexte et objectifs de ma thèse

Les données disponibles sur le membre (unique) de la famille HKT chez *Arabidopsis* (AtHKT1) et sur le membre OsHKT8 de cette famille chez le de riz, mettent clairement en évidence un mécanisme, nouveau et original, impliqué dans la tolérance des plantes à la salinité. Ce mécanisme, auparavant non démontré chez les plantes, permet une détoxification des feuilles en Na^+ par la recirculation de cet ion vers les racines via le phloème.

Les plantes se trouvent face à un dilemme concernant le transport du sodium. L'absorption de sodium est utile pour abaisser le potentiel osmotique, pouvoir absorber de l'eau et maintenir la turgescence, mais l'excès de sodium est toxique. De nombreuses études ont porté sur le rôle toxique de Na^+ dans la plante lors d'un stress salin et l'élucidation des mécanismes de tolérance à ce stress.

Le rôle de Na^+ à plus faibles concentrations est beaucoup moins connu. Le consensus actuel est que l'énergisation de la membrane cellulaire repose uniquement sur un gradient de protons. Cependant, les données disponibles pour certains HKT encouragent à continuer à imaginer que Na^+ (à des concentrations non toxiques) puisse entraîner des systèmes de symport et énergiser l'absorption active de K^+ . Plusieurs indices semblent appuyer cette hypothèse, par exemple le couplage des transports Na^+/K^+ observé dans l'ovocyte de Xénope pour TaHKT1 ou OsHKT2. Malheureusement aucun indice *in planta* de ce type d'énergisation du transport de K^+ n'a été obtenu pour le moment. De façon plus générale, le rôle des HKT perméables à K^+ dans l'absorption et le transport de cet ion dans la plante reste largement incompris. Le constat, aujourd'hui, est que les données sur la famille HKT de riz, pour certaines contradictoires, pour d'autres incomplètes, manquent d'intégration. Ceci a fortement handicapé l'appréhension du rôle de ces systèmes dans la plante.

Chez le riz, sept à neuf HKT (suivant les cultivars) sont présents dans le génome. Les données disponibles indiquent déjà que certains d'entre eux n'ont pas les mêmes propriétés fonctionnelles ni la même localisation tissulaire qu'AtHKT1 ou OsHKT8, ce qui suggère, finalement qu'ils jouent dans la plante des rôles distincts de ceux de ces deux transporteurs.

Dans ce contexte, mon travail a eu pour premier objectif d'examiner la diversité fonctionnelle au sein de la famille HKT du riz en exprimant trois d'entre eux dans l'ovocyte de Xénope. Dans cette approche, nous avons tenté de caractériser différentes "empreintes" fonctionnelles, en pensant que l'obtention de ce type de connaissance constitue très certainement une condition préalable à l'analyse de la fonction *in planta* de ces transporteurs. Ces informations ont été complétées par des expériences d'hybridation *in situ* permettant de localiser l'expression des trois HKTs de riz au niveau tissulaire. Les résultats de ce travail sont présentés sous forme d'un article, constituant le chapitre III du présent mémoire.

Ensuite, un second objectif a été d'isoler des lignées de riz invalidés dans certains gènes HKT. Il nous paraissait indispensable de disposer d'un tel matériel pour pouvoir tester les hypothèses sur le rôle de ces systèmes, émises sur la base des données fonctionnelles et de localisation. Ce travail, consacré donc à la production d'outils (mutants), est présenté dans le chapitre IV de ce mémoire.

Enfin, dans le contexte des résultats controversés disponibles dans la bibliographie sur les propriétés fonctionnelles et le rôle d'OsHKT1, notre dernier objectif a été de démarrer une analyse de la fonction *in planta* de ce transporteur en effectuant des analyses phénotypiques comparatives, entre des plantes de génotype sauvage ou mutant perte de fonction. Ces analyses ont été complétées par une caractérisation électrophysiologique de l'activité d'OsHKT1 *in planta*, dans les cellules où il est exprimé, par la mesure du potentiel de membrane des cellules corticales racinaires. L'analyse a été réalisée en comparant les courants enregistrés sur des plantes sauvages avec ceux enregistrés sur des lignées mutantes perte de fonction. Les résultats de cette approche sont présentés dans le chapitre V de ce mémoire.

*

* *

CHAPITRE II

Matériels et méthodes

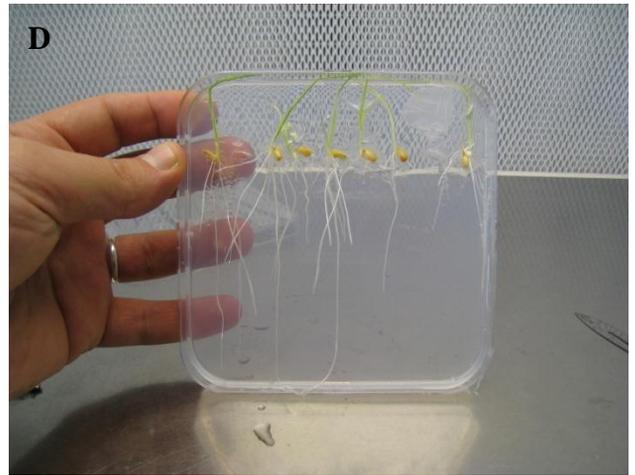


Figure II.1. Les différents systèmes de culture de riz.

A. En serre sur terreau en barquettes. **B.** En serre en pots individuels. **C.** Sur vermiculite. **D.** En chambre de culture sur milieu gélosé, en boîtes de Petri. **E.** Sur papier filtre en boîtes de Petri. **F.** En chambre de culture, sur tablar en hydroponie.

II.1 Matériel végétal et systèmes de culture

II.1.1 Matériel végétal

Les études présentées dans ce mémoire ont été réalisées sur le riz (*Oryza sativa*). Les différents géotypes utilisés dans cette étude, sauvage ou mutants perte de fonction, sont issus du cultivar Nipponbare (ou GA3). Le cultivar Nipponbare appartient à la sous-espèce japonica, une variété de riz pluvial traditionnelle peu tolérante à la salinité, cultivée préférentiellement au Japon et dans les régions de climat tempéré, comme en Europe.

Les semences de mutants invalidés ont été obtenues à partir de plantes issues d'une série de purifications de lignées mères identifiées dans la collection internationale gérée par le NIAS¹ (Cf. § II.5).

Les semences des plantes sauvages ont été fournies par le CIRAD², Montpellier. L'homogénéité des cultures était généralement bonne, néanmoins un premier tri a été effectué après le nettoyage des semences et un second tri au moment du repiquage.

II.1.2 Les différents systèmes de culture de riz

En fonction des objectifs expérimentaux, différents systèmes de culture ont été utilisés:

II.1.2.1 Culture sur terreau en terrines

Pour réaliser le géotypage par PCR des plantes issues de grains envoyés par le NIAS (descendance F1 ou F2 obtenue par autofécondation de la lignée étiquetée), les grains reçus ont été semés sur des terrines en plastique à fond perforé de dimensions 50 x 37 x 11 cm contenant du terreau (Humin N9 Neuhaus, Klasmann-Deilmann, Allemagne) (figure II.1.A). Le substrat est mélangé avec du sable grossier de silice (Calibre supérieur à 2 mm), les proportions volumiques de terreau et de sable sont respectivement de 80 et 20%. Le pH est contrôlé avant le remplissage des terrines. Pour réaliser ce contrôle, 50 g du mélange, sans éléments grossiers, sont mélangés à 100 mL d'eau mono-distillée. Après 24 heures, on mesure le pH de la solution qui doit être compris entre 4,5 et 5,5. La culture des plantes est réalisée dans les serres de confinement du CIRAD-Montpellier dans les conditions suivantes : lumière naturelle, 60-70% d'humidité relative, température nuit (min-max) : 20-23°C et température jour (min-max): 27-29°C.

L'irrigation des terrines se fait moyennant des arrosages en surface dépendants de l'état du dessèchement du substrat contrôlé par une sonde d'humidité. Les plantes reçoivent un engrais à action lente (Bascote Plus 6M ; Compo, Allemagne) (azote 16% , P₂O₅ 8%, K₂O 12%, MgO 2% et soufre 5%) appliqué en surface juste après la levée, à raison de 1 à 2 g/litre de terreau.

Pour la production de grains, les plantes retenues après géotypage sont transférées en pots individuels.

¹ National Institute of Agrobiological Sciences - JAPAN

² Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement

II.1.2.2 Culture de riz en pots individuels

Les plantes sont cultivées en pots individuels (repiquées ou mises directement à pousser en pots) (figure II.1.B) pour servir de polinisateurs lors des croisements (Cf. § II.5) ou pour la production de grains. Avant l'installation des plantes, les pots sont remplis de terreau (volume optimal conseillé : 5 litres de substrat Humin N9 Neuhaus, Klasmann-Deilmann, Allemagne) puis humidifiés jusqu'à avoir une motte dense. Les plantes sont transférées en motte pour protéger leurs racines. Les pots sont ensuite immédiatement installés dans les serres du CIRAD-Montpellier dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la culture de riz sur terreau (Cf. ci dessus). Les pots sont installés sur des tablaris contenant une hauteur d'eau de 3-4 cm. L'eau est changée une fois par semaine et sa température est contrôlée à 20-23°C.

A maturité, les grains ne sont pas coupés de leurs épis mais sèchent sur pied. Pour cela, il suffit d'évacuer l'eau des tablaris et laisser les plantes séchées dans leurs pots. Quand la plante est parfaitement sèche (feuilles et tiges prennent une couleur jaune dorée), les grains sont récoltés puis mis dans des sachets qui sont placés pour séchage dans une étuve ventilée à 30 °C pendant 48 heures. Enfin les grains sont conservés à 5°C et 30% d'humidité.

II.1.2.3 Culture de riz sur vermiculite

L'utilisation de ce système s'est imposée suite aux problèmes de germination rencontrés sur les lots de grains issus du rétrocroisement. Ces derniers, très sensibles, germaient très difficilement dans le terreau. Celui-ci a été substitué par de la vermiculite minérale laminaire de calibre 1-4 mm. La vermiculite est un substrat inerte et neutre (pH 7,0) stérile, léger et hydrophile, permettant une meilleure aération et rétention d'eau, ce qui évite l'assèchement du substrat et facilite la levée. La culture des plantes mutantes de riz sur vermiculite a été réalisée dans les serres du CIRAD-Montpellier dans les mêmes conditions que celles observées pour la culture de riz sur terreau ou en phytotron (figure II.1.C). Les plantes ont été maintenues sur vermiculite jusqu'au stade 3 feuilles. Elles ont ensuite été transférées en pots individuels.

II.1.2.4 Culture de riz en boîtes de Petri sur papier filtre ou gel d'agarose

Ce système a été utilisé dans le but d'obtenir des jeunes plantules âgées de 7 à 15 jours. Les grains de riz débarrassés de leurs glumelles sont désinfectés dans une solution d'eau de javel à 15% pendant 30 min avec agitation à 100 tour/min, puis ils sont rincés abondamment 5 fois avec de l'eau stérile.

Dans les expériences où les plantules seront transférées en hydroponie, dix grains sont déposés dans des boîtes de Pétri rondes (Optilux 10 x 2 cm) contenant une feuille de papier Whatman autoclavée et humectée soit avec 5 mL d'eau stérile (expériences de stress sur plantes entières, figure VI.3), ou d'une solution contenant CaSO_4 1 mM, MES-BTP 2 mM, pH 6,0 (pour les expériences de mesure de flux racinaires, figure V.2).

Après avoir scellé les boîtes au parafilm, la germination des plantules a lieu dans une chambre de culture à 25°C à la lumière (intensité lumineuse de $500 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ et photopériode de 14/10 heures jour/nuit) (figure II.1.E) ou à l'obscurité (les boîtes étant enveloppées dans du papier aluminium). Pour les expériences de mesure du potentiel de membrane des cellules du cortex racinaire, les grains désinfectés sont mis à germer dans des boîtes de Petri carrées (Optilux 12 x 12 x 1,5 cm) (figure II.1.D) contenant de l'agarose ultra pur (Sigma-Aldrich, France, Référence A7921) 0.8% P/V dissous dans une solution de CaSO_4 1 mM, MES-BTP 2

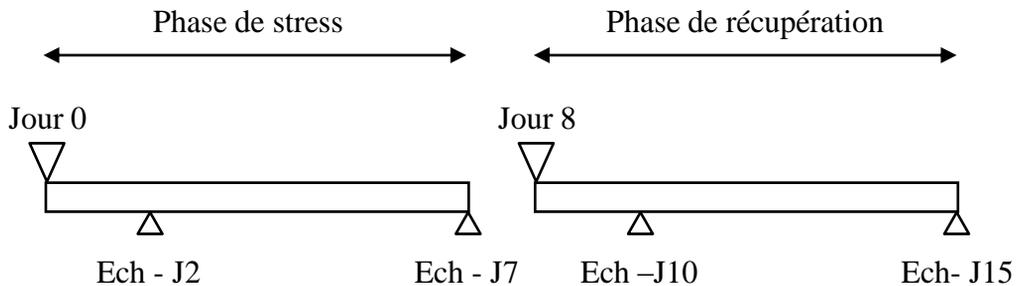
A**B**

Figure II.2. Protocole d'application de stress à des plantules de riz.

A. Application de stress à des plantules de riz âgées de 3 à 5 semaines. Les plantules ont préalablement poussé en hydroponie sur tablar (figure II.1) sur un milieu contenant K^+ 1,1 mM et Na^+ 200 μ M. Les plantules sont transférées en bassines pour l'application des stress. Bac de gauche: Traitement contrôle (K^+ 1,1 mM; Na^+ 200 μ M), bac du milieu: stress salin modéré (+NaCl 40 mM), Bac de droite : Carence K^+ modérée (K^+ 100 μ M; Na^+ 600 μ M). **B.** La phase de stress dure 1 semaine. Elle est suivie d'une phase de récupération d'une semaine. Deux échantillonnages sont effectués pendant chaque phase aux deuxièmes jours (Ech-J2, J10) et derniers jours (Ech-J7, J15). Les solutions dans les bassines sont renouvelées tous les 3 ou 4 jours pendant chacune des deux phases. La concentration en K^+ et Na^+ des solutions sont dosées dans les solutions fraîches et juste avant le renouvellement.

mM, pH=6,0 (figure II.1.E). Les boîtes sont placées dans une chambre de culture en position verticale. La germination a lieu à l'obscurité (boîtes recouvertes de papier aluminium) à 25°C.

II.1.2.5 Culture de riz en milieu hydroponique

Après 5-7 jours de germination dans les boîtes de Petri rondes (*Cf.* ci-dessus), les plantules sont cultivées sur un dispositif hydroponique constitué d'un tablard muni d'un système de flotteurs sous lequel circule une solution nutritive en continu grâce à une pompe d'aquarium (figure II.1.F). Les plantules sont placées dans le fond de gobelets en plastique perforés de façon à laisser émerger le système racinaire. Le système foliaire se trouve à l'intérieur du gobelet, il est soutenu par des granulés de pouzzolane autoclavés (roche naturelle volcanique). Le gobelet et la plantule sont ensuite immergés dans la solution de façon es-ce que le niveau ne dépasse pas la base de la tige.

Dans les expériences de stress sur plantes entières (figure VI.3) la composition de la solution nutritive pendant les deux premières semaines est: KNO_3 0,7 mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1,2 mM, MgSO_4 1,6 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 mM, KH_2PO_4 0,8 mM, Na_2FeEDTA 60 μM , MnSO_4 20 μM , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 0,32 μM , ZnSO_4 1,4 μM , CuSO_4 1,6 μM , H_3BO_3 45,2 μM . Pendant les semaines suivantes, la concentration en oligo-éléments et en KH_2PO_4 sont divisées par deux, la concentration en Na_2FeEDTA est augmentée à 100 μM , les autres constituants restent inchangés. Le pH de la solution est ajusté à 5,3-5,5 deux fois par jour. La solution est renouvelée tous les 3 jours pendant les 9 premiers jours, puis tous les deux jours.

Dans les expériences de mesure de flux racinaires (figure V.2), la solution de culture hydroponique contient CaSO_4 1 mM, MES-BTP 2 mM, pH=6,0.

II.2 Application des stress

II.2.1 Stress salin et carence en K^+ en hydroponie

Cette expérience a été effectuée dans un phytotron (CIRAD-Montpellier), dans les conditions suivantes: 12 h jour/12 h nuit, température jour: 27-29°C, température nuit: 24°C, hygrométrie: 55-65%.

Selon leur stade de croissance, juvénile (5 feuilles) ou adulte (plus que 5 feuilles) les plantes ont passé 15 ou 21 jours en culture sur le système hydroponique décrit dans le paragraphe précédent. Elles ont été ensuite transférées dans des bacs de 10 litres (figure II.2.A).

Trois traitements d'une semaine ont été effectués: (1) un traitement contrôle où les plantes ont été laissées dans les mêmes conditions de milieu que celles où elles avaient poussés précédemment (K^+ 1,1 mM, Na^+ 200 μM); (2) un traitement où elles ont subi un stress salin modéré (addition de NaCl 40 mM dans la solution extérieure); (3) un traitement où elles ont été soumises à une carence modérée en potassium (K^+ 100 μM et Na^+ 600 μM dans la solution extérieure). Une concentration contaminante de K^+ voisine de 100 μM (déterminée par spectrophotomètre de flamme) est systématiquement présente dans la solution nutritive. Après la phase de stress, les plantes ont été replacées dans le milieu contrôle initial pendant une semaine (phase de récupération) (figure II.2.B). Des prélèvements d'échantillons de feuilles et de racines ont été effectués aux jours 2 et 7, pendant la phase de stress et la phase de récupération. La masse (fraîche et sèche) des parties aériennes et des racines a été analysée, ainsi que la teneur des parties aériennes et racinaires en K^+ et Na^+ . Les résultats des expériences sur les plantes au stade adulte, très hétérogènes, n'ont pas été exploités. Dans le

traitement carence, le potassium n'est apporté (100 μM) que par la contamination du système, les sels KNO_3 (0,7 mM) et KH_2PO_4 (0,4 mM) de la solution nutritive étant remplacés par $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (0,35 mM) et Na_2PO_4 (0,4 mM).

II.2.2 Stress de carence en K^+ sur boîtes de Petri

Le stress de carence sévère en potassium (disponibilité de K^+ inférieure à 1 μM) a été appliqué en faisant germer les grains sur un milieu contenant CaSO_4 1 mM, MES-BTP 2 mM, pH=6,0. Des précautions ont été prises lors de la mise en germination de grains en boîtes (sur gel d'agarose et/ou sur papier filtre) pour éviter les contaminations notamment par l'utilisation d'eau MilliQ doublement filtrée et de poudre d'agarose ultra pure. Des précautions similaires ont été prises pour préparer les solutions de percolation utilisées pour les expériences d'électrophysiologie. La composition ionique de ces solutions a de plus été systématiquement contrôlée (par spectrophotométrie de flamme) afin de déterminer le niveau exact de contamination par K^+ .

II.3 Prétraitement des racines pour la mesure du potentiel membranaire et des flux nets de K^+ et Na^+

II.3.1 Prétraitement pour les mesures de potentiel de racine

Après 6 à 12 jours de culture dans les boîtes de Petri, un fragment de la racine principale (embryonnaire) de plantes de riz de génotype sauvage et/ou mutant est excisé à 5 cm de l'apex et à 1 cm du caryopse avec un scalpel ce qui permet d'écarter du matériel expérimental la partie basale de la racine contenant parfois un enchevêtrement de racines secondaires, pouvant gêner les mesures. Ensuite, le segment de racine est placé sur un support spécial (portoir en plexiglas) (figure II.10.A). Ce dernier est immergé pendant 2-3 heures dans une solution de CaSO_4 1mM, pH 6,0 avant d'être placé dans la cuve de percolation pour le début des mesures (figure II.10.A et II.10.B).

II.3.2 Prétraitement pour les mesures de flux nets racinaires

Les racines sont excisées et incubées pendant 1 h dans une solution CaSO_4 1mM, pH=6,0 (pré-traitement de récupération: "washing") dans une chambre de culture à 28°C avant le début des mesures.

II.4 Biologie moléculaire

II.4.1 Extraction, amplification et analyse des acides nucléiques

II.4.1.1 Extraction d'ADN génomique

Deux méthodes ont été utilisées :

Méthode au MATAB (Gawel et Jarret, 1991)

Des échantillons de 100 mg de feuilles de plantes de riz de génotype mutant et/ou sauvage âgées de 4 à 6 semaines cultivées en pots ou en terrines en serre sont prélevés et introduits dans des microtubes de collecte en polypropylène de 1,2 mL (Qiagen, France) contenant une bille en inox autoclavée. Les tubes numérotés et munis de couvercles sont installés dans des boîtes 96 puits adaptées en plastique. Après refroidissement des boîtes à l'azote liquide, un broyage des échantillons de feuilles est effectué en utilisant un broyeur (Mixer Mill MM 300,

Qiagen, France) pendant 1 min 50 sec à 25 coups par seconde. Après un passage dans l'azote liquide, l'opération de broyage est répétée en inversant la position des boîtes dans le broyeur. Les tubes subissent ensuite une brève centrifugation pendant 1 min à 6200xg pour faire descendre le broyat. Du tampon d'extraction MATAB [Tris HCl 100 mM pH=8,0, NaCl 1,5 M, EDTA 20 mM pH=8,0, MATAB (2%), Na₂SO₃ (0,5%), PEG 6000 (1 %)] préchauffé à 72°C est mélangé au broyat. Après homogénéisation, l'ensemble est incubé 20 minutes dans un bain marie à 72°C. Les débris cellulaires et les protéines en solution sont éliminés par ajout de 360 µL de C/I (chloroforme/alcool isoamylique, 24/1 v/v) suivi d'une centrifugation de 20 minutes à 6200xg. Une aliquote de 250 µL de surnageant est récupérée (pour chaque échantillon) et déposée sur une nouvelle plaque. Les acides nucléiques sont précipités par l'addition de 200 µL d'isopropanol, suivie d'une centrifugation de 20 minutes à 6000xg (précipitation isopropanolique). Après deux lavages par 300 µL d'éthanol à 70%, et une dernière centrifugation de 10 min à 6000xg, le culot d'ADN est repris dans 50µL d'eau additionnés de 1µL de RNase (RNase A 100 mg/mL, Qiagen, France), et laissé à température ambiante pendant la nuit dans le but de dégrader les ARN présents dans la suspension d'ADN. Les extractions d'ADN sont conservées à -20°C.

Méthode au CTAB (Murray et Thompson, 1980)

Cette méthode permet l'obtention d'ADN génomique de plus grande pureté, par rapport à la méthode au MATAB. L'ADNg extrait par cette méthode a été utilisé dans certaines expériences de PCR.

Entre 300 et 400 mg de feuilles de plantes de riz de génotype sauvage ont été utilisés pour l'extraction. Les échantillons sont prélevés puis broyés dans des tubes Eppendorfs 1,5 mL contenant une bille en inox autoclavée. Trois cents microlitres du tampon d'extraction CTAB 2X (Tris HCl 100 mM, pH=8,0, NaCl 1,5 M, EDTA 20 mM, CTAB 2 % P/V) sont ajoutés, puis le tout est incubé à 65°C pendant au moins 10 minutes. Après refroidissement, 300 µL de chloroforme sont ajoutés et le mélange est fortement agité (à l'aide d'un vortex). Après une brève centrifugation (9xg pendant 5 s), la phase supérieure (aqueuse) est ensuite transférée dans un nouveau tube de collecte et additionnée de 300 µL de 2-propanol pour précipiter l'ADN. Après agitation au vortex et centrifugation, le surnageant est éliminé, et le culot d'acides nucléiques lavé avec 500 µL d'éthanol à 70%. Après une brève centrifugation, l'éthanol est éliminé et le culot séché à l'air. Enfin le culot d'ADN est repris dans 100 µL de tampon TE (Tris HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM).

II.4.1.2 Extraction d'ADN plasmidiques d'*Escherichia coli*

Mini-extraction

Les plasmides sont extraits de bactéries cultivées pendant une nuit dans 2-3 mL de milieu LB contenant l'antibiotique approprié. Les mini-préparations de plasmides sont réalisées en utilisant le kit "Wizard Minipreps" (Promega, Madison, USA) selon le protocole préconisé. Pour 1,5 mL d'extraits bactériens initial, le culot d'ADN plasmidique récupéré à l'issue du protocole est resuspendu, après séchage, dans 20 µL d'eau.

Maxi-extraction

Sur une culture de 100 mL, les plasmides sont extraits et purifiés en utilisant le kit "Nucleobond AX" (Macherey-Nagel GmbH & Co, Düren, Allemagne), selon le protocole préconisé par le fournisseur. Ce kit permet l'obtention d'une préparation d'ADN de grande pureté, utilisée pour les clonages.

II.4.1.3 Obtention des ADNc

Extraction d'ARN de feuilles ou de racines

Deux méthodes ont été utilisées :

- *Méthode d'extraction d'ARN totaux au Trizol* (Chomczynski et Mackey, 1995)

Un échantillon de feuilles ou racines de riz (entre 0,5 et 1 g de matière fraîche) est broyé dans un mortier en présence d'azote liquide. La poudre est transférée dans un tube Falcon pour être homogénéisée dans du tampon Trizol (Invitrogen) (10 mL de Trizol /g de MF). L'homogénat est incubé pendant 5 minutes à température ambiante pour permettre la dissociation complète des complexes nucléoprotéiques. Après addition de 0,2 mL chloroforme par mL de Trizol, traitement qui assure l'extraction des protéines, les tubes sont fermés hermétiquement et secoués vigoureusement à la main pendant 15 secondes puis laissés à température ambiante pendant 2 à 3 min. Les solutions sont transférées dans des tubes "clic-clac" (qualité ARN), qui sont centrifugés à 12000xg pendant 15 min à 4°C. Après la centrifugation, le mélange se sépare en une phase inférieure rouge, contenant le phénol et le chloroforme, une interphase et une phase supérieure aqueuse peu colorée. Les ARN sont présents exclusivement dans la phase aqueuse. Le volume de la phase aqueuse est d'environ 60% du volume de Trizol utilisé pour l'homogénéisation. Après transfert de la phase aqueuse dans un tube neuf, l'ARN est précipité par ajout de 0,5 mL d'alcool isopropylique par mL de Trizol utilisé au départ. Après incubation pendant 10 min à température ambiante, les tubes sont centrifugés 10 min à 15000xg à 4°C. L'ARN précipité forme un culot translucide au fond du tube. Le surnageant est enlevé et le culot d'ARN est lavé avec 1mL d'éthanol à 75% par mL de Trizol. Après une centrifugation à 7500xg pendant 5 min à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot est séché pendant 5 à 10 min sous vide ou à l'air libre. Une fois sec, le culot est solubilisé dans de l'eau prétraitée par du DEPC (addition de 50 ou 100 µL d'eau selon la taille du culot). L'ARN est dénaturé pendant 10 min à 55-60°C puis congelé. La concentration des ARN est déterminée par spectrophotométrie à 260 nm.

- *Méthode d'extraction d'ARN totaux avec le mini Kit "QIAGEN RNeasy"*

Cette méthode a été utilisée dans le but d'extraire des ARN de racines de riz, pour une utilisation dans des expériences de PCR en temps réel (Cf. § II.4.2). Le kit "RNeasy Mini Kit" (Qiagen, France), dont le principe est basé sur la fixation sélective de l'ARN sur une résine (gel de silice) contenue dans une colonne centrifugeable. En résumé, 100 mg de racines sont lysées dans le tampon dénaturant à base d'isothiocyanate de guanidine (tampon RLT, utilisé à raison de 600 µL par 100 mg d'échantillon) additionné de β-Mercaptoéthanol (1 µL pour 100 µL de tampon de lyse), et l'ensemble est homogénéisé par pipetages successifs. Le mélange est récupéré dans un tube eppendorf et centrifugé à 15,7xg pendant 3 min avant addition d'éthanol à 70% (vol/vol). La suspension est déposée sur colonne et centrifugée à 9,3xg pendant 15 s. La colonne est lavée (par 350 µL de tampon RW1), débarrassée des traces d'ADN génomique (DNaseI: 10 µL; tampon RDD: 70 µL; 15 min; température ambiante) puis lavée une seconde fois (tampon RW1: 350 µL). Les ARN fixés à la colonne sont traités deux fois par un tampon de lavage RPE (500 µL) avant élimination de toute trace d'éthanol par une centrifugation à 9,3xg pendant 2 minutes, puis à 15,7xg pendant 1 min. L'élution des ARN est réalisée en déposant sur la colonne de l'eau (50 µL) prétraitée par du DEPC, l'éluat est récupéré en centrifugeant la colonne à 9,3xg pendant 1 min. L'intégrité des ARN est vérifiée par électrophorèse. La concentration en ARN de la préparation est déterminée en utilisant le kit "RiboGreen RNA quantitation kit" (Cf. § II.4.1.4).

Traitement à la DNase

Aucune méthode d'isolement d'ARN ne permet de séparer entièrement l'ARN et l'ADN génomique même quand ce dernier n'est pas visible sur gel. Pour éliminer toute trace d'ADN génomique et éviter toute amplification aspécifique au cours de la réaction de RT-PCR, les ARN sont traités à la DNase avec le kit "DNase I" (Invitrogen). L'enzyme (1U / μL dans la solution stock) est ajoutée à l'échantillon à raison de une unité par microgramme d'ARN, en présence de 1 μL du tampon 10 X fourni par le kit, dans un volume réactionnel final ajusté à 10 μL par addition d'eau (prétraitée par du DEPC). Après 15 minutes à température ambiante. l'enzyme est inactivée par l'addition de 1 μL d'EDTA 25 mM, suivie d'une incubation à 65°C pendant 10 min.

Transcription inverse

Elle a pour but de transcrire l'ARN messager (ARNm) en ADN complémentaire (ADNc), en utilisant la transcriptase inverse. Cette enzyme utilise les désoxyribonucléotides triphosphates pour former une chaîne d'ADN complémentaire à la chaîne d'ARNm servant de matrice. Comme toutes les ADN polymérase, la transcriptase inverse n'est capable d'ajouter des nucléotides qu'à l'extrémité 3' d'une amorce déjà appariée à la matrice. L'amorce utilisée est un oligo-dT qui s'hybride à la queue poly-A des ARNm. Cette technique est appliquée en utilisant le kit SuperScript III Reverse transcriptase (Invitrogen).

La rétrotranscription est réalisée à partir de 5 μg d'ARN totaux traités à la DNase. Les ARN sont dénaturés à 65°C pendant 5 minutes en présence de 500 ng d'oligo(dT)₁₂₋₁₈ et 1 μL de mélange de dNTP (chacun à une concentration de 10 mM), dans un volume final de 13 μL (ajusté par addition d'eau). Le traitement à forte température permet d'enlever les structures secondaires des ARN. Immédiatement après, le tube est plongé dans de la glace. Après une brève centrifugation, 4 μL de tampon de réaction fourni avec l'enzyme, 1 μL de DTT 0,1 M, 1 μL de RNaseOUT (Recombinant RNase Inhibitor, Invitrogen 40 U/ μL) et 1 μL de SuperScriptIII RT (Invitrogen, 200 U/ μL) sont ajoutés, dans un volume final de 20 μL . Après un mélange par inversion, le tube est incubé à 50°C pendant 1 heure. L'enzyme est ensuite inactivée à 70°C pendant 15 minutes.

II.4.1.4 Méthodes d'analyse des acides nucléiques

Quantification des acides nucléiques

-Dosage au spectrophotomètre à UV

La Densité optique (DO) de l'échantillon est déterminée à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Smartspec 3000 (Biorad). La concentration en acides nucléiques est calculée en utilisant les correspondances suivantes : 1 unité de DO équivaut à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ADN double brin et à 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ADN simple brin ou d'ARN.

-Dosage au ribogreen

Cette technique de quantification utilise le réactif ribogreen contenu dans le kit "RiboGreen RNA quantitation Kit" (Molecular Probes, France). Le ribogreen est un intercalant fluorescent des acides nucléiques permettant de quantifier aussi bien l'ADN que l'ARN. Cette technique est plus sensible (seuil de détection : 1 ng/mL) que la mesure de l'absorbance à 260 nm, et ne nécessite de ce fait qu'une faible quantité d'échantillon (1-2 μL). Le dosage est effectué selon le protocole préconisé par le fournisseur du kit. En résumé, les points de

gamme sont obtenus en diluant une solution mère d'ARN ribosomal standard d'*E. Coli* (2µg/mL) dans du TE. Après addition du réactif Ribogreen et incubation de 5 minutes à température ambiante, le dosage est réalisé à l'aide d'un lecteur de plaque (VICTOR3 Multilabel Counter 1420, Perkin-Elmer, Wellesley, USA).

Méthodes de séparation des acides nucléiques par électrophorèse

-Analyse de fragments d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose

Pour analyser la taille de produits issus d'une restriction enzymatique ou pour purifier un fragment d'ADN, une électrophorèse horizontale est réalisée dans un gel contenant 0,8 % à 1,2% d'agarose, dans du tampon TAE 1X additionné de quelques gouttes d'une solution de bromure d'éthidium (5 µg/mL) afin de colorer les fragments d'ADN. Avant d'être déposé sur le gel, l'échantillon est mélangé à du tampon de dépôt 10X (0,25% bleu de bromophénol, 0,25% xylène cyanol FF et 50% glycérol; 0,1 volume de tampon de dépôt pour 0,9 volume d'échantillon). Après migration à voltage constant (20 à 100 V), le gel est visualisé sous lumière UV (254 nm).

-Electrophorèse des ARN sur gel non dénaturant

Tout le matériel est décontaminé (et les RNases dénaturées) par une immersion dans une solution de SDS 0,5% et NaOH 0,5 N pendant une nuit. Le lendemain, le matériel est rincé avec de l'eau osmosée puis de l'eau autoclavée. La solution d'ARN (1 µL) est mélangée à 1µL de "bleu ARN" et 8µL formamide. Après un traitement de 10 min à 65°C, l'échantillon est déposé sur un gel d'agarose 1% (1,5 g agarose, 150 mL de tampon TAE 1X; 1,5µL de BET 1%, dans de l'eau prétraitée au DEPC). Les ARN sont séparés par électrophorèse à voltage constant (100 V) pendant 40 min. La visualisation se fait sous lumière UV.

Analyse par Southern Blot

-Digestion de l'ADN génomique (Cf. § II.4.3.1)

-Transfert des fragments d'ADN sur une membrane de nylon

Les ADN digérés, additionnés de 2 µL de tampon de charge 6X (EDTA 100 mM pH 8,0; Glycérol 50 % v/v; H₂O 30 % v/v; Xylène cyanole 125 % p/v; Bleu de bromophénol 125 % p/v) sont séparés par migration sur gel d'agarose (0,8 %) à 40 V toute une nuit. Le lendemain, les fragments d'ADN sont partiellement dépurinés en trempant le gel 30 min dans un bain de HCl 0,25 N. Le gel est ensuite rincé trois fois 5 min à l'eau distillée, puis il est plongé 30 min dans du tampon de dénaturation (NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M). Après 2 nouveaux rinçages à l'eau de 5 min, les fragments d'ADN sont stabilisés en plongeant le gel deux fois 15 min dans du tampon de neutralisation (TRIS 0,5 M pH 7,2, NaCl 1,5 M, EDTA 1 mM). Le gel est finalement rincé brièvement dans du SSC 10X (NaCl 1,5 M, tri-sodium citrate 150 mM). Les fragments d'ADN contenus dans le gel d'agarose sont transférés par capillarité sur une membrane de nylon chargée positivement. Pour cela, deux bandes de papier Whatman imbibées de SSC 10X sont posées sur un pont surplombant une cuve plastique contenant du SSC 10X. Les extrémités des bandes trempant dans la cuve de part et d'autre du pont permettent d'imbiber le papier pendant toute la durée du transfert. Le gel est posé sur le papier Whatman (puits vers le bas), et une membrane de nylon imbibée de SSC 2X est plaquée sur lui. Deux feuilles de papier whatman imbibées de SSC 2X ainsi que plusieurs feuilles de papier absorbant recouvrent le tout. Pendant toute la nuit, le flux de solution de SSC 10X de la cuve vers le papier absorbant assure le transfert des fragments d'ADN du gel vers la membrane. Une fois le transfert achevé, la membrane est rincée dans du SSC 2X, et les ADN

y sont fixés par une exposition de 2 minutes aux U.V. (234 nm). Sèche, la membrane peut être conservée à 4°C pendant plusieurs jours.

-Hybridation de la membrane, lavages et détection des signaux

La membrane sèche est imbibée dans du SSC 2X puis est plaquée sur les parois internes d'un tube de verre. Les sites de fixation aspécifiques de la membrane sont saturés par une pré-hybridation de 2 heures à 42 °C dans du tampon formamide (10 % de dextran sulfate p/v, SSC 5 X, sarkosyl 0,8X, formamide déionisé 50% v/v) additionné de sperme de saumon soniqué dénaturé par chauffage à 95°C. La sonde utilisée pour l'hybridation est rendue radioactive par marquage de type "random priming" au ³²P en utilisant le kit "Prime-a-gene Labelling System" (Promega), selon les indications du fournisseur. Environ 25 ng de matrice (ADN double brin) dilués dans 12,5 µL d'eau sont dénaturés (100 °C, 10 min) et additionnés d'1 µL de BSA (10 mg.mL⁻¹, Promega), 50 µCi d'[α³²P]-dATP, 50 µCi de [α³²P]-dCTP, 1 µL d'un mélange de dGTP et de dTTP (concentration finale pour chaque nucléotide de 20 µM), de 10 U de DNA polymérase Klenow (Promega) et de 5 µL du tampon approprié (Promega). La réaction de polymérisation (assurant la production de la sonde marquée) se déroule pendant 1 h à température ambiante. Les fragments de sonde radiomarqués sont séparés des nucléotides non incorporés à l'aide d'une colonne Sephadex G50 (Nick Column, Pharmacia).

L'activité de la sonde est estimée par comptage (compteur à scintillation) (Packard 2100 ; TRIGARB, USA) de 2 µL d'éluat dans 3 mL de liquide scintillant. Une partie aliquote de la solution radioactive (10⁶ à 3x10⁶ cpm par mL de tampon) est dénaturée (8 min à 100 °C), refroidie sur de la glace puis ajoutée au tampon de pré-hybridation (Church ou tampon formamide). L'hybridation entre la sonde marquée et les ADN fixés sur la membrane de nylon dure toute une nuit à 65°C. La membrane subit ensuite différents lavages afin d'éliminer les sondes hybridées de manière aspécifique: 2 lavages de 10 minutes dans une solution SSC 2X, SDS 0,1 % à température ambiante, 2 lavages de 20 min dans une solution de SSC 1X, SDS 0,1% dont un à température ambiante et l'autre à 42°C, et un dernier lavage de 20 minutes dans une solution de SSC 0,5X, SDS 0,1% à 42 °C. Le lavage de la membrane est contrôlé à chaque étape avec un compteur Geiger et peut être interrompu si nécessaire. La membrane est protégée par un film plastique fermé hermétiquement afin de prévenir la prolifération de champignons. Elle est ensuite placée au contact d'un écran phosphoimageur (Fujifilm ou Kodak) pendant une durée allant de quelques heures à plusieurs jours selon l'intensité du signal. Les signaux sont ensuite détectés à l'aide d'un phosphoimageur Fla5000 (Fujifilm) et quantifiés à l'aide du logiciel ImageGauge (Fujifilm).

II.4.2 PCR "classique", "semi-quantitative" ou en "temps réel"

II.4.2.1 PCR "classique" et "semi-quantitative"

La réaction de polymérisation en chaîne permet d'amplifier spécifiquement et en quantité très importante une séquence d'ADN d'intérêt. Dans notre cas, la technique de PCR a été utilisée pour le génotypage des mutants perte de fonction, le clonage de fragments d'ADN et l'étude de l'expression du gène *OsHKT1*.

Les réactions de PCR ont été réalisées à l'aide de la polymérase thermostable GoTaq (Promega) selon les recommandations du fournisseur. L'amplification se fait dans le tampon de réaction 5X (contenant 1,5 mmol.L⁻¹ de MgCl₂) fourni avec l'enzyme, 1 à 20 ng de matrice ADN, 200 µmol.L⁻¹ de chacun des dNTP, 10 pmol.L⁻¹ de chacune des deux amorces oligonucléotidiques et 1,25 U de la polymérase. Le volume final est ajusté à 50 µL avec de l'eau. L'amplification s'effectue dans un minicycler (MJ Research, Bio-rad, USA). Le

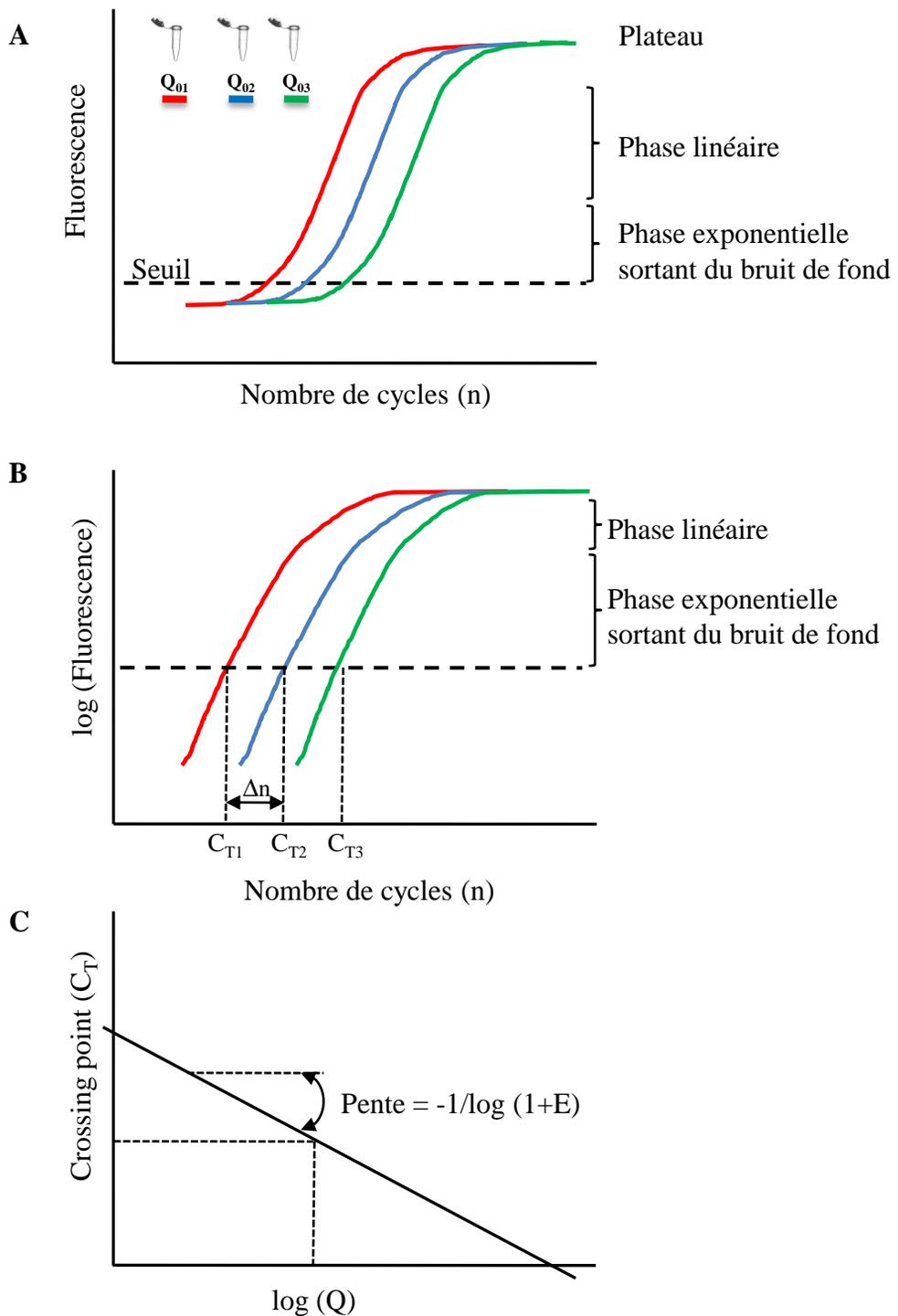


Figure II.3. Schéma explicatif de l'analyse des données de la PCR en temps réel.

A. Graphique donné par le logiciel pilotant le Light Cycler en fin de PCR en temps réel: niveau de fluorescence en fonction du nombre de cycles effectués. **B.** Linéarisation de la phase exponentielle permettant de fixer le seuil pour la détermination des valeurs de C_T ("crossing point" ou "cycle threshold"). La gamme étalon est réalisée par dilutions successives d'un échantillon d'ADN dont la concentration est connue. Une valeur de C_t est obtenue pour chaque échantillon de la gamme. **C.** Obtention d'une droite de calibration grâce aux valeurs de C_t obtenues, qui permet de calculer l'efficacité de la PCR "E". La valeur de "E" doit être comprise entre 0,97 et 1,01; Nolan *et al.*, 2006) et de quantifier la quantité d'ADN (Q) dans un échantillon d'intérêt.

protocole d'amplification comporte un traitement de 5 min à 95°C permettant la dénaturation des fragments d'ADN, suivi de 25 à 40 cycles imposés selon le protocole suivant: 30 secondes d'hybridation à 95°C; 1 minute à la température "d'annealing" permettant l'hybridation de l'amorce avec l'ADN matrice puis X min à 72°C permettant la synthèse de l'ADN. Le temps de synthèse (X) varie en fonction de la longueur du fragment à amplifier: il est fixé à environ une minute par kpb d'ADN. La température d'hybridation (annealing) initiale est fixée à une valeur supérieure à celle des T_m des amorces de 7° C, et est décrétementée de 1 °C par cycle pendant 7 cycles, afin de favoriser la spécificité d'hybridation.

Certaines amplifications ont été effectuées par la polymérase thermostable Pfu (Promega). Cette enzyme possède une forte activité exonucléase 3'-5'et permet donc une amplification avec un taux d'erreur plus faible que celui de la GoTaq. Les réactions d'amplification sont réalisées selon les recommandations du fournisseur avec quelques modifications par rapport au protocole utilisé pour la GoTaq : 0,2 à 1,25 U de la polymérase, 50 µmol.L⁻¹ de chacun des dNTP, 50 pmol.L⁻¹ de chacune des deux amorces oligonucléotidiques et un temps d'élongation plus long (2 à 3 min d'élongation par kb de fragment à amplifier).

Dans les expériences de PCR "semi-quantitative", la matrice est une préparation d'ADNc issue de la transcription inverse (Cf. § II.4.1.3). Le protocole de PCR est identique à celui décrit dans le paragraphe précédent. Cependant, il est nécessaire de se placer dans des conditions qui permettent de comparer les quantités des produits d'amplification avant d'atteindre la saturation, puis à saturation. Pour cela, durant l'amplification, au 25^{ème}, 30^{ème} et 35^{ème} cycle de la PCR, 5 µL du milieu réactionnel sont prélevés en vue d'une quantification sur gel. Les prélèvements sont réalisés alternativement à partir de 2 puits différents pour éviter que les prélèvements successifs n'introduisent un biais dans le rendement de l'amplification. Les échantillons sont ensuite mélangés avec 1 µL de "bleu ADN" puis séparés sur gel d'agarose (0,8 g d'agarose dans 100 mL de tampon TAE 1X, 1,5 µL de BET 1%). La visualisation se fait sous lumière U.V.

II.4.2.2 PCR en temps réel

La PCR quantitative offre la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant, et non uniquement à la fin de la PCR. Elle repose (technologie SYBR) sur l'utilisation de sondes fluorescentes se fixent sur l'ADN double brin. Ces sondes ne fluorescent qu'une fois fixées à l'ADN (soit à cause d'un "quencher" soit car la fluorescence nécessite un ADN double brin). Un seuil de fluorescence est établi par le programme de la machine (dédiée à la PCR en temps réel). Une fois que la quantité d'ADN formée permet au signal de fluorescence de dépasser ce seuil, le nombre de cycles d'amplification ayant permis le franchissement de ce seuil est noté (par la machine). Ce nombre, appelé "C_T" pour "Cycle Threshold" est à la base des calculs permettant de quantifier l'ADN de façon relative ou absolue.

L'efficacité "E" de la PCR doit être préalablement déterminée. Pour cela, une PCR en temps réel est effectuée sur des échantillons obtenus par des dilutions croissantes, permettant d'obtenir une courbe étalon, spécifique du couple d'amorces utilisé (spécifiques du locus d'intérêt). L'efficacité "E" peut être calculée ensuite en utilisant la formule suivante: $E = (10^{(-1/pente)} - 1)$ où "pente" indique la valeur de la pente de la courbe étalon.

D'un point de vue général, plus il y a de matrices à amplifier au départ, moins élevé sera le nombre de cycles requis pour atteindre un point où le signal d'émission de fluorescence

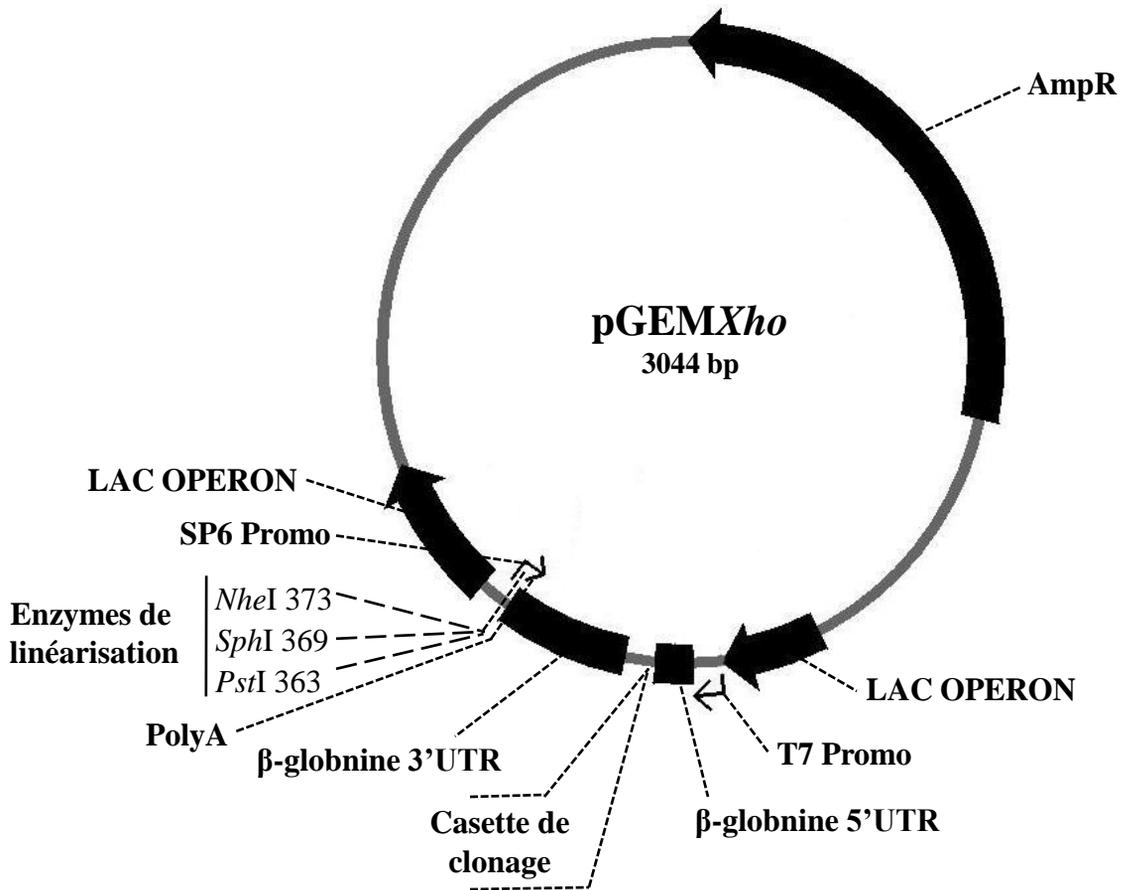


Figure II.4. Carte du vecteur d'expression en ovocyte de xénope pGEMXho.

Le vecteur pGEMXho est dérivé du vecteur pGEMHE, construit par Liman *et al.* (1992). Les ADNc des transporteurs HKT de riz ont été insérés dans le vecteur pGEMXho sous le contrôle du promoteur de l'ARN-polymérase T7, entre les sites *HincII* et *SpeI* de la cassette de clonage, pour *OsHKT1* et *OsHKT4* (respectivement en position 123 et 133), ou au site *EcoRI* pour *OsHKT3* et *OsHKT6* (position 127). La présence des régions 5' et 3' de la β-globine de xénope et d'une séquence polyA en bordures de la cassette de clonage permet la stabilisation *in vivo* des ARNc produits par transcription *in vitro* après linéarisation du vecteur, après leur injection dans le cytoplasme de l'ovocyte.

sera statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond, provoqué par la fluorescence du SYBR Green libre (figure II.3).

II.4.3 Méthodes de clonage moléculaire

II.4.3.1 Restriction enzymatique

L'ADN (plasmide, ADN_g, ADN_c) est clivé pendant 1 à 2 h par 2 unités d'enzyme (par µg d'ADN) dans le tampon réactionnel et à la température préconisés par le fournisseur (Promega).

II.4.3.2 Purification des fragments d'ADN

Les fragments d'ADN obtenus par la digestion enzymatique ou par PCR sont séparés sur gel d'agarose. Après migration, le fragment à purifier est repéré sous UV et découpé. La purification est réalisée en utilisant le kit "Wizard SV gel and PCR Clean-up" (Promega) ou le kit "Genelute Plasmid Mini-Prep" (Sigma) en suivant les instructions fournies par les fournisseurs.

II.4.3.3 Insertion d'un fragment d'ADN dans un vecteur plasmidique

Deux méthodes ont été utilisées suivant la nature du fragment d'ADN à cloner:

Clonage de fragments d'ADN amplifiés par PCR (Génotypage de mutants de riz)

Les fragments PCR amplifiés à l'aide de la Taq polymérase, qui possède une activité terminale transférase ajoutant une désoxyadénosine à l'extrémité 3' du produit de PCR, ont été réalisés à l'aide du kit "TOPO TA Cloning" (Invitrogen) qui permet l'insertion dans le vecteur pCRII-TOPO (Invitrogen). Les fragments possédant des extrémités franches obtenus par amplification avec la Pfu polymérase ont été clonés à l'aide du kit "Zero Blunt TOPO" (Invitrogen) qui permet de cloner dans le vecteur pCR Blunt II-TOPO (Invitrogen).

Clonage de fragments d'ADN issus d'une restriction enzymatique (transfert des ADN_c des transporteurs HKT dans les vecteurs d'expression)

-Etape de déphosphorylation

Le vecteur d'expression pGEMX_{ho} a été utilisé pour l'expression dans l'ovocyte de xénope (figure II.4). Pour le clonage de certains transporteurs HKT de riz, ce vecteur a été déphosphorilé après linéarisation par la phosphatase alcaline de thymus de veau (CIAP, Promega) selon les instructions du fournisseur. Si les extrémités du vecteur sont franches ou 3' sortantes, la déphosphorylation se fait en présence de 0,01 U de CIAP par pmole d'ADN pendant 15 min à 37°C, 15 min à 56°C, suivi d'un nouvel ajout de 0,01 U d'enzyme et de deux nouveaux traitements à 37 et 56°C. Dans le cas d'extrémités 5' sortantes, la réaction se déroule à 37°C pendant 30 min en présence de 0,01 U de CIAP par pmole d'ADN, puis de nouveau 30 min à 37°C après ajout de la même quantité d'enzyme.

La déphosphorylation est arrêtée par l'ajout de 300 µL d'un contenant Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1mM, NaCl 200 mM et SDS 0,5%. Pour éliminer la CIAP, qui peut limiter l'efficacité de la ligation et de la transformation, le vecteur est purifié par une extraction au phénol/chloroforme. La phase aqueuse est ré-extraite deux fois par du mélange chloroforme/alcool isoamylique, puis l'ADN est précipité à -20°C pendant 2 heures en présence d'éthanol absolu (2,5 v) et d'acétate de sodium 3 M, pH 5,2 (1/10 v/v). Après centrifugation (20 min, 15,7xg), le culot est lavé avec de l'éthanol à 70%. Après une nouvelle

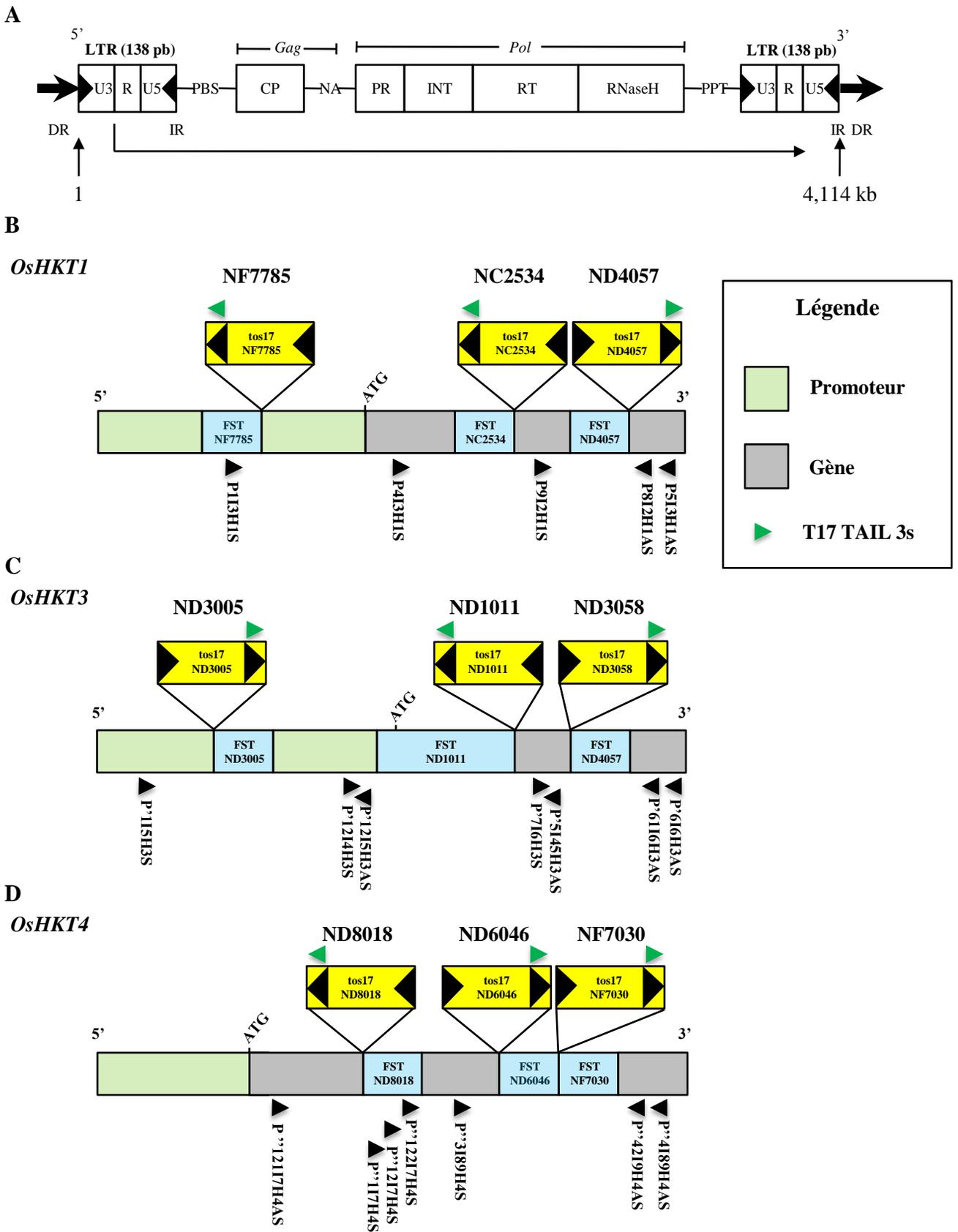


Figure II.5. Structure du transposon *tos17* et positionnement des amorces utilisées pour le génotypage des mutants d'insertion par transposon *tos17* dans les gènes *OsHKT1*, *OsHKT3* et *OsHKT4*.

A. Structure de la séquence nucléotidique du transposon *tos17*. Le *tos17* est un transposon du type LTR

(Long Terminal Repeat). Les séquences répétitives terminales longues se trouvent aux extrémités 5' et 3' du transposon. Elles sont composées par trois régions notées U3, R et U5 contenant des signaux nécessaires pour l'initiation et la fin de la transcription. Le transcrit du *tos17* est indiqué au dessous de la séquence par la ligne en noire. Il est initié à l'extrémité 5' de la région R dans le 5'LTR et se termine à l'extrémité 3' de la région R dans le 3'LTR. Le gène "*Gag*" compris dans la séquence du transposon code pour une "capsid-like" protéine (CP) impliquée dans la maturation et le conditionnement de l'ARN des rétrotransposons et leurs protéines, favorisant ainsi l'intégration dans le génome. Le gène "*Pol*" code des protéines ayant des activités reverse transcriptase (RT) et Rnase-H impliquées dans la replication/transposition du rétrotransposon. Ce gène code aussi une intégrase (INT) qui permet à la forme "ADN" du rétrotransposon de s'insérer dans des nouvelles zones chromosomales. Enfin, le gène "*Pol*" code également une protéase (PR) qui permet de cliver les polyprotéines codées par les gènes "*Gag*" et "*Pol*" en peptides fonctionnels. Les autres séquences indiquées sur le schéma sont PBS (primer binding sites), PPT (polypurine tracts), NA (nucleic acid binding moiety), IR (inverted terminal repeats), DR (flanking target direct). **B** à **D**. Positionnement des amorces utilisées dans le génotypage par PCR des lignées d'insertion *tos17* dans les gènes *OsHKT1* (chromosome 6) (**B**), *OsHKT3* (chromosome 1) (**C**), et *OsHKT4* (chromosome 4) (**D**). Le nom de chaque lignée est indiqué en gras au dessus de la position de l'insertion correspondante. Les séquences des FST sont indexées dans les bases de données NCBI et OryGenesDB (<http://orygenesdb.cirad.fr/>) sous les références suivantes: *OsHKT1*, lignée NC2534: AG022643 lignée ND4057: AG024419 lignée NF7785: AB156484; *OsHKT3*, lignée ND1011: AG023525, lignée ND3005: AG023980, lignée NB3058 : AG213420; *OsHKT4*, lignée ND8018: AG207416, lignée ND6046: AG206799, lignée NF7030 : AG212223. Abréviations : FST, "Flanking sequence tag"; *tos17*, transposon *tos17*.

Amorce s'hybridant sur :	Nomenclature	Séquence
tos17	T17TAIL3S	5'-GAGAGCATCATCGGTTACATCTTCTC-3'
<i>OsHKT1</i>	P1I3H1S	5'-GTTCCAAGCAGCCAGAACTTACTTATG-3'
	P4I3H1S	5'-CTAGCCCATAGATTCATTGCCTTGC-3'
	P5I2H1AS	3'-GAGGAGCAAGCGCCTGAGG-5'
	P8I2H1AS	3'-CTGGGGAAGGTGACCAAGTTGAG-5'
	P9I2H1S	5'-CTGCTGATGCTTCTGCGGGGTG-3'
	H1Pcas	5'-GGCATCAACTGTCATTGGCC-3'
<i>OsHKT3</i>	P'1I5H3S	5'-CTGGATCATCAGTGCAAGACATACTC-3'
	P'5I45H3AS	3'-CTAGCTGTGATTGCTTGCACACAGT-5'
	P'5I4H3S	5'-ACTGTGTGCAAGCAATCACAGCTAG-3'
	P'6I6H3AS	3'-GTCATCTTCTGCAAACCAAGTTGAGC-5'
	P'12I4H3S	5'-ATATAAGCATTTCGTGTATCTACCTGCATGCTCT-3'
	P'6I1I6H3AS	3'-AGAAGAATTGTGTGTGTGCAAGTGTTATTTG-5'
	P'12I5H3AS	3'-AGAGCATGCAGGTAGATACACGAATGCTTATAT-5'
<i>OsHKT4</i>	P''1I7H4S	5'-AGTCCTGCAAACAATGGGGATCAC-3'
	P''2I7H4AS	3'-GACAAGCCGGTGAATCTATCCTTG-5'
	P''3I89H4S	5'-CAGTCGTCATGTTAGTATCTCCTCC-3'
	P''4I89H4AS	3'-CCGAATTGCCTAGTATGATCACTAAG-5'
	P''12I7H4S	5'-GCAGATTCTAGCAGGCAACACCTT-3'
	P''42I9H4AS	3'-AAAGCTTGTTAACGGTAAAATTCCTCCACA-5'
	P''12I1I7H4S	5'-CCAAGTTTAGTGCTAGATACCTTGAAGC-3'
	P''122I7H4S	5'-CATTGTTCTGAGTGTTACTGGACTGATTC-3'

Tableau II.1. Liste des amorces utilisées pour le géotypage des mutants d'insertion par transposons tos17.

Le T_m des amorces ($T_m = 64,9 + 41 \cdot (yG + zC - 16,4) / (wA + xT + yG + zC)$, wA, xT, yG, zC étant les quantités respectives de A, T, G et C) varie entre 58 et 60°C. La température d'hybridation utilisée lors de la PCR est égale à 60°C. Les amorces sont spécifiques.

centrifugation (5 min, 15,7xg), le surnageant est éliminé et le culot est séché sous vide et remis en suspension dans du tampon TE.

-Etape de ligation

Les ADNc *OsHKT1*, *OsHKT3*, *OsHKT4* et *OsHKT6* (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) fournis par A. Rodríguez-Navarro (Université polytechnique, Madrid, Espagne) ont été clonés dans les vecteurs d'expression pGMDG ou pGEMXho (vecteur modifié par l'ajout d'un site *XhoI* dans la cassette de clonage). Les ADNc ont été extraits des vecteurs topo (*OsHKT1*, *OsHKT3*, *OsHKT4*) ou pYPGE15 (*OsHKT6*) par digestion avec *EcoRI* (*OsHKT3*, *OsHKT6*) ou double digestion avec *EcoRV* et *SpeI* (*OsHKT1*, *OsHKT4*). Ils ont ensuite été clonés dans le vecteur dédié à l'expression en ovocyte de xénope, au site *EcoRI* de la cassette de clonage (vecteur préalablement linéarisé et déphosphorilé) (*OsHKT3*, *OsHKT6*) ou entre les sites *HincII* et *SpeI* (*OsHKT1*, *OsHKT4*) (figure II.4). La ligation des ADNc des gènes *HKT* de riz (50 à 75 ng) dans pGEMDG ou pGEMXho (25 à 50 ng de vecteur) s'effectue pendant 16 heures à 16°C (Bain-Marie dans une chambre froide) en présence de 4 unités d'ADN T4 ligase (Promega), 2 µL du tampon de l'enzyme 10X et 17,5µL d'eau.

-Transformation d'*Escherichia coli*

Les bactéries compétentes (DH5α et TOP10) utilisées pour la transformation ont été préparées par leur fournisseurs selon un protocole qui leur est propre. La transformation bactérienne s'effectue sous l'effet d'un choc thermique. Trois à 5 µL de la réaction de ligation sont ajoutés à 40 µL de bactéries compétentes. Le tout est placé 30 min à 4°C, 20 s à 37°C (DH5α) ou 45 s à 42°C (TOP10), et de nouveau à 4°C pendant 2 min. Le mélange est incubé dans 1 mL de milieu SOC pendant 1 h sous agitation lente (225 rpm) à 37 °C.

-Sélection des bactéries transformées

Après 1 h d'incubation dans le milieu SOC, 100 µL de la culture bactérienne sont étalés sur un milieu sélectif LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline, 1 mmol/L d'IPTG et de 40 µg/mL X-Gal. Les colonies bactériennes se développent à 37°C pendant une nuit. Les deux vecteurs utilisés (Cf. § Clonage de fragments d'ADN amplifiés par PCR ci-dessus) présentant le site de multicolonnage inséré dans le gène *lacZ*, les colonies ayant un intégré l'insert dans le plasmide sont blanches (la β-galactosidase n'étant pas fonctionnelle), et les bactéries dont l'activité β-galactosidase s'exprime sont bleutées.

II.5 Purification des lignées mutantes de riz

Des mutants d'insertion ont été identifiés dans les collections internationales pour chacun des gènes *HKT* qui nous intéressent. La collection sollicitée est celle gérée par le NIAS au Japon. Elle est constituée de lignées de riz cv. Nipponbare mutées par insertion du transposon *tos17*. Le *tos17* est un transposon inactif dans les conditions normales. Il s'active lors de la phase de la culture de tissus, puis s'inactive lorsque les plantes sont régénérées (Hirochika *et al.*, 1996). Contrairement aux autres rétrotransposons de plantes, le nombre de *tos17* chez le riz est faible (1 à 5) et dépend principalement du cultivar. Le cultivar Nipponbare contient seulement 2 copies natives. Chez les plantes régénérées âgées de 3 à 16 semaines, on estime que le nombre de copies de *tos* transposées est compris entre 5 à 30 copies (Hirochika, 2001). Une purification des lignées mutantes a été engagée pour permettre de débiter la caractérisation phénotypique sur des mutants partiellement ou entièrement purifiés.

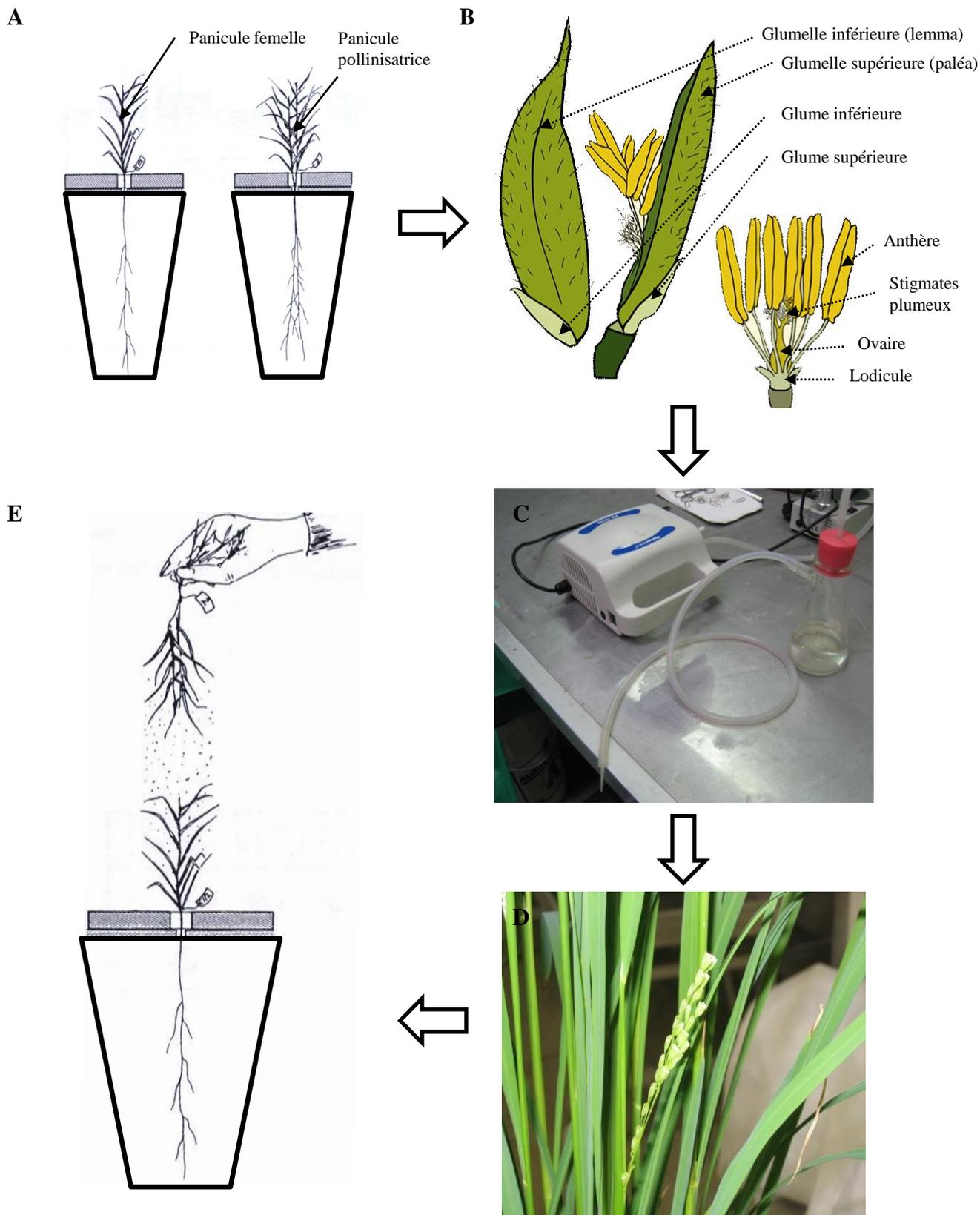


Figure II.6. Schéma du protocole de rétro-croisement de mutants de riz.

A. Culture de plantes en pots pour l'obtention de "panicules femelles" et plantes pollinisatrices
B. Structure d'un épillet de riz.
C. Dispositif d'aspiration permettant l'ablation des étamines.
D. Panicule "femelle" castrée et "habillée" prête à la pollinisation.
E. Réalisation de la pollinisation.

II.5.1 Géotypage des mutants

La première étape de la purification consiste à isoler les plantes homozygotes par amplification PCR à partir d'une famille T2 ou T3. Pour effectuer ce criblage, on a utilisé pour chaque lignée mutante deux couples d'amorces (figure II.5) et (tableau II.1), dont l'utilisation permet d'une part de vérifier la présence du *tos* dans le gène, et d'autre part de vérifier l'homozygotie de l'insertion du transposon. Les produits PCR sont séparés sur gel d'agarose. Dans certains cas, le produit d'amplification est cloné dans le vecteur PCRII-TOPO afin de vérifier la séquence et l'identité de la FST.

II.5.2 Réalisation du croisement

Etant donné que le riz est une plante autogame, il était indispensable de castrer une partie des plantes pour les rendre "strictement femelles" et éviter toute auto-fécondation par leur propre pollen (figure II.6.D). Pour le premier rétrocroisement, ce sont les plantes mutantes qui ont été castrées. Le pollen pollinisateur est provenu de plantes de riz sauvages cultivées en même temps que les plantes mutantes.

II.5.3 Castration et préparation des plantes femelles

Les plantes femelles correspondent à des plantes mutantes mises en germination dans des pots avec un décalage de 7 à 10 jours avant la mise en germination des plantes pollinisatrices. Pour les panicules à castrer, on choisit de préférence des plantes dont 10 à 20 % des épillets ont déjà effectué leur floraison. La castration doit être réalisée avant l'ouverture des épillets. Pour effectuer cette opération, on procède à un "habillage" de la panicule. Cette opération consiste à ôter tous les épillets déjà fleuris et ceux trop jeunes. Une fois l'habillage fait, tous les limbes des feuilles sont coupés au milieu et chaque épillets restant est coupé transversalement. Les étamines sont ôtées à l'aide d'un aspirateur spécial, ou quand nécessaire avec une pince sous une loupe (figure II.6). Enfin, chaque panicule femelle est recouverte avec des sachets spéciaux en plastique afin de la protéger de toute contamination pollinique. La pollinisation par les panicules mâles se fait le jour même de la castration.

II.5.4 Préparation des plantes pollinisatrices

Les panicules pollinisatrices sont choisies parmi celles dont un tiers des épillets ont déjà effectué leur floraison. La tige de la panicule est alors coupée au-dessous du nœud paniculaire et la feuille paniculaire est enlevée. La tige est immédiatement transférée dans un récipient rempli d'eau en faisant attention de ne pas trop secouer les panicules pour éviter de provoquer la déhiscence des anthères.

II.5.5 Préparation à la pollinisation

Avant l'ouverture des épillets, les pots contenant les plantes femelles et les panicules pollinisatrices sont transférés dans une serre fermée pour éviter tout mouvement d'air. Une température et une humidité de l'air élevées dans la serre sont favorables à une bonne émission du pollen.

II.5.6 La pollinisation

Si aucun mouvement d'air n'a lieu, après déhiscence, les anthères ne libèrent pas leur pollen. Quand la floraison atteint son niveau maximal, chaque pollinisateur est saisi délicatement et agité au-dessus de la panicule femelle (figure II.6.E), afin que les anthères libèrent leur pollen.

Immédiatement après la pollinisation, la panicule est coiffée par son sachet pour éviter toute contamination. En général le pollen libéré est suffisant et il n'est pas nécessaire d'effectuer une seconde pollinisation le jour suivant.

II.5.7 La maturation

Les panicules femelles sont gardées dans les sachets le temps nécessaire pour que les graines se forment. En général, la taille des graines et le taux de nouaison est comparable à ce qui est observé suite à une fécondation naturelle. Quand les graines sont formées, toute la panicule est coupée (dans le sachet) et mise dans une étuve à 37°C pendant 48 h.

II.6 Détermination du nombre de copies du transposon *tos17* dans le génome des plantes mutantes

Chez Nipponbare, deux copies natives sont présentes dans le génome sauvage, l'une dans le chromosome 7 et l'autre dans le chromosome 10 (figure II.7.B). Le nombre de copies du *tos17* dans le génome des lignées mutantes est inconnu et a été déterminé en utilisant deux méthodes, par Southern blot ou par PCR quantitative.

II.6.1 Analyse par Southern blot

Environ 5 µg d'ADN génomique provenant des préparations d'ADN de plantes mutantes ou sauvages sont digérés pendant 5 heures par l'une des trois enzymes de restriction suivantes, *HindIII*, *XbaI* et *EcoRI* (40 U d'enzymes de restriction), selon les conditions préconisées par le fournisseur (Promega). Cette digestion est effectuée à la température d'activité optimale de l'enzyme dans une solution tamponnée spécifique de l'enzyme, dans un volume réactionnel final de 20 µL, contenant 0.1 mg.mL⁻¹ de BSA pendant toute la nuit. Afin de re-concentrer le produit de digestion et éliminer les enzymes de restriction de la préparation d'ADN, des traitements successifs par les mélanges P/C/I et C/I sont effectués. Les fragments d'ADN sont ensuite récupérés par précipitation éthanolique, puis le culot est repris dans 20 µL d'eau.

Les échantillons ont été ensuite hybridés avec la sonde reverse transcriptase spécifique du *tos17* marquée par du ³²P (figure II.7.A). La radioactivité est révélée à l'aide d'un Phosphorimager (Storm, Molecular Dynamics). Aucune des trois enzymes utilisées ne coupe dans la séquence (de la reverse transcriptase) reconnue par la sonde.

II.6.2 Analyse par PCR en temps réel (PCR quantitative)

La détermination du nombre de copies d'un transgène dans un échantillon inconnu peut être réalisée en se référant à une droite d'étalonnage établie à partir d'une gamme de standards présentant un nombre de transgènes connu (Gentle *et al.*, 2001; Raeymaekers, 2000; Song *et al.*, 2002; Zimmermann *et al.*, 1996).

Notre gamme a été préparée en faisant des dilutions successives d'une construction plasmidique contenant un fragment du rétrotransposon *tos17* de 165 pb situé dans la séquence de la reverse transcriptase à la position 2835 à partir du 5'-LTR (figure II.7.A.). Ce fragment a été amplifié par PCR puis cloné dans le vecteur TOPO pCRII (Invitrogen). Pour l'amplification, plusieurs couples d'amorces ont été testés, dont un seul a été finalement retenu. Les amorces définissant ce couple ont été baptisées *tos17M1* (séquence: 5'-CACGGGAGGAAGTATGA-3') et *tos17P1* (5'-GCTTTTCTTCATGGTGA-3'), caractérisées par des T_m respectifs de 56,8°C et 54,2°C. Ensuite, des mises au point sur l'ADNg ont été effectuées, dans lesquelles nous avons analysé, à la fois, la spécificité des

amorces sur gel et la courbe de fusion réalisée après la PCR en temps réel sur le produit PCR final. La courbe de fusion est obtenue en enregistrant en continu le signal de fluorescence de l'échantillon en fonction de la température lors d'une montée en température de 65°C à 85°C, avec une progression de 0,1°C par seconde. Le signal de fluorescence dépend principalement de l'état d'hybridation du produit PCR, et varie donc rapidement lorsque la température est égale au T_m du produit PCR. L'avantage de l'utilisation d'ADNg comme standard de référence est qu'il contient un nombre connu de *tos17* (2 copies par génome dans le riz).

La même technique d'extraction d'ADN a été utilisée pour tous les échantillons (Méthode au MATAB) (Cf. § II.4.1.1). La concentration en ADN a été déterminée par le kit "RiboGreen RNA quantitation kit" (Molecular Probes, France) (Cf. § II.4.1.4).

Cinquante ng d'ADN de chaque mutant de riz ont été utilisés comme matrice pour la PCR en temps réel. Le "mix" Light Cycler DNA Master (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) contient les dNTPs, la Taq et le SYBR Green. Le mélange réactionnel de 10 µL [2 µL de mix, 0,5 µL du chaque amorce (20 µM), 1 µL d'ADNc et 6,5 µL d'eau ultrapure] est placé dans un capillaire (Roche) permettant des variations de température rapides (20°C par seconde). L'appareil utilisé est le LightCycler 1,5 (Roche) et le logiciel utilisé est le Lightcycler 3,0 (Roche). Les cycles sont ceux d'une PCR classique mais avec des temps beaucoup plus courts. Le programme se compose comme suit :

- 14 min à 95°C Etape de dénaturation
- 30 s à 95 °C Etape de la PCR
- 30 s à 60°C **
- 30 s à 72°C **
- 15 s à 95 °C Etape de Fusion « melting curve »
- 30 s à 60°C **
- 15 min Augmentation de la température de 60°C à 95°C
- 1 min à 40°C Etape de refroidissement.

Dans la figure (IV.7.B), nous montrons des courbes de fusion représentatives de trois échantillons contenant, respectivement, l'ADNg sauvage, le plasmide contenant le fragment du *tos17* et l'ADNg d'un mutant. La dérivée primaire de la courbe de fluorescence en fonction de la température montre un seul pic à 86,3 °C, qui représente le T_m de l'amplicon. La présence d'un seul pic au même T_m à la fois chez les standards (un seul point de gamme montré sur la courbe), l'ADNg sauvage et l'ADNg des mutants (un seul échantillon montré sur la courbe) indique une amplification spécifique du fragment *tos17* cloné. Par ailleurs, l'absence de pic dans la courbe de fusion de l'eau indique l'absence de contaminations.

La concentration initiale (nombre de copies) d'une séquence cible dans une matrice d'ADN peut être estimée à partir du paramètre appelé C_T (Cf. ci-dessus, § II.4.2.2 "PCR en temps réel"), qui correspond au nombre de cycles d'amplification effectués au moment où la courbe d'amplification croise une ligne dite "de seuil" (figure II.3). Cette ligne est placée au niveau du démarrage de la phase d'amplification exponentielle, de façon à distinguer clairement le signal par rapport au bruit de fond. La détermination du nombre exacte de

copies de la matrice cible, et donc par déduction, du nombre de transposon *tos17* surnuméraires présents chez les plantes de génotype mutants (*Cf.* Chapitre IV) se base sur le calcul du ΔC_T entre le gène cible et le gène de référence, selon une procédure adaptée à partir de la méthode appelée " $\Delta\Delta C_T$ " (Livak *et al.*, 2001).

Dans cette méthode les auteurs utilisent une formule arithmétique pour calculer le rapport de l'abondance d'une séquence cible dans un échantillon à l'abondance de cette même séquence dans un second échantillon "contrôle", en normalisant avec un gène de référence. Les différences ΔC_T entre les valeurs de C_T du gène cible et du gène de référence sont déterminées pour l'échantillon à analyser et l'échantillon "contrôle".

$$\Delta C_T(\text{éch}) = C_T(\text{cible}_{\text{éch}}) - C_T(\text{référence}_{\text{éch}})$$

$$\Delta C_T(\text{cont}) = C_T(\text{cible}_{\text{cont}}) - C_T(\text{référence}_{\text{cont}})$$

Ensuite, le $\Delta\Delta C_T$ entre le contrôle et l'échantillon est calculé : $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{cont}) - \Delta C_T(\text{éch})$. Enfin, l'analyse théorique indique que le rapport d'expression normalisé du gène cible, par rapport au contrôle, est fourni par la formule $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Dans notre cas, le gène contrôle est aussi notre gène référence, représenté par l'ADNg sauvage (nombre de copies de *tos17* connu et égal à deux copies natives)(figure II.7.B). Ainsi, le ratio de nombre de copies est déterminé par la formule $2^{-\Delta C_T}$.

L'efficacité d'amplification entre des échantillons dilués (ADNg sauvage et plasmide contenant le gène d'intérêt) doivent être identiques et optimales (voisines de 100%) ce qui signifie qu'à chaque cycle de la phase exponentielle, la concentration en produits de PCR est doublée, créant ainsi une relation linéaire entre le C_T et la quantité d'ADN au départ. Un exemple est présenté dans la figure (IV.7.E). La courbe standard, parfaitement linéaire, possède une pente de -3.3 ce qui se traduit par une efficacité de 99,5%.

Dans chaque réaction PCR, la gamme standard (plasmide avec le gène d'intérêt *tos17*) comprend quatre ou cinq points. La valeur du C_T de l'échantillon référence (ADNg sauvage), qui peut varier du fait d'imprécisions lors des pipetages, est systématiquement contrôlée par rapport à cette gamme.

II.7 Analyses phénotypiques

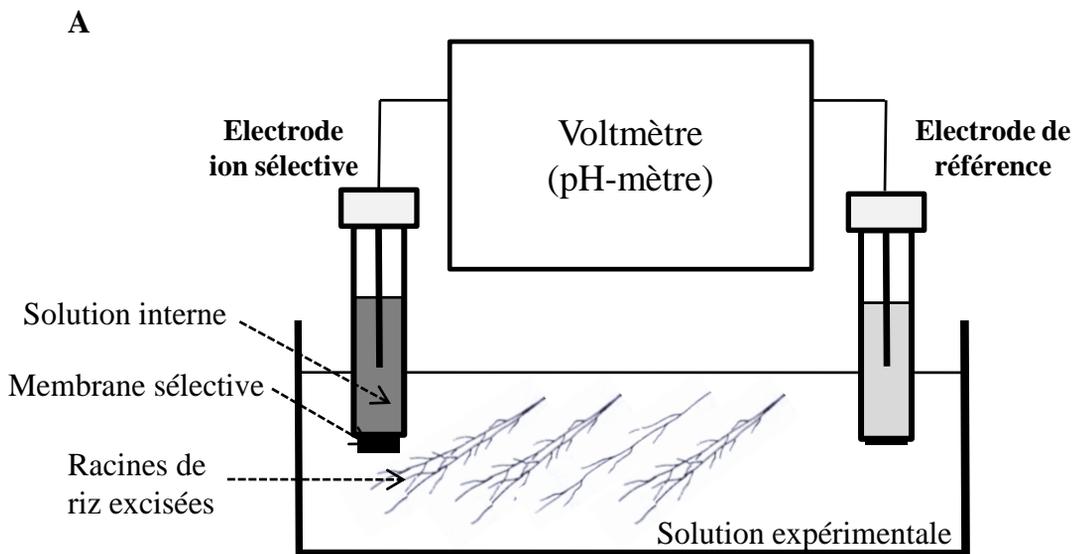
II.7.1 Détermination de la teneur de Na^+ et K^+ dans les tissus foliaires et racinaires

Les ions Na^+ et K^+ sont extraits à partir de la matière sèche des feuilles et/ou racines par solubilisation acide. Dix mL de HCl 0,1 N sont ajoutés dans les tubes contenant le matériel végétal. Après 2 heures à 60°C et une centrifugation à 10000xg pendant 10 min, la concentration des ions dans le surnageant est déterminé par spectrophotométrie de flamme (SpectrAA 220 FS, Varian). Les teneurs sont exprimées en fonction de la masse de matière sèche de l'échantillon.

II.7.2 Mesure de flux nets racinaires de sodium et de potassium dans la racine de riz

II.7.2.1 Principe général

Les flux nets de K^+ et Na^+ dans des racines (excisées) sont déterminés à partir de la mesure des variations de la concentration de ces ions dans la solution d'incubation des racines (sur des



B



Figure II.8. Dispositif expérimental de mesure de flux nets racinaires de potassium à l'aide d'une électrode ion-sélective.

A. Représentation schématique du dispositif expérimental. Le système de mesure se compose de deux électrodes: une électrode de mesure sélective du potassium (à droite) et une électrode de référence de type Ag/AgCl (à gauche). L'électrode sélective est capable de déterminer l'activité du potassium dans la solution expérimentale dans laquelle baignent les racines excisées, grâce à la mesure de la ddp qui s'établit de part et d'autre de sa membrane sélective de cet ion. La concentration de K^+ dans la solution interne de l'électrode ion-sélective est environ 1,5 mM . **B.** Photographie du dispositif expérimental pour la détermination des mesures des flux nets racinaires. Les flux nets sont déterminés à partir des mesures d'appauvrissement ou d'enrichissement du milieu en K^+ au cours du temps.

parties aliquotes de solution prélevées périodiquement). En appelant “V” le volume de la solution au temps i, “Ci” et “Cj” les concentrations d'un ion donné déterminées dans deux aliquotes prélevées de façon successive à un intervalle de temps “Δt”, et “m” la masse des racines présentes dans le milieu, le flux net “J” de cet ion dans les racines est estimé par la relation:

$$J = [V(C_i - C_j)] / [m \Delta t]$$

Le volume de la solution d'incubation initial est de 50 mL, pour une quantité de racines voisine de 300 mg (MF). Le temps séparant deux prélèvements successifs est en général de 15 min. Le volume de chaque aliquote prélevée est de 1 ou 2 mL. La concentration en ions Na⁺ et K⁺ des aliquotes est déterminée par spectrophotométrie de flamme et/ou à l'aide d'une électrode sélective de K⁺.

II.7.2.2 Composition des solutions d'absorption

La solution utilisée pour mesurer le flux de potassium et sodium est tamponnée à pH 6,0 par du MES-BTP 2 mM. Elle contient CaSO₄ 1 mM et K⁺ et/ou Na⁺ apportés sous forme de sulfate: K₂SO₄ 15 μM et/ou Na₂SO₄ 25 μM. Les concentrations finales en Na⁺ et K⁺ sont préalablement vérifiées par spectrophotométrie de flamme.

II.7.2.3 Dosage par spectrophotométrie de flamme

Les aliquotes prélevées sont diluées (en général 10 fois) dans HCl 0,1 N. Les ions Na⁺ et K⁺ sont dosés en émission atomique à l'aide d'un spectrophotomètre SpectrAA 220 FS (Varian).

II.7.2.4 Dosage de K⁺ à l'aide d'une électrode ion sélective

Principe

L'électrode utilisée est une électrode à membrane PVC à ionophore potassium. Lorsque la membrane est en contact avec une solution contenant des ions potassium, un potentiel d'électrode se développe à travers la membrane. Ce potentiel d'électrode est mesuré par rapport à un potentiel de référence constant, au moyen d'un ionomètre ou pH-mètre (figure II.8.A). La concentration d'ions potassium, correspond au potentiel mesuré “E” peut être exprimée par l'équation de NERNST:

$$E = E_0 + \frac{RT}{zF} \cdot \ln a_{K^+} \quad (1)$$

Avec, “E”: différence de potentiel mesurée aux bornes du système; “E₀”: potentiel standard d'électrode; “R”: constante des gaz parfaits (8.3143 J mol⁻¹K⁻¹); “T”: température absolue (K); z : valence de l'ion (+1); “F”: constante de Faraday (96487 C equiv.⁻¹) et “a_{K⁺}”: activité de l'ion potassium.

D'autre part, l'activité de l'ion potassium, a_{K⁺} est liée à la concentration par l'équation suivante :

$$a_{K^+} = f_{K^+} \cdot C_{K^+} \quad (2)$$

“f_{K⁺}” étant le coefficient d'activité. Dans des solutions très diluées, “f_{K⁺}”, par définition est égal à 1. De ce fait, l'équation (2) devient :

$$a_{K^+} = C_{K^+} \quad (3)$$

Donc, si la force ionique de la solution ne varie pas ou peu, on peut facilement déduire la concentration de K⁺ dans la solution expérimentale.

Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental se compose de deux électrodes, une électrode de référence (REDROD; REF251, Radiometer analytical, France) caractérisée par un potentiel stable, et une électrode de mesure, sélective de K^+ , à membrane PVC incorporant un ionophore potassium (Half cell DX239, Mettler Toledo, France) dont le potentiel change en fonction de l'activité de cet ion dans la solution. Les deux électrodes sont reliés à un pH-mètre, utilisé comme "volt-mètre", à afficheur digital (MetrOhm 632- Suisse) (figure II.8.B).

Calibration de la macroélectrode

Les solutions de calibration (contenant K^+ à la concentration de 1, 3, 5, 10, 100 ou 1000 μM) sont obtenues par dilutions successives à partir d'une solution mère de K_2SO_4 50 mM. Les concentrations réelles en K^+ des solutions de calibration sont déterminées par spectrophotométrie de flamme. Une régression linéaire est faite sur les valeurs de potentiel mesurées pour les différents points de la gamme étalon, permettant ensuite la détermination de la concentration de K^+ dans les aliquotes des solutions de mesure des flux dans la racine.

II.8 Histologie de la racine de riz

Cette analyse a été faite dans l'optique de préciser l'histologie des racines de riz utilisées dans les expériences de mesure du potentiel électrique transmembranaire (Cf. § II.9.2.4), les plantules de riz étant cultivées selon le même protocole dans les 2 cas.

Des coupes de racine de riz à différentes hauteurs à partir de l'apex ont été réalisées. La fixation des échantillons se fait dans un gel d'agarose 4% (4g agarose dans 100 mL de tampon TBS 1X). Les racines des plantes sont excisées très peu de temps avant la fixation pour éviter le dessèchement puis incorporées dans le gel lorsqu'il atteint une température de 47°C. Les blocs de gel contenant les morceaux de racines sont ensuite taillés et passés au vibratome (Biorad H 1200) pour réaliser des coupes de 60 μm d'épaisseur. Ensuite, les coupes sont mises entre lame et lamelle et photographiées sous un microscope (Olympus BX61) couplé à une caméra noir et blanc (ORCA AG Hamamatsu).

II.9 Electrophysiologie

II.9.1 Voltage-clamp sur ovocytes de Xénope

II.9.1.1 Transcription *in vitro*

Le vecteur utilisé pour produire les transcrits *in vitro* est pGEMX*ho*. Les transcrits, obtenus avec l'ARN-polymérase T7, comportent la séquence 5' flanquante de la β -globine de Xénope, suivie de la séquence complémentaire de l'ADNc d'*OsHKT#*, suivie de la séquence 3' flanquante de la β -globine, suivie d'une séquence poly-A. Cinq à 10 μg du plasmide pGEMX*ho* contenant l'ADNc *OsHKT#* sont linéarisés par digestion enzymatique à l'aide des enzymes *NheI*, *SphI* ou *PstI*. Une chromatographie sur gel est effectuée pour contrôler la qualité de la linéarisation. Soixante-dix μL du produit de linéarisation sont traités ensuite à la protéinase K (200 μg par mL) pendant 30 min à 50°C pour éliminer les RNases. L'ADN est ensuite purifié à l'aide du mélange P/C/I (25/24/1) puis subit une précipitation par de l'isopropanol. Le culot est séché puis resuspendu dans 20 μL d'eau (prétraitée par du DEPC). Après vérification des ADN sur gel, la transcription *in vitro* est réalisée à l'aide du kit "mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra" (Ambion) en suivant le protocole recommandé par le fournisseur du kit. La transcription est effectuée pendant 2 h à 37 °C à partir de 1 μg d'ADN

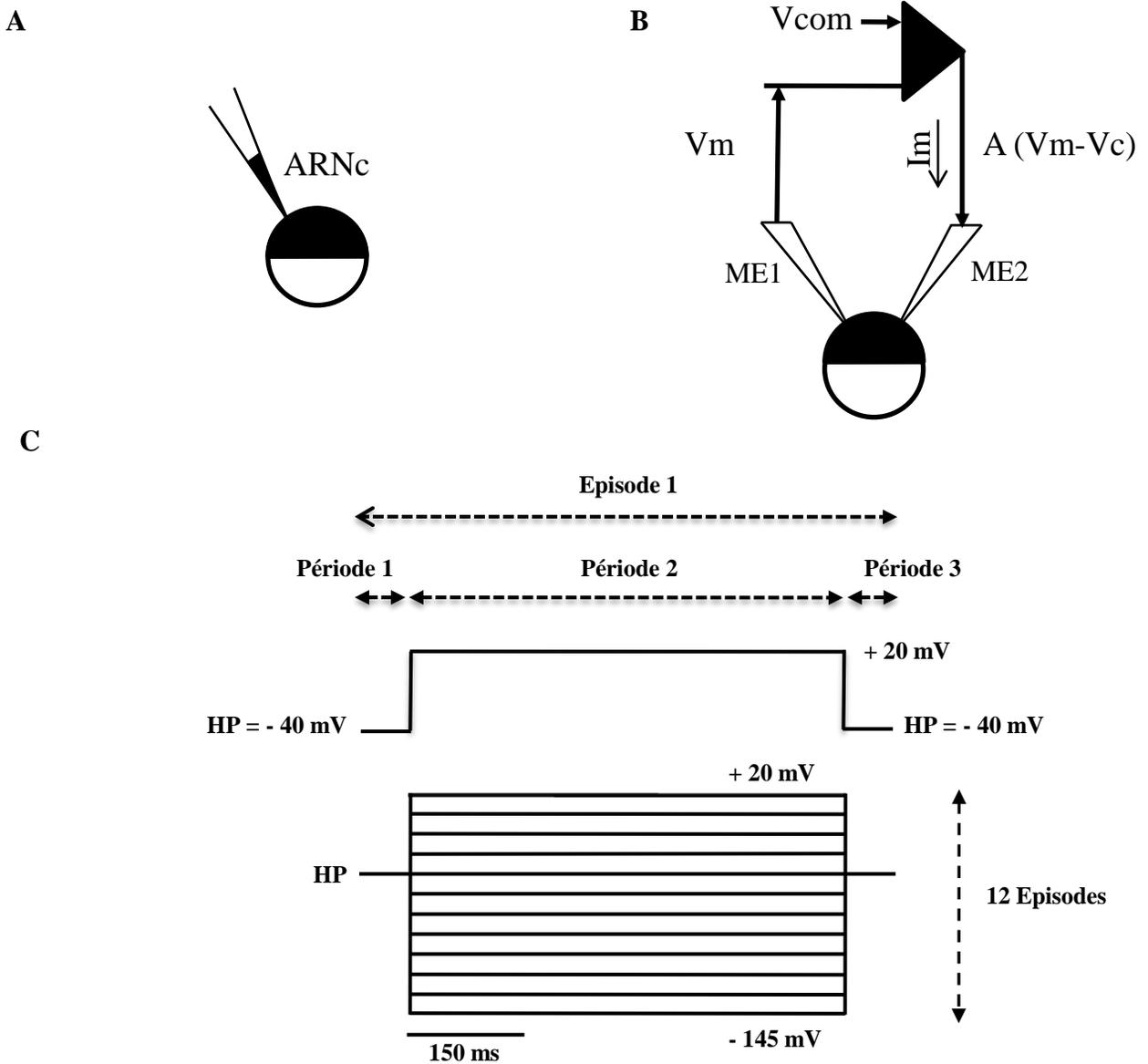


Figure II.9. Voltage clamp à deux micro-électrodes et exemple de protocole utilisé.

A. Injection de l'ARNc dans les ovocytes. Environ 50 nL d'ARNc sont injectés à l'aide d'une micropipette (diamètre de la pointe : 10-15 μm) reliée à un injecteur pneumatique. **B.** Schéma simplifié du dispositif du voltage clamp à deux micro-électrodes. Le potentiel de membrane (V_m) est enregistré grâce à la microélectrode ME1, implantée dans le cytoplasme de l'ovocyte, reliée à un amplificateur opérationnel de type "suiveur" (non montré). V_m et le potentiel de commande (V_c) sont connectés aux deux entrées (négative et positive) d'un deuxième amplificateur opérationnel permettant par rétrocontrôle d'imposer le potentiel demandé. Le courant en sortie de ce dernier amplificateur traverse la membrane de l'ovocyte en passant par la microélectrode ME2. Les circuits de mesure du potentiel et du courant transmembranaires sont bouclés grâce à une électrode de référence "macroscopique" positionnée dans la cuve en aval de l'ovocyte (non montré). Une micro-électrode de référence locale (positionnée à proximité de la surface de l'ovocyte) permet de mesurer et compenser les chutes de potentiel entre la surface de la membrane et l'électrode "macroscopique" de référence dues à la résistance du bain (non montré). **C.** Exemple de protocole de voltage clamp. En haut, un seul épisode représentant un saut de potentiel imposé à +20 mV pendant 500 ms à partir du potentiel de maintien (HP) à -40 mV. En bas, un protocole entier composé de 12 épisodes avec un incréments de +15 mV à chaque épisode. Le potentiel de maintien, choisi tel que le courant soit proche de zéro, est variable en fonction des conditions de milieu et du transporteur étudié.

linéarisé en ajoutant 10 μL d'un mélange de NTP/ARCA, 2 μL du tampon approprié et 2 μL de T7 ARN polymérase (réactif fournis dans le kit). Après purification et précipitation, les ARNc sont dosés à l'aide d'un spectrophotomètre Smartspec 3000 (Biorad), et leur taille est vérifiée sur gel. Ils sont ensuite aliquotés (2 μL /tube) et stockés à -80°C prêts pour l'utilisation.

II.9.1.2. Obtention et injection des ovocytes

Les ovocytes sont prélevés chirurgicalement à partir de Xénopes femelles adultes achetées à l'élevage du Centre de Ressources Biologiques du CNRS à Montpellier. Le Xénope est un amphibien anoure aquatique d'Afrique australe du genre *Xenopus*. Après anesthésie par immersion pendant 45 min dans de la glace, l'animal est ensuite étendu sur le dos. La peau puis la paroi musculaire sont incisées au niveau du bas de l'abdomen sur le côté. Un ou plusieurs lobes ovariens sont prélevés et placés dans une solution (NaCl 82,5 mM, KCl 2 mM, MgCl_2 1 mM, Hepes-NaOH 5 mM, pH 7,4) appelée OR2. La paroi musculaire puis la peau sont ensuite suturées avec du fil chirurgical résorbable. Les lobes ovariens sont ensuite traités à la collagénase (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans de la solution OR2; collagénase type AI, Sigma) pendant 1 heure, sous agitation à 19°C , afin d'éliminer l'épithélium ovarien et les cellules folliculaires. Après rinçage, les ovocytes sont conservés dans une solution appelée ND96, contenant NaCl 96 mM, KCl 2 mM, MgCl_2 1 mM, CaCl_2 1,8 mM, Na-pyruvate 2,5 mM, Hepes-NaOH 5 mM, pH 7,4, complétée avec 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de gentamicine (Sigma).

Les ovocytes viables sont ensuite triés sous loupe binoculaire sur la base de l'aspect général et la couleur des pôles: ne sont gardés que les ovocytes présentant une forme régulière (sphérique) et ayant un pôle animal noir parfaitement différencié du pôle végétatif jaune. Immédiatement après le tri, les ovocytes sont injectés soit avec de l'eau (prétraitée par du DEPC) (ovocytes contrôles) ou avec la solution d'ARNc codant l'*OsHKT* étudié.

L'injection d'ARNc se fait sous loupe binoculaire à l'aide d'un injecteur pneumatique (figure II.9.A). La solution à injecter est d'abord aspirée dans la pointe d'une micropipette en borosilicate (GC200F-10, diamètre de pointe : 10-15 μm , Harvard Apparatus, UK) montée sur un micromanipulateur mécanique. Un volume aliquote d'environ 50 nl de la solution est ensuite injecté dans chaque ovocyte grâce à une chambre à pression alimentée par une bouteille d'azote comprimé. Les ovocytes injectés sont ensuite incubés dans la solution de ND96 à 19°C .

II.9.1.3 Voltage clamp à deux électrodes

Les mesures électrophysiologiques sur les ovocytes sont effectuées le lendemain pour *OsHKT1* ou à partir de 2 à 3 jours après l'étape d'injection pour *OsHKT4* et *OsHKT6*. Les expériences sont réalisées à température ambiante ($20-22^{\circ}\text{C}$). L'ovocyte est placé dans une cuve en plexiglas dans laquelle percole la solution expérimentale à la vitesse de $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La cuve possède 13 entrées indépendantes reliées chacune par un tuyau fin à un réservoir de solution, ce système permet un rinçage efficace de la cuve en 5 secondes après l'apport d'une nouvelle solution. La technique d'enregistrement utilisée est le voltage-clamp à deux microélectrodes intracellulaires. En plus des deux microélectrodes intracellulaires, une électrode de référence locale est positionnée à la surface de l'ovocyte. Elle permet la correction de la chute du potentiel dans la résistance série du bain (figure II.8.B). L'électrode de référence est connectée au bain grâce à un pont salin (KCl 1 M gélosé à 1%) placé à 2 cm en aval de l'ovocyte. Toutes les microélectrodes sont préparées à partir de tubes en verre de soude (type Modulohm 160214, Vitrex), étirées grâce à une étireuse (Narishige PP-83;

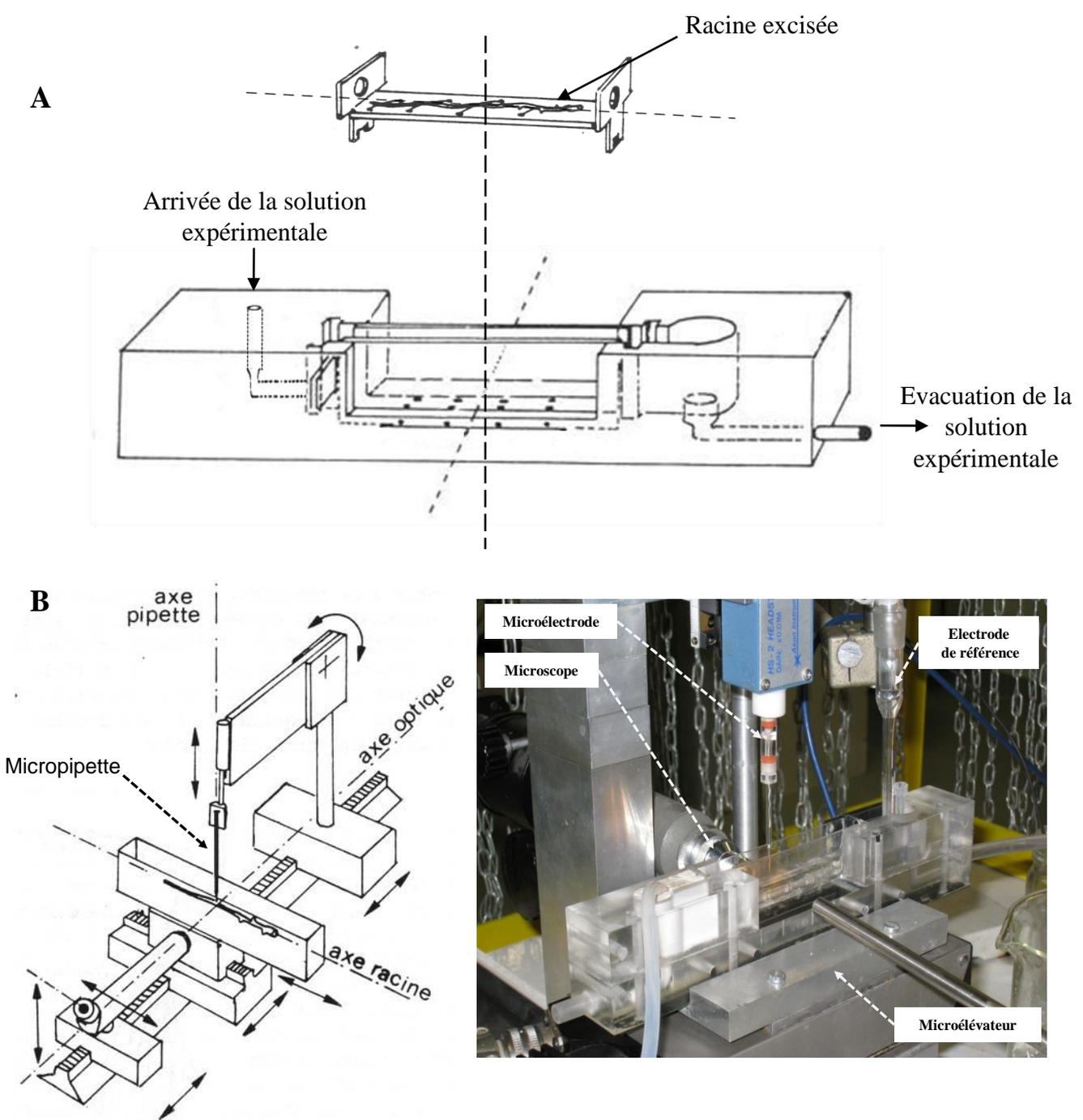


Figure II.10. Dispositif expérimental de mesure du potentiel de membrane de cellules des couches périphériques de la racine.

A. Schéma montrant la cuve de percolation et le support (en plexiglas) permettant d'y installer la racine. **B.** A gauche: schéma montrant le banc de micromanipulation pour la mesure du potentiel de membrane des cellules racinaires. A droite: photo du dispositif expérimental montrant la cuve expérimentale installée sur le microélevateur avec la racine disposée horizontalement sur le portoir. En haut, la sonde portant le porte électrode positionné à la verticale de racine. A gauche sur la cuve: le tuyau d'alimentation de la solution expérimentale. A droite, en aval de la percolation, une chambre cylindrique dans laquelle est placée l'électrode à pH (utilisée comme électrode de référence et électrode de mesure de pH). Sur l'axe optique est installé un microscope, dont l'objectif est éclairé par une fibre optique contenu dans le cylindre en acier inoxydable présent à l'autre côté de la cuve par rapport au microscope et aligné avec l'axe optique.

paramètres d'étirage NO.1 :14,65 et NO.2 :8,65). Elles sont remplies d'une solution de KCl 1 M et installées sur des portes-électrodes placés sur des sondes pré-amplificatrices de type HS-2. Les trois microélectrodes sont montées et manœuvrées à l'aide de micromanipulateurs mécaniques (MM33, Narishige) et leurs déplacements sont effectués sous loupe binoculaire. L'ovocyte est éclairé par une fibre optique annulaire adaptée autour de l'objectif de la loupe. La cuve, les micromanipulateurs supportant les microélectrodes et la loupe binoculaire sont placés à l'intérieur d'une cage de Faraday sur une table anti-vibrations. L'amplificateur utilisé pour contrôler/imposer le potentiel de membrane est un Axoclamp-2A (Axon Instruments, USA). L'acquisition et l'analyse des données se fait grâce au programme pCLAMP 9 (Axon instruments, USA) exécuté sur un micro-ordinateur interfacé à l'amplificateur (Interface Digidata 1322A, Axon Instruments, USA). Toutes les solutions de percolation contiennent la base commune suivante: MgCl₂ 6 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MES-BTP 10 mM, pH 5,5. Dans les expériences où l'effet du pH est étudié, le MES est remplacé par de l'HEPES (à pH 7,5)

Les cations monovalents sont ajoutés dans la solution de base sous forme de sels de chlorures ou sous forme de glutamate. L'osmolarité (220 à 280 mOsM) est constante dans un même jeu de solution. Elle est ajustée, quand nécessaire, par l'ajout de D-mannitol. La force ionique est maintenue constante en ajoutant du NMDG afin de compenser les variations de concentration entre chacune des solutions testées.

Le protocole utilisé permet d'imposer des potentiels variant entre +20 mV et -145 mV par saut de 15 mV à partir du potentiel de repos fixé par l'utilisateur (figure II.9.C). Pour l'analyse, le courant OsHKT# est déterminé en soustrayant au courant total enregistré dans l'ovocyte exprimant OsHKT# la moyenne des courants endogènes enregistrés dans la solution de percolation correspondante chez 4 à 7 ovocytes contrôles (injectés avec de l'eau).

II.9.2 Mesure du potentiel de membrane des cellules corticales de la racine de riz

II.9.2.1 Préparation des solutions

Les potentiels de membranes sont mesurés dans des solutions contenant toutes une base de CaSO₄ 1 mM, dans du MES-BTP 2 mM, pH 6,0. Les cations Na⁺ et/ou K⁺ sont introduits dans cette base à des concentrations variables (5 à 300 μM) sous forme de Na₂SO₄ et K₂SO₄, à partir de solutions mères 50 mM. Les concentrations effectives finales de K⁺ et Na⁺ dans les solutions de mesure sont contrôlées par spectrophotométrie de flamme.

II.9.2.2 Préparation des microélectrodes

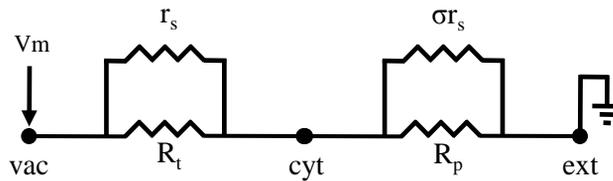
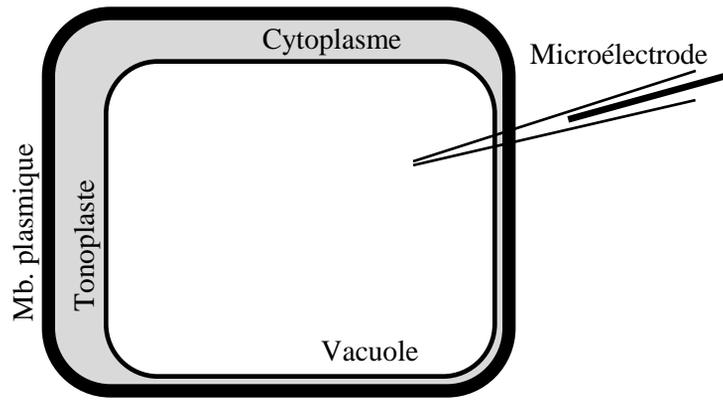
Microélectrode utilisée pour la mesure du potentiel de membrane

La microélectrode intracellulaire est obtenue par étirage d'un capillaire en borosilicate de 2 mm de diamètre (GC200F-10, Harvard Apparatus, UK) sur une étireuse verticale (Narishige, Japon) selon les paramètres suivants: courant 20 A, force électromagnétique 6.

Après étirage, l'électrode est remplie par du KCl 3 M et installée sur un porte électrode avec un fil d'argent, le tout étant connecté à la sonde (HS-2, gain X0,01, Axon instruments, USA) d'un amplificateur (Axoprobe 1A, Axon instruments, USA).

Electrode de référence

L'électrode de référence correspond au canal de référence (Ag/AgCl) d'une électrode combinée de pH. remplie de KCl 3 M. Le pH-mètre (MetrOhm 632- Suisse) est connecté à la sonde (HS-2, gain X 0.01 Axon instruments, USA) portant la microélectrode intracellulaire.



$$V_m = V_t (r_s / r_s + R_t) + V_p (\sigma r_s / \sigma r_s + R_t) \quad (1)$$

$$R_m = R_t (r_s / r_s + R_t) + \beta R_t (\sigma r_s / \sigma r_s + \beta R_t) \quad (2)$$

$$\beta = R_p / R_t$$

Figure II.11. Mesure du potentiel de membrane des cellules du cortex racinaire (D'après Bates *et al.*, 1982).

En haut, représentation schématique d'une cellule végétale avec la pointe de la microélectrode insérée dans la vacuole. En bas, schéma du circuit électrique équivalent. R_t , est la résistance du tonoplaste, R_p , la résistance "couplée" (en série) des membranes plasmiques de toutes les cellules traversées par l'électrode; r_s est une résistance de dérivation induite par la traversée du tonoplaste par l'électrode; σr_s est la résistance de dérivation induite par la traversée des membranes plasmiques par l'électrode, qui peut différer de r_s par un facteur "σ". L'équation (1) donne le voltage V_m mesuré à travers les deux membranes par une électrode insérée dans la vacuole. Si les deux membranes scellent bien autour de la micropipette (absence de fuite), la résistance r_s est très importante et le voltage mesuré indiquera la somme des potentiels de part et d'autre du tonoplastique (V_t) et de part et d'autre de la membrane plasmique (V_p): $V_m = V_t + V_p$. Si par contre r_s n'est pas plus importante que R_t et R_p , les différences de potentiel mesurées par l'électrode à travers le tonoplaste et la membrane plasmique seront sous-estimées. On admet généralement que la dérivation (shunt) est plus importante au niveau de la membrane plasmique qu'au niveau du tonoplaste, ce qui veut dire que le coefficient σ dans l'équation (1) est >1 . L'équation (2) décrit la résistance d'entrée R_m en présence de résistance de dérivation induite par l'électrode. En absence de dérivation (shunt) (*i.e.*, valeur de r_s élevée), l'équation (2) se réduit à $R_m = R_t(1+\beta)$, où $\beta = R_p/R_t$.

II.9.2.3 Dispositif expérimental

La racine excisée est placée sur un portoir en plexiglas à l'horizontale, attachée en plusieurs points par des fils. Le portoir est placé dans une cuve en plexiglas parcourue par un flux permanent de solution de mesure (figure II.10.A). La vitesse d'écoulement est constante et égale à $3,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (elle n'est nullement modifiée au cours de l'expérience). Le volume de la cuve est constant aussi, et égal à 3 mL.

La cuve est positionnée sur un micro-élévateur (IT6D CA1, Micro-contrôle, France) semi-automatique géré par un moteur pas à pas permettant d'élever la cuve par pas de $0,1 \mu\text{m}$ (figure II.10.B).

La microélectrode intracellulaire est placée à la perpendiculaire par rapport à l'axe de la racine sur une sonde (HS-2, gain X0,01, Axon instruments, USA) elle-même fixée sur un micromanipulateur manuel (Narishige, Japon). La position de la pointe de la microélectrode par rapport à l'épiderme de la racine est suivie en temps réel grâce à un microscope couplé à une caméra CCD permettant de visualiser l'électrode et la racine sur un écran vidéo. La cuve est éclairée grâce à une fibre optique disposée en face du champ optique du microscope, permettant d'éclairer l'ensemble du dispositif. Tout le système expérimental (cuve, microélévateur, microscope, micromanipulateurs...) est placé à l'intérieur d'une cage de Faraday, sur une table anti-vibration, isolée des sources extérieures de rayonnements électromagnétiques et de vibrations.

II.9.2.4 Mesure du potentiel de membrane

L'électrode intracellulaire est enfoncée dans une des cinq couches de cellules formant le cortex racinaire (profondeur théorique estimée d'après les coupes histologiques de la racine de riz comprise entre 15 à $120 \mu\text{m}$; Cf. § II. 8) en déplaçant verticalement le système cuve - portoir - racine à l'aide du micro-élévateur. La racine baigne entretemps dans la solution de base (CaSO_4 1 mM, MES-BTP 2 mM, $\text{pH}=6,0$). Une fois que l'électrode est correctement positionnée et qu'un signal stable peut être observé, les solutions de mesure contenant Na^+ et/ou K^+ sont percolées dans la cuve, grâce à un système de perfusion gravitationnel contrôlé par un système de robinets d'arrêt, en introduisant un épisode de lavage avec la solution de CaSO_4 de base entre les passages de deux solutions contenant Na^+ et/ou K^+ .

L'acquisition des données se fait grâce au programme FETCHEX (version 6,02; Axon Instruments) en mode acquisition continue (Gap-free) exécuté sur un micro-ordinateur interfacé (Interface Digidata 1200A, Axon Instruments, USA) à l'électrode (Axoprobe, Axon instruments).

Il faut préciser qu'il est peu probable que la pointe de l'électrode de mesure soit positionnée dans le cytoplasme vu que ce compartiment ne représente qu'un espace très réduit par rapport à l'espace occupé par la vacuole dans la cellule ($\sim 1\%$). Par conséquent, il y a beaucoup de chance que la pointe de la microélectrode soit localisée dans la vacuole et mesure un potentiel global représentant la somme des potentiel en série à travers le tonoplaste et la membrane plasmique (figure II.11).

*

* *

CHAPITRE III

Diversity in expression patterns and functional properties in the rice HKT transporter family

Diversity in expression patterns and functional properties in the rice HKT transporter family

Mehdi Jabnoune^{ab}, Sandra Espeout^{ac}, Delphine Mieulet^{ac}, Cécile Fizames^a, Jean-Luc Verdeil^d, Geneviève Conéjéro^{ad}, Alonso Rodríguez-Navarro^e, Hervé Sentenac^a, Emmanuel Guiderdoni^c, Chedly Abdelly^b, Anne-Aliénor Véry^{*a}

^a Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, CNRS(UMR 5004)-INRA-SupAgro-UM2, Campus SupAgro-M/INRA, 2 place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France.

^b Laboratoire d'Ecophysiologie et de Valorisation des Plantes Extrêmophiles, Centre de Biotechnologie de Borj-Cedria, BP 901, Hammam-Lif, 2050, Tunisia.

^c CIRAD-INRA-SUPAGRO-UM2, UMR 1098 DAP, Biological Systems Department, 2477 Avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France.

^d Plate-forme d'Histocytologie et Imagerie Cellulaire Végétale, IFR DAPHNé Développement et Amélioration des Plantes, UMR 1098 CIRAD-INRA-SUPAGRO-UM2 Biological Systems Department, 2477 Avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France.

^e Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid, Spain.

* Corresponding author. Tel.: +33 499 612574/ E-mail address : very@supagro.inra.fr

Na⁺, which is toxic at high concentration, can be partly substituted for K⁺ as vacuolar osmoticum. Control of K⁺ and Na⁺ uptake from the soil, long distance transport and accumulation is thus crucial for plant growth under low K⁺ availability or salt stress. A family of membrane transporters, named HKT, permeable to Na⁺ only or to both Na⁺ and K⁺, is thought to play major roles in these functions. The HKT family comprises 9 members in rice whereas a single HKT transporter, shown to be involved in Na⁺ transport in vascular tissues, is present in Arabidopsis. Here we report on the expression patterns and functional properties of 3 rice HKT transporters, OsHKT4, OsHKT6 and OsHKT1. Tissue localisation has been investigated by *in situ* hybridisation, revealing complex and partly overlapping expression patterns, including tissues in the plant vasculature or root periphery, but also various other cell types, the 3 transporters being expressed for example together in leaf bulliform cells (osmocontractile cells involved in leaf folding). Electrophysiological characterization of these transporters heterologously expressed in *Xenopus* oocytes has revealed striking functional diversity. OsHKT4 and OsHKT6 which are both permeable to Na⁺ only, strongly differ in their affinity for this cation and their rectification. OsHKT1, which is permeable to both Na⁺ and K⁺, is demonstrated to behave either as a Na⁺-K⁺ symport or as a Na⁺ uniport depending on external concentrations. The whole set of data indicates that HKT transporters fulfil very distinctive roles at the whole plant level.

Keywords

heterologous expression, HKT transporter, *in situ* hybridisation, *oryza sativa*, salt tolerance

Abbreviations :

HKT: high affinity K⁺ transporter; I/V: current-voltage relationship

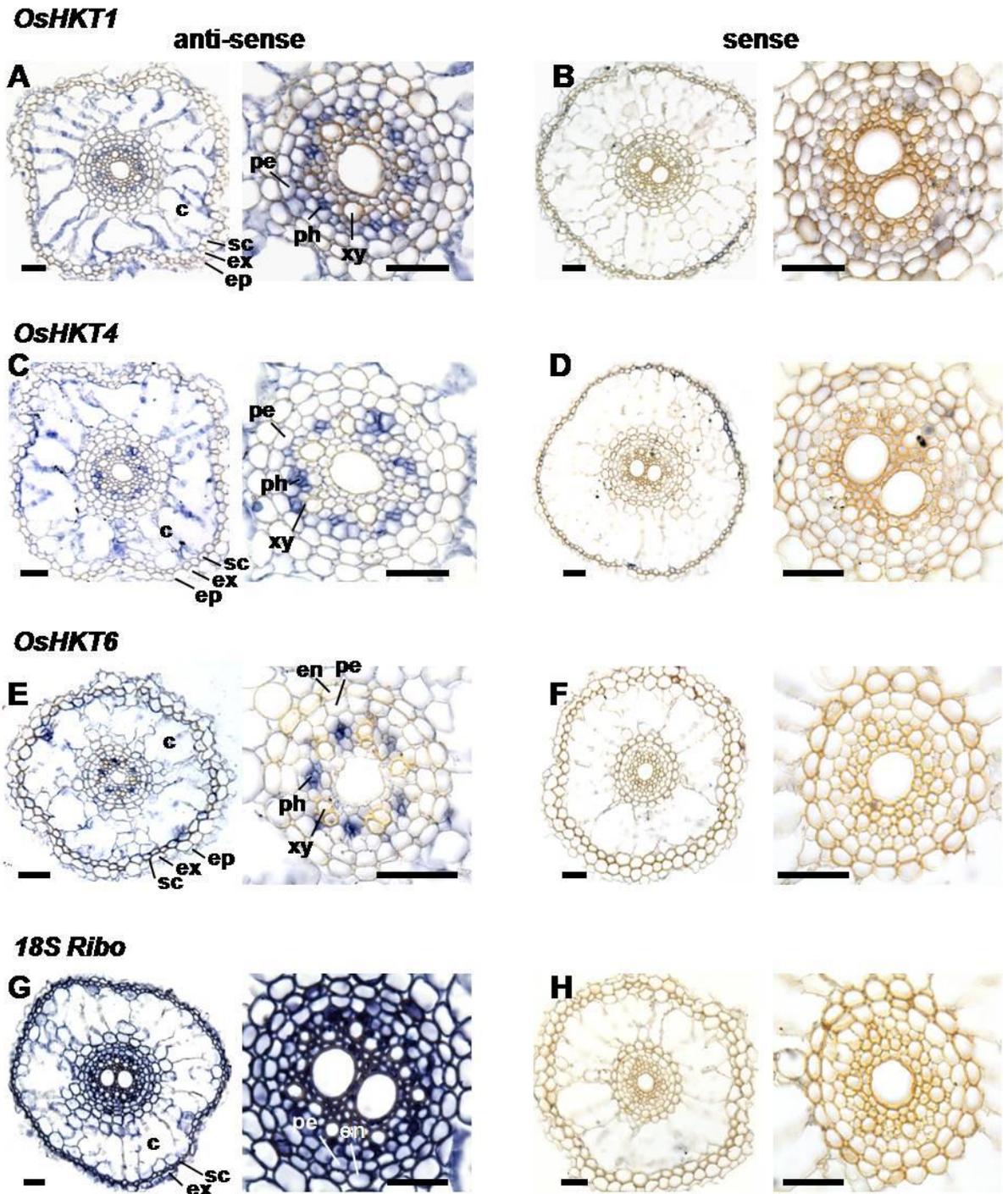


Figure 1. Localisation of *OsHKT1*, *OsHKT4* and *OsHKT6* expression in rice root by *in situ* hybridisation.

Twelve day-old plants were subjected to reduced K^+ (100 μ M) and mild salt stress (50 mM NaCl) conditions for 18 days before tissue collection. Hybridisations of root cross sections were revealed with VectorBlue kit III.

(A), (B) Localisation of *OsHKT1* transcripts.

(C), (D) Localisation of *OsHKT4* transcripts.

(E), (F) Localisation of *OsHKT6* transcripts.

(G), (H) Control: Hybridisation with *18S* ribonucleic RNA probe.

(A), (C), (E), (G) Anti-sense probes.

(B), (D), (F), (H) Sense probes.

c, cortex; en, endodermis; ep, epidermis; ex, exodermis; pe, pericycle; ph, phloem; sc, sclerenchyma; xy, xylem. Scale bar: 100 μ m.

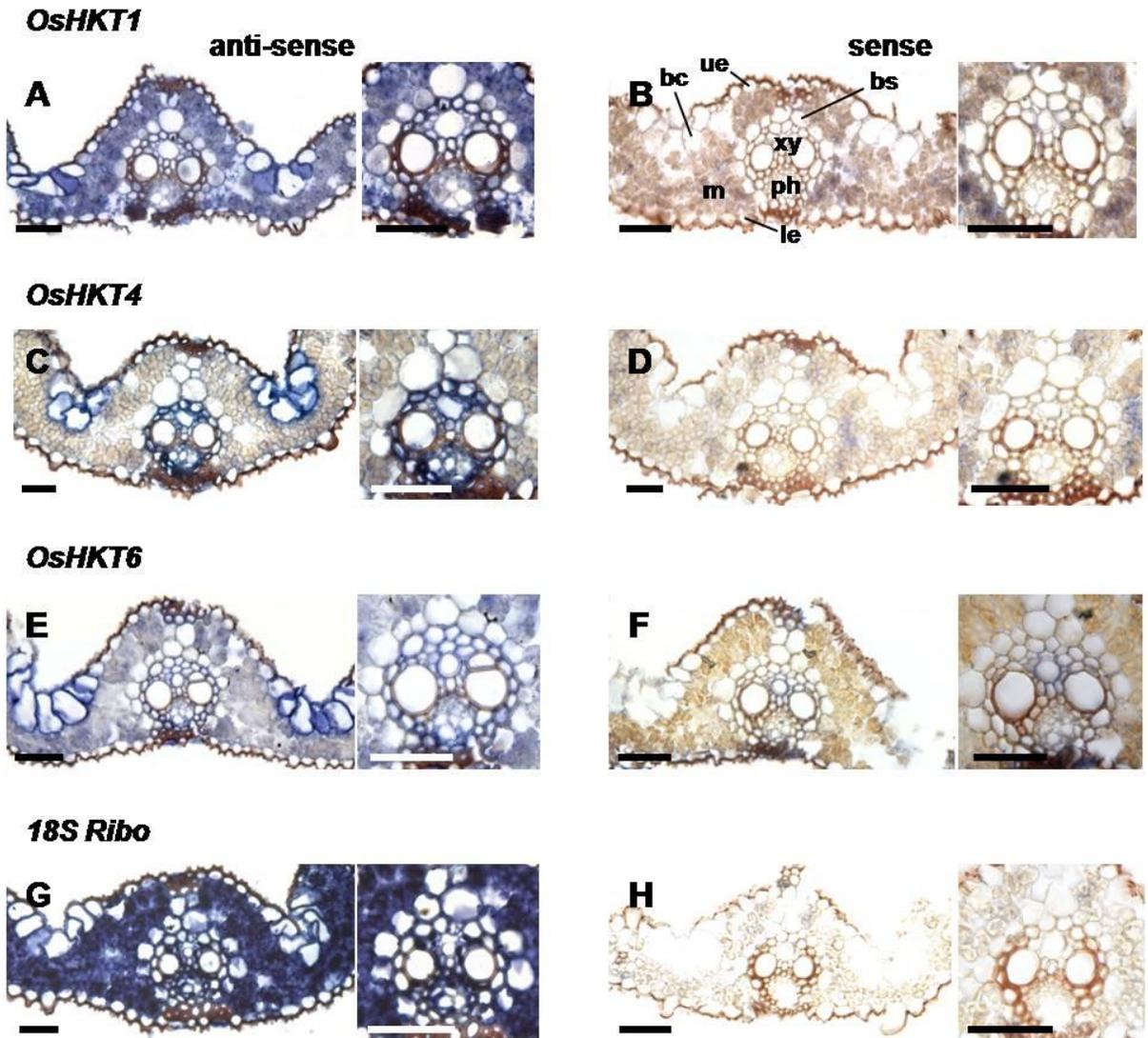


Figure 2. Localisation of *OsHKT1*, *OsHKT4* and *OsHKT6* expression in rice leaf by *in situ* hybridisation.

Twelve day-old plants were subjected to reduced K^+ (100 μ M) and mild salt stress (NaCl 50 mM) conditions for 18 days before tissue collection. Hybridisations of mature leaf blade cross sections were revealed with VectorBlue kit III.

(A), (B) Localisation of *OsHKT1* transcripts.

(C), (D) Localisation of *OsHKT4* transcripts.

(E), (F) Localisation of *OsHKT6* transcripts.

(G), (H) Control: Hybridisation with 18S ribonucleic RNA probe.

(A), (C), (E), (G) Anti-sense probes.

(B), (D), (F), (H) Sense probes.

bc, bulliform cells; bs, bundle sheath cells; le, lower epidermis; m, mesophyll; ph, phloem; up, upper epidermis; xy, xylem. Scale bar: 50 μ m.

INTRODUCTION

Although it is not clear what levels of Na⁺ are toxic in the plant cell cytosol and actually unacceptable *in vivo*, the hypothesis that this cation must be excluded from the cytoplasm is widely accepted. The most abundant inorganic cation in the cytosol is K⁺, in plant as in animal cells. This might be due to the fact that this cation is less chaotropic than Na⁺, *i.e.*, more compatible with protein structure even at high concentrations (Clarkson et al., 1980). Also, it might be due to the fact that life originated in environmental conditions where Na⁺ was more abundant than K⁺, like sea water, and that the most straightforward process to energise the cell membrane in such conditions was to accumulate the less abundant cation and to exclude the more abundant one. It is thus tempting to imagine that control of K⁺ and Na⁺ transport and accumulation is a central function in every living cell.

In the cell, K⁺ plays a role in basic functions, such as regulation of cell membrane polarisation, electrical neutralisation of anionic groups and osmoregulation. Concerning the latter function, K⁺ uptake or release is the usual way through which plant cells control their water potential and turgor. Although toxic at high concentrations, Na⁺ can be used as osmoticum and substituted to K⁺, mainly in the vacuole, when the plant is facing low K⁺ conditions and Na⁺ available in the soil solution. This use of Na⁺ requires however a tight regulation of K⁺ and Na⁺ transport and compartmentalisation. Furthermore, control of Na⁺ and K⁺ uptake, long distance transport in the xylem and phloem vasculatures, accumulation in aerial parts and compartmentalisation at the cellular and tissular levels has been demonstrated to be of crucial importance in plant adaptation to salt stress. Clearly, such functions require integration at the whole plant level of Na⁺ and K⁺ membrane transport system activities.

The present report concerns transport systems named upon first identification HKT, for High Affinity K⁺ transporters, active at the plasma membrane and permeable to both K⁺ and Na⁺ or to Na⁺ only (Schachtman and Schroeder, 1994; Rodríguez-Navarro and Rubio 2006; Horie et al. 2007). In *Arabidopsis*, the HKT family comprises a single member, AtHKT1, which is permeable to Na⁺ only (Uozumi et al., 2000) and contributes to Na⁺ removal from the ascending xylem sap and recirculation from the leaves to the roots via the phloem vasculature (Berthomieu et al., 2003; Sunarpi *et al.*, 2005). Interestingly, the HKT family comprises a much larger number of members in rice, with 7 to 9 genes depending on the cultivar (Garcia-deblás et al., 2003). In line with previous reports using rice as a model species to decipher the roles that HKT transporters can play in the plant, we have analysed the expression patterns of 3 *OsHKT* genes, *OsHKT1*, *OsHKT4* and *OsHKT6*, and investigated the functional properties of these transporters after heterologous expression, revealing striking diversity.

RESULTS

Expression patterns of *OsHKT1*, *OsHKT4* and *OsHKT6*

The expression patterns of *OsHKT1*, *OsHKT4* and *OsHKT6* were analysed using the *in situ* hybridisation technique in 30 day-old rice plants grown in standard conditions, K⁺ shortage or salt stress conditions. Cross sections of roots (Fig. 1) and leaves (Figure 2) were hybridised with anti-sense or sense RNA probes specific of *OsHKT1*, 4 or 6 transcripts. Positive controls using a *18S* ribonucleic RNA anti-sense probe confirmed that strong hybridisation signals could be observed in all root and leaf tissues in our experiments (Figures 1G and 2G). Negative controls with *HKT* or *18S* sense probes did not lead to significant labelling (Figures

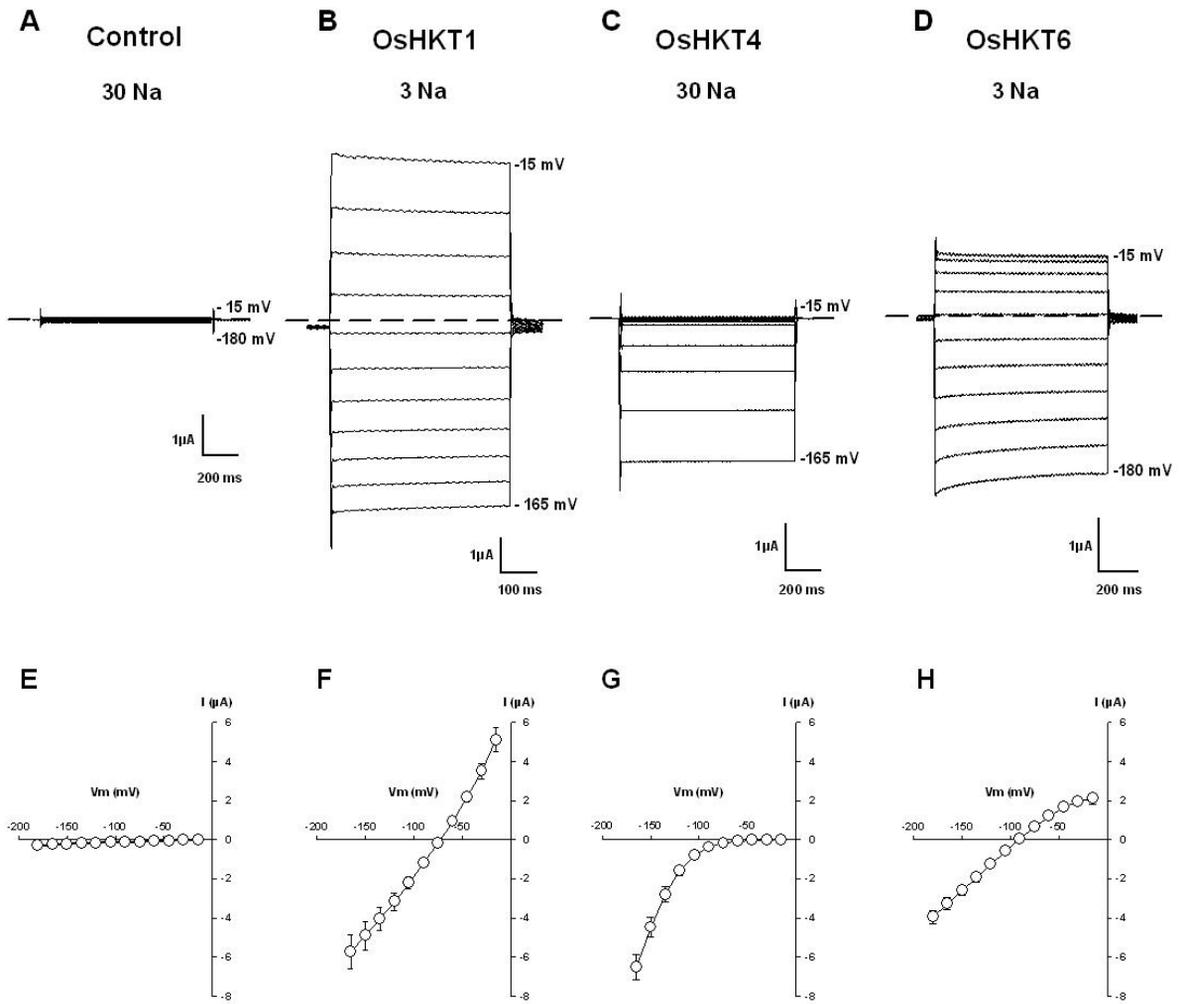


Figure 3. Rice HKT transporters differ in their rectification properties.

(A) to (D) Examples of currents recorded in *Xenopus* oocytes.

(E) to (H) Mean current-voltage (I-V) curves.

(A), (E) Control (water injected) oocytes.

(B), (F) Oocytes expressing OsHKT1.

(C), (G) Oocytes expressing OsHKT4.

(D), (H) Oocytes expressing OsHKT6.

Currents were measured in a bath solution containing either 3 mM Na-glutamate (3 Na) ([B], [D], [F], [H]) or 30 mM Na-glutamate (30 Na) ([A], [C], [E], [G]). Applied voltages varied in the range -165 to -15 mV with an increment of +15 mV (most positive and negative voltages applied indicated at right of the corresponding current traces). The dashed line ([A] to [D]) marks the zero current level. Data presented in I-V relationships ([E] to [H]) correspond to total oocyte currents (means \pm SE, $n \geq 4$).

1B, 1D, 1F, 1H, 2B, 2D, 2F and 2H). Growth conditions did not seem to affect the tissular expression pattern of the three *HKT* genes (not shown).

In roots, labelling of *OsHKT1* expression with the anti-sense probe was strongest in peripheral layers (cortex, epidermis, exodermis). It was also detected in the stele, mainly in phloem (Figure 1A). The expression pattern of *OsHKT4* in roots was reminiscent of that of *OsHKT1* (Figure 1C), the labelling requiring however longer revelation time, suggesting that the level of *OsHKT4* expression in roots was lower than *OsHKT1* one. Expression of *OsHKT6* also was detected both in peripheral layers (mainly cortex) and stele (vascular tissues), but contrary to *OsHKT1* and *OsHKT4*, the labelling was strongest in the phloem (Figure 1E).

In mature leaves, transcripts of the three *HKT* genes were identified in bulliform cells, large cells of the upper epidermis controlling by turgor adjustment the folding of the leaf (Figures 2A, 2C and 2E). Staining of *OsHKT6* transcripts was particularly strong in these cells. *OsHKT1* and *OsHKT6* expression was also detected in vascular tissues (xylem and phloem), and to a lower extent, in mesophyll (Figures 2A and 2E). Like in roots, the different growth conditions did not change the tissular expression pattern in leaves (not shown). Staining was on the other hand dependent on the developmental stage: Young rolled leaves in sheath displayed broader expression pattern of the three *HKT* genes. In particular, high labelling of mesophyll was observed in sheath for the three *HKT* genes (not shown).

Rectification properties of HKT transporters expressed in *Xenopus* oocytes

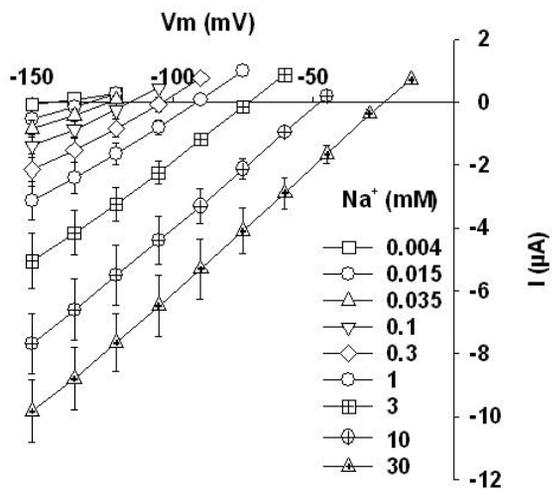
Functional diversity among the rice HKT transporter family was apprehended by characterising OsHKT1, OsHKT4 and OsHKT6 in parallel experiments, after heterologous expression in *Xenopus* oocytes. OsHKT1 had already been partly characterised in yeast and *Xenopus* oocytes but conclusions were controversial, the transporter being described either as a highly selective Na⁺ transporter (Horie et al., 2001; Garciadeblás et al., 2003) or a weakly selective alkali cation transporter (Golldack et al., 2002). OsHKT4 had been reported to work as a Na⁺-selective transporter in yeast (Garciadeblás et al., 2003).

For each of the three transporters OsHKT1, 4 and 6, injection of 50 ng of transporter cRNA per oocyte resulted in a high level of expression 24 to 48 hours after the oocyte injection. Figure 3 shows typical examples of current traces and mean currents recorded in control oocytes injected with water and in oocytes expressing either OsHKT1, OsHKT4 or OsHKT6. Currents were recorded in Na⁺-containing media since the three OsHKT transporters were already reported or could be predicted (based on phylogenetic relationships, see Discussion) to be permeable to Na⁺. For each HKT transporter, the level of inward currents recorded in expressing oocytes after 24 - 48 hours of expression was at least 25 times larger than that recorded in control oocytes. Thus, each of the three transporters was far the main transport system active at the oocyte membrane.

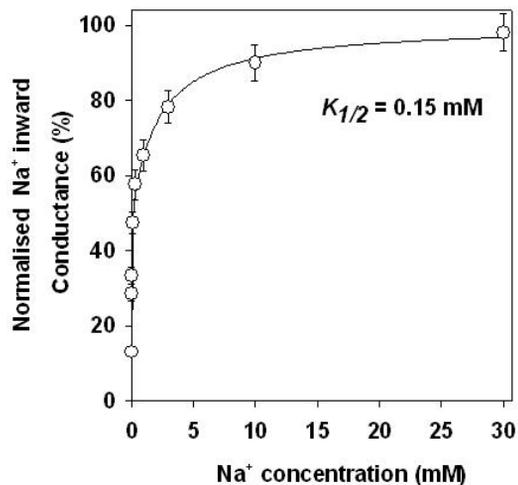
Currents mediated by OsHKT1, 4 or 6 in Na⁺-containing solutions activated instantaneously and remained stable or slightly decreased over a 1 second voltage clamp stimulation (Figures 3B to 3D). Surprisingly, the three OsHKT transporters exhibited marked difference in rectification properties. Two of them, OsHKT1 and OsHKT6 were able to mediate both inward and outward currents as already observed in members of the plant HKT family characterised so far (Rubio et al., 1995; Fairbairn et al., 2000; Uozumi et al., 2000; Horie et al., 2001; Ren et al., 2005), but the former almost did not rectify while the latter displayed weak inward rectification, its outward currents saturating when the driving force increased (Figures 3B, 3D, 3F, 3H). The third transporter, OsHKT4 strongly differed from the two other ones since it was strongly inwardly rectifying, mediating no outward current

OsHKT1

A

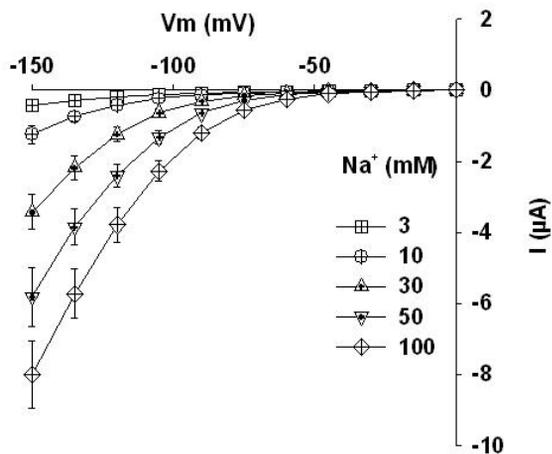


B

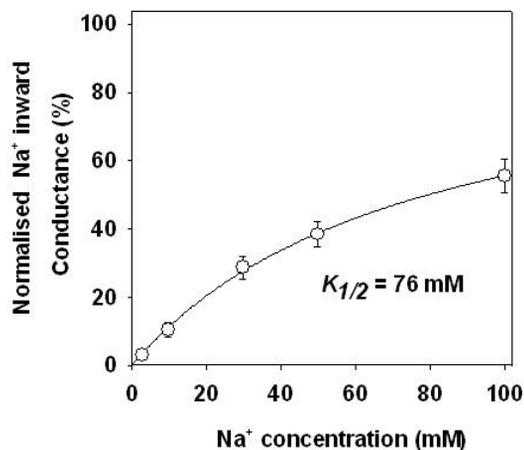


OsHKT4

C

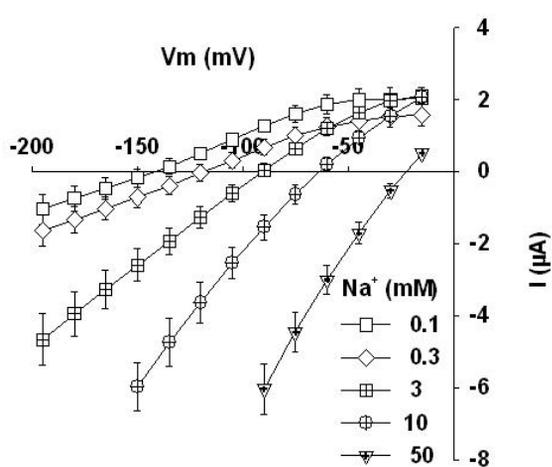


D



OsHKT6

E



F

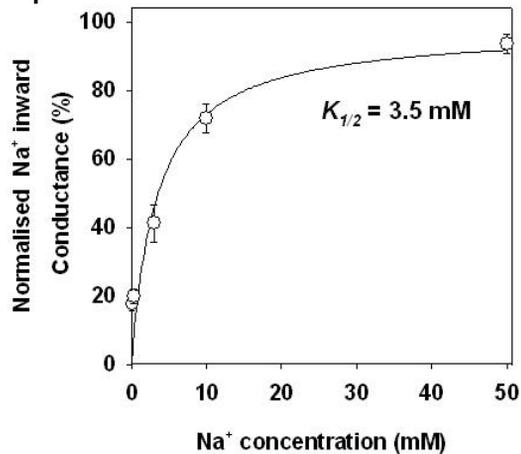


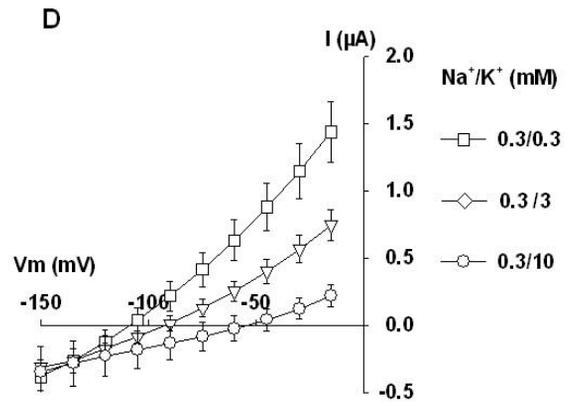
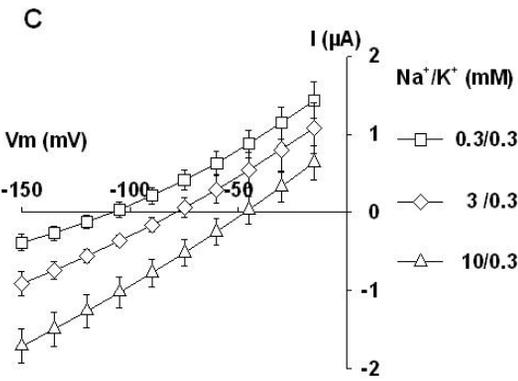
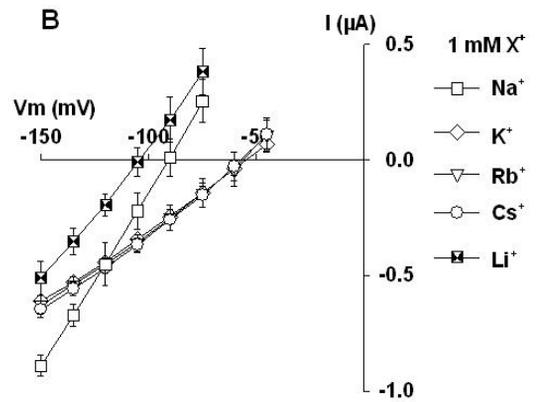
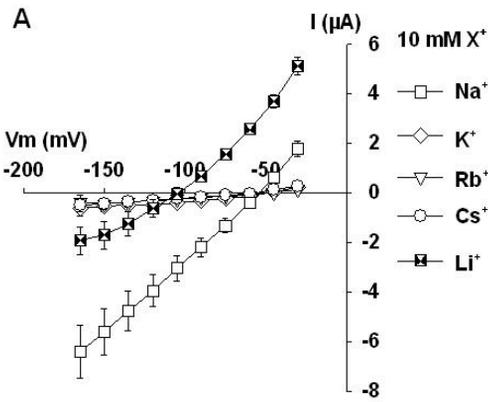
Figure 4. Rice HKT transporters differ in their affinity for Na⁺.

(A), (C), (E) I-V curves from oocytes expressing either OsHKT1 [A], OsHKT4 [C] or OsHKT6 [E] in presence of varying external Na⁺ concentrations. The background solution contained 4 μM Na⁺ and 2 μM K⁺ as contaminants. Additional Na⁺ was brought as glutamate salt (final concentrations indicated in the figure panels). Currents flowing through HKT transporters were extracted from total oocyte currents by subtracting mean currents obtained in water-injected oocytes from the same batch in the same ionic conditions (see methods).

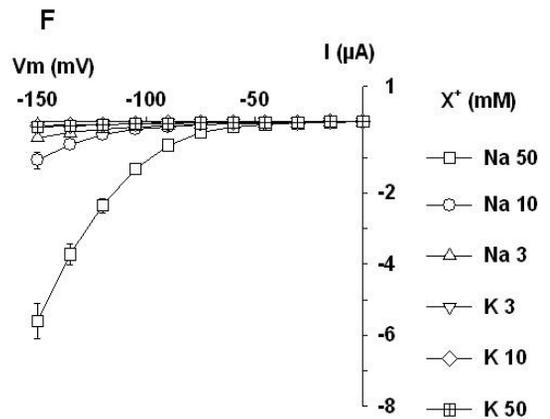
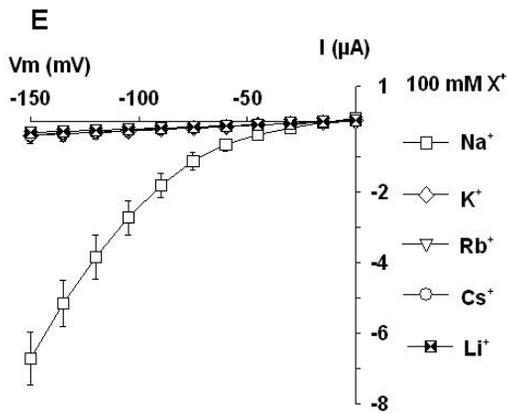
(B), (D), (F) Variation of OsHKT inward conductance with external Na⁺ concentration. Macroscopic conductances were defined as slopes of I-V relationships, either close to reversal potentials in the non rectifying OsHKT1 and OsHKT6 transporters (determination on three I-V points) or between -150 and -120 mV in the inwardly rectifying OsHKT4 transporter. Macroscopic inward conductances in [B], [D] and [F] were extracted from I-V data shown in [A], [C] and [E], respectively. Inward conductance values obtained for each oocyte were plotted versus external Na⁺ concentration, then normalized by the maximal conductance determined with a hyperbolic fit, to suppress variability caused by difference in oocyte level of expression. Mean normalized Na⁺ inward conductances were fitted again with a hyperbolic equation (two-site saturation in [B], one site in [D] and [F]; solid lines) to determine the apparent $K_{1/2}$ (half saturation concentration whatever the fitting equation used).

Data are means ± SE ($n = 5$ in [A], [B], [E] and [F], $n = 6$ in [C] and [D]) and are representative of at least two experiments performed on different oocyte batches.

OsHKT1



OsHKT4



OsHKT6

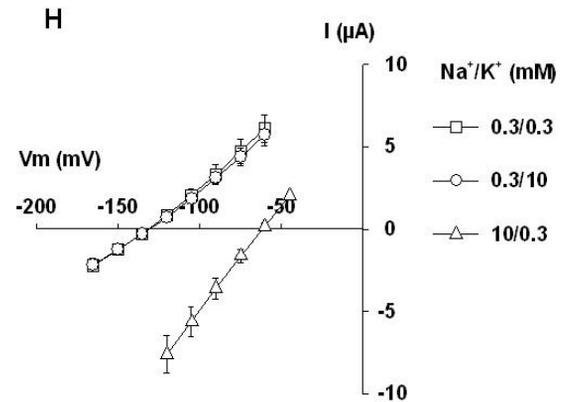
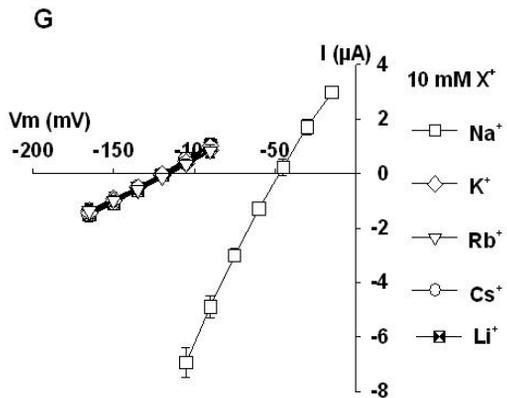


Figure 5. Rice HKT transporters display different cation selectivities.

(A) to (D) Oocyte currents mediated by OsHKT1.

(E), (F) Oocyte currents mediated by OsHKT4.

(G), (H) Oocyte currents mediated by OsHKT6.

(A), (B), (E) and (G) Bath solutions: standard background successively supplemented with either Na⁺, K⁺, Rb⁺, Cs⁺ or Li⁺ (chloride salts, XCl), at a concentration of either 10 mM ([A] and [G]), 1 mM ([B]) or 100 mM ([E]).

(C), (D), (F) and (H) Bath solutions with varying concentrations, eventually mixed, of Na⁺ and K⁺ (glutamate salts). Na⁺ and K⁺ concentrations are indicated (in mM) in the figure panels.

About 10, 10 and 25 μM K⁺ and 10, 15 and 20 μM Na⁺ were present as contaminants in bath solutions containing 1 ([B]), 10 ([A] and [G]) and 100 mM ([E]) cations, respectively. Data are means ± SE (*n* = 4 in [A], [C] and [D], *n* = 7 in [B] and [H], and *n* = 6 in [E] and [F]) and are representative of at least two experiments performed on different oocyte batches.

(Figure 3C and 3G). Measurements of oocyte membrane resting potentials in bath solutions containing a few millimolar external Na^+ yielded values consistent with the rectification properties of the three transporters. For example, the membrane potential in presence of 3 mM external Na^+ was much more negative in oocytes expressing OsHKT1 or OsHKT6 (-72 ± 1 mV and -90 ± 4 mV) than in oocytes expressing OsHKT4 (-19 ± 2 mV) or control water-injected oocytes (-17 ± 2 mV). A strong inward rectification such as that observed in OsHKT4 had not been previously reported in the plant HKT family.

Affinity for Na^+

Na^+ uptake kinetics with respect to external Na^+ concentration was studied in the three OsHKT transporters (Figure 4). External Na^+ concentration was varied in the range 4 μM to 100 mM, external K^+ being kept as traces only (~ 2 μM). Increasing external Na^+ concentration increased the macroscopic inward conductance of the three transporters in a saturable manner (Figure 4). In the two non or weakly rectifying transporters OsHKT1 and OsHKT6, increasing external Na^+ also induced, as expected, positive shifts of the current reversal potential (Figures 4A and 4E). Fitting the inward conductance *versus* external Na^+ with hyperbolic functions gave rise to apparent half saturation constants ($K_{1/2}$) which were strikingly different in the three transporters: one order of magnitude separated the $K_{1/2}$ of OsHKT1 (0.15 ± 0.07 mM Na^+ , [$n = 5$]) from that of OsHKT6 (3.5 ± 2 mM Na^+ , [$n = 5$]), which was itself separated by more than one order of magnitude from that of OsHKT4 one (76 ± 8 mM Na^+ , [$n = 6$]). Hence, the rice HKT transporter family comprises members displaying either high, low or extremely low Na^+ uptake affinity. It should also be noted that the inward conductance *versus* external Na^+ relationships could be well fitted with a single site hyperbolic function in OsHKT4 and OsHKT6, but not in OsHKT1 (Figure 4B). Running two site saturation fits, a high affinity and a low affinity half saturation constants (9.5 ± 0.2 μM Na^+ and 2.2 ± 0.2 mM Na^+) could be resolved in OsHKT1, suggesting that this transporter may possess a dual mode of Na^+ uptake (see below).

Cation selectivity

The cation selectivity of the three OsHKT transporters was examined by comparing the currents mediated in the presence of different monovalent cations (Figure 5). Figures 5A and 5B shows mean OsHKT1 currents recorded successively in presence of Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ or Li^+ . The external cation concentration was either 10 mM (Figure 5A) or 1 mM (Figure 5B). In the presence of 10 mM external Na^+ , OsHKT1 could mediate large inward and outward currents reversing close to -50 mV, as previously shown. When Li^+ replaced Na^+ at the same concentration, both inward and outward OsHKT1 currents could still be observed, but the current-voltage relationship (I/V) was shifted 50 mV negatively and the inward conductance was reduced (Figure 5A). This indicates that OsHKT1 is selective for Na^+ against Li^+ , probably by favouring Na^+ at a conducting site. When oocytes were bathed with 10 mM K^+ , Rb^+ or Cs^+ , both inward and outward currents through OsHKT1 almost disappeared (Figure 5A) and the reversal potential of residual currents remained close to that observed in the presence of Na^+ . OsHKT1 is therefore also highly selective for Na^+ against K^+ , Rb^+ and Cs^+ in these conditions, but the mechanism of selectivity seems different from that occurring between Na^+ and Li^+ . The strong reduction of both inward and outward currents and the absence of hyperpolarised reversal potential in presence of 10 mM external K^+ , Rb^+ or Cs^+ suggest that the selectivity for Na^+ against the latter cations is not due to high discrimination, but that external K^+ , Rb^+ or Cs^+ , present at 10 mmole.L⁻¹, renders OsHKT1 very poorly conductive. Similar current patterns were observed when external cations were present at 100

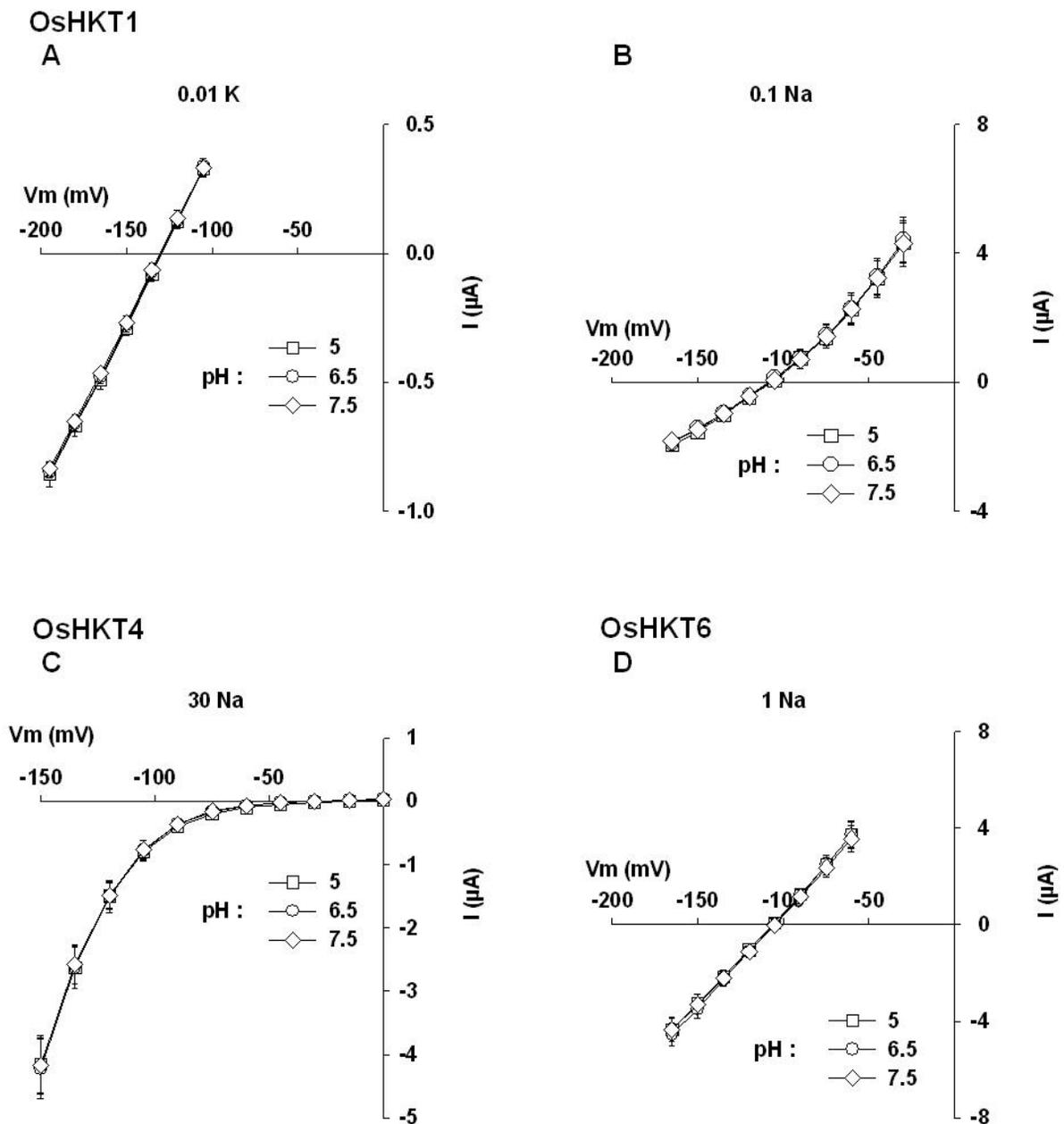


Figure 6. OsHKT1, OsHKT4 and OsHKT6 are insensitive to extracellular pH.

(A), (B) Effect of external pH on OsHKT1 currents. Bath solutions: background supplemented with 0.01 mM K⁺ in [A] or 0.1 mM Na⁺ in [B]. About 2 μM contaminating K⁺ and 1 μM contaminating Na⁺ in [A] and [B].

(C) Effect of external pH on OsHKT4 currents. Bath solutions contained 30 mM Na⁺. Contaminant K⁺: 2 μM.

(D) Effect of external pH on OsHKT6 currents. Bath solutions contained 1 mM Na⁺. Contaminant K⁺: 2 μM.

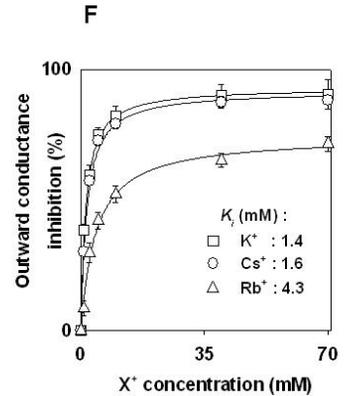
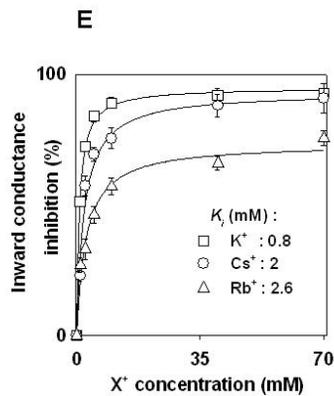
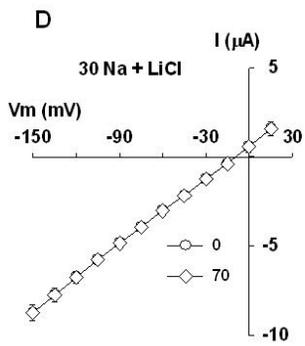
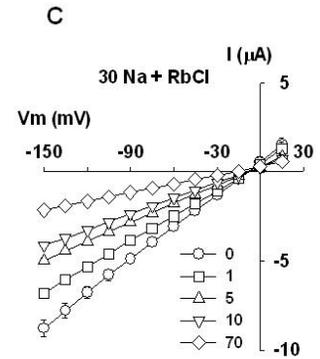
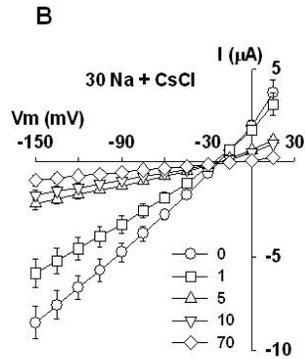
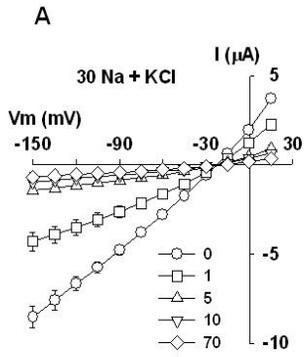
Na⁺ and K⁺ were added as glutamate salts. Data are means ± SE (*n* = 7 in [A] and [D], *n* = 4 in [B] and [C]) and are representative of two experiments performed on different oocyte batches.

mmole.L⁻¹ (not shown): the reversal potential of OsHKT1 currents in bath containing Na⁺ was then close to zero (+5 ± 2 mV, [*n* = 16]), and it was shifted by -81 ± 1 mV when Na⁺ was changed for Li⁺; also, almost no current was observed in K⁺, Rb⁺ or Cs⁺. Interestingly, when the external cation concentration was reduced to 1 mmole.L⁻¹, a different current pattern was observed (Figure 5B). A reduction of the inward conductance and a negative shift of the current reversal potential when Li⁺ replaced Na⁺ was still observed. The shift of the reversal potential was however less important than in presence of 10 or 100 mM cations, probably due to more important weight of contamination (see Figure legend). The most important difference in current pattern in presence of 1 mM external monovalent cation concerned K⁺, Rb⁺ and Cs⁺ (Figure 5B). Contrary to what was observed when these cations were present at 10 or 100 mM, when either of the three cations was present at 1 mM, noticeable inward (Figure 5B) and outward (not shown) currents could be recorded. These currents reversed at a potential more positive than in presence of 1 mM Na⁺, excluding that they could be due to Na⁺ contaminations. Hence, at high external cation concentration, OsHKT1 would be almost only permeable to Na⁺ but at low external cation concentration, it would be permeable also to K⁺, Rb⁺ and Cs⁺.

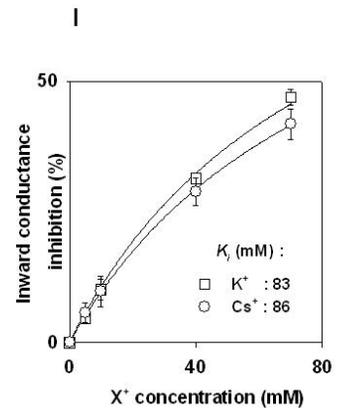
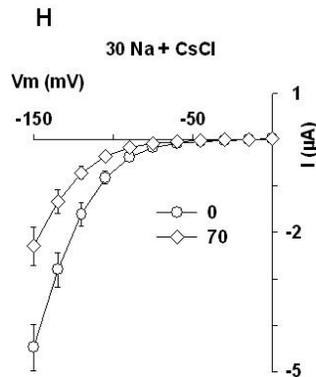
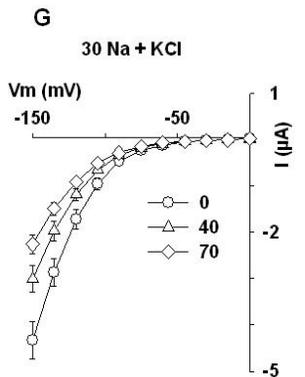
In order to further analyse the permeability to K⁺ in OsHKT1, currents were recorded in solutions containing both Na⁺ and K⁺ at different concentrations, 0.3, 3 and 10 mM (Figures 5C and 5D). When external K⁺ was present at 0.3 mM, increasing external Na⁺ from 0.3 to 3 mM then to 10 mM led to slight increases in OsHKT1 inward and outward conductance (1.8 ± 0.02 times between 0.3 and 3 mM, and 1.4 ± 0.02 times between 3 and 10 mM) and positive shifts of the current reversal potential (61 ± 3 mV between 0.3 and 10 mM) (Figure 5C), similarly to what was observed when K⁺ was present as trace only (Figure 4A). In the symmetrical experiment, when external Na⁺ was present at 0.3 mM, increasing external K⁺ from 0.3 to 3 mM then to 10 mM led to quite similar shifts of current reversal potential (54 ± 2 mV between 0.3 and 10 mM), but to strong decreases in OsHKT1 inward and outward conductance (4.8 ± 1 times between 0.3 and 3 mM, and 8.3 ± 1 times between 0.3 and 10 mM) (Figure 5D). This indicates that when Na⁺ and K⁺ are both present in the bath, at least in conditions of concentration used in this experiment, OsHKT1 carries both cations, but external K⁺ exerts an inhibitory effect on OsHKT1 macroscopic inward and outward conductances.

The selectivity to monovalent cations in OsHKT4 and OsHKT6 was analysed in a similar way (Figures 5E to 5H). When oocytes were bathed successively in 100 mmole.L⁻¹ of either Na⁺, K⁺, Rb⁺, Cs⁺ or Li⁺, significant OsHKT4 inward currents were recorded in the presence of Na⁺ only (currents in Na⁺ about 20 times greater than those in the presence of the other cations) (Figure 5E). Absence of permeability to K⁺ in OsHKT4 in solutions containing only traces of Na⁺ was checked at lower concentration. OsHKT4 currents were negligible and almost constant when external K⁺ concentration was varied in the range 3 to 50 mM, while they strongly increased when external Na⁺ concentration was raised within the same range (Figure 5F). This confirmed that OsHKT4, at least in absence of Na⁺, is not permeable to K⁺. The question of a possible permeability to K⁺ in presence of Na⁺ in OsHKT4 was difficult to address, because of the strong inward rectification and hence absence of variation with external concentration of the reversal potential in this transporter. However, we did not observe any current increase when K⁺ in the range 5 to 70 mM was added to 30 mM external Na⁺ (the current rather decreased) (Figure 7G), indicating that OsHKT4 is not likely working as a Na⁺-K⁺ cotransporter in mixed Na⁺ and K⁺ conditions.

OsHKT1



OsHKT4



OsHKT6

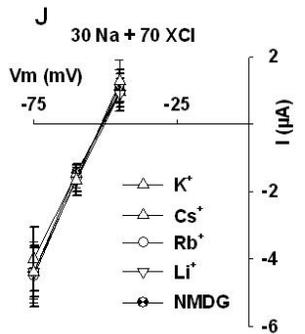


Figure 7. Inhibition of Na⁺ transport by monovalent cations in rice HKT transporters.

Effect of external monovalent cations on Na⁺ transport through OsHKT1 ([A] to [F]), OsHKT4 ([G] to [I]) and OsHKT6 ([J]). Na⁺ external concentration (chloride salt) was 30 mM. Added concentrations of K⁺ ([A], [G], [J]), Cs⁺ ([B], [H], [J]), Rb⁺ ([C], [J]), and Li⁺ ([D], [J]) (chloride salts) are indicated (in mM) in the figure panels. Chloride concentration was kept the same in all bath solutions by adding, when necessary, HCl titrated with N-methyl-D-glucamine (NMDG-Cl).

(A) to (D), (G), (H) and (J) I-V curves.

(E), (F) and (I) Kinetics of inhibition by external cations of inward ([E] and [I]) and outward (F) OsHKT conductances. Inward and outward conductances were determined in the non rectifying OsHKT1 transporter using I-V data at potentials respectively between -150 and -105 mV, and between 0 and +15 mV. Inward conductances were determined in the inwardly rectifying OsHKT4 transporter between -150 and -120 mV. External cation concentrations leading to half conductance inhibition (K_i , indicated in the figure panels) were obtained by mass action law fits (solid lines).

Data are means \pm SE; $n = 6$ in [A] to [F], $n = 5$ in [G] to [J].

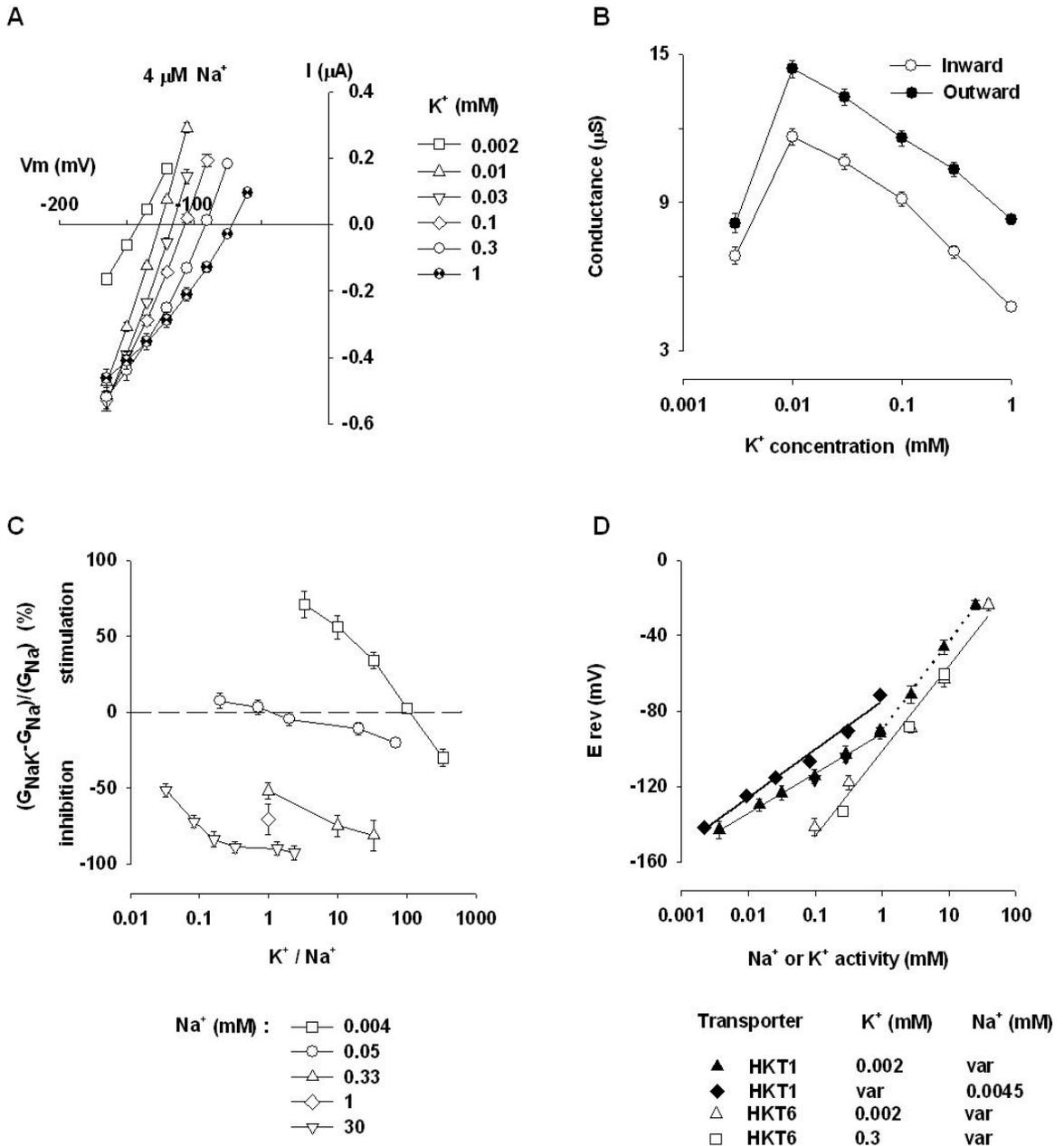


Figure 8. Interaction between Na⁺ and K⁺ in OsHKT1.

(A) and (B) Effect of increasing external K⁺ on OsHKT1 transport properties in presence of low external Na⁺. External [Na⁺] was 4 μM (Na⁺ present as contaminant). External K⁺ concentrations (2 μM to 1 mM) are indicated in the figure panels. 2 μM K⁺ were present as contaminants. Additional K⁺ was brought as glutamate salt. (A) I-V curves. (B) Conductances extracted from I-V data shown in (A). Inward and outward conductances were determined close to reversal potentials (three point and two point determination respectively).

(C) Absence of univocal relationship between the sensitivity of OsHKT1 inward conductance to K^+ and the K^+/Na^+ concentration ratio in the bath solution. G_{Na} and G_{NaK} : OsHKT1 conductance in absence and in presence, respectively, of added K^+ (contaminating K^+ concentration: 2 to 10 μM). The concentration of Na^+ in the bath solution was either 0.004 (contamination in background), 0.05, 0.3, 1 or 30 mM.

(D) Sensitivity of OsHKT1 and OsHKT6 zero-current potential (E_{rev}) to external Na^+ or K^+ activity. In each set of solutions, either the concentration of K^+ was fixed and that of Na^+ variable, or that of Na^+ was fixed and that of K^+ variable (activities indicated in mM in the Figure panel). Solid lines are logarithmic fits of E_{rev} *versus* the varying Na^+ activity or the varying K^+ activity.

Black symbols: OsHKT1. Slope of the logarithmic fits: 26 mV / decade of K^+ activity in presence of 4 μM Na^+ . In presence of 2 μM K^+ and varying Na^+ concentrations, regressions were performed on E_{rev} values at activities either lower than 1 mM or higher than 1 mM, leading to slope values of 22 or 48 mV / decade of Na^+ activity, respectively.

White symbols: OsHKT6. Slope of the fits: 46 mV / decade of Na^+ activity, independently of the K^+ activity (0.002 or 0.25 mM).

Data are means \pm SE ($n = 7$ in [A] and [B], $n = 5$ to 7 in [C] and [D]).

In OsHKT6, like in OsHKT4, no indication of an important permeability to another cation than Na⁺ was obtained (Figures 5G and 5H). When Na⁺, K⁺, Rb⁺, Cs⁺ and Li⁺ were brought separately at 10 mmole.L⁻¹ in the bath, OsHKT6 currents reversed either close to -50 mV (-47 ± 1 mV) in the case of Na⁺, like in OsHKT1, or about -70 mV more negatively (-116 ± 2 mV) in the case-of K⁺, Rb⁺, Cs⁺ or Li⁺ (Figure 5G). The negative shift in reversal potential when K⁺, Rb⁺, Cs⁺ or Li⁺ replaced Na⁺ was accompanied by a reduction in OsHKT6 inward and outward conductance (5 ± 1 times reduction) (Figure 5G). In solutions containing both Na⁺ and K⁺, no indication of K⁺ permeability was either obtained (Figure 5H): increasing K⁺ concentration from 0.3 to 10 mM in the presence of 0.3 mM Na⁺ did not modify OsHKT6 reversal potential nor the inward and outward conductances, whereas increasing Na⁺ concentration in the symmetrical experiment (K⁺ concentration fixed to 0.3 mM) slightly increased OsHKT6 conductance and shifted positively OsHKT6 reversal potential by 70 ± 3 mV.

K⁺ uptake in the wheat TaHKT1 transporter was first reported to be energised by H⁺ (Schachtman and Schroeder, 1994), and several HKT-relative transporters in fungi which have their activity regulated by external pH are thought to work as H⁺-K⁺ symports, at least in certain conditions (Lichtenberg-Frate et al., 1996; Bihler et al., 1999; Rodríguez-Navarro, 2000). We therefore investigated whether external pH regulates K⁺ and/or Na⁺ transport in the three OsHKT transporters (Figure 6). Experiments were performed with solutions containing K⁺ "only" (contaminant Na⁺ : ~ 1 µM), or Na⁺ "only" (contaminant K⁺ : ~ 2 µM) for OsHKT1 (Figures 6A and 6B), since this transporter was shown to be permeable to both cations, or Na⁺ "only" for OsHKT4 and OsHKT6 (Figures 6B to 6D). In every case, to favour observation of H⁺-Na⁺ or H⁺-K⁺ cotransport behaviour if any, external Na⁺ concentrations were chosen far from values saturating the conductance (Na⁺ concentration lower than K_{1/2} for each transporter), and external K⁺ concentration for OsHKT1 was fixed very low (12 µM). Decreasing external pH from 7.5 to 6.5 and 5 neither modified the conductance of the three transporters nor induced shifts in the I-V relationships. Thus, OsHKT-1, -4 and -6 would not transport H⁺ nor be regulated by external pH.

Inhibition of Na⁺ transport by monovalent cations in OsHKT transporters

Inhibition by external K⁺ of high affinity Na⁺ uptake through OsHKT1 had been evidenced by flux analysis after expression of the transporter in yeast (Garcia-deblás et al., 2003). In Figure 5D, we showed that when external Na⁺ was 0.3 mM, increasing external K⁺ concentration to the millimolar range strongly decreased both inward and outward OsHKT1 macroscopic conductances. In these conditions, the increases in external K⁺ concentration also resulted in positive shifts of OsHKT1 reversal potential, indicative of K⁺ permeability.

Sensitivity to external K⁺ in OsHKT1 was further examined by using a ten times higher Na⁺ basis than in Figure 5D, 30 mM (Figure 7A). External K⁺ was varied in the range ~10 µM ("0" K⁺) to 70 mM, the ionic strength of the solutions being kept constant by addition of the non permeant large organic cation N-methyl-D-glucamine (NMDG) to which OsHKT1 was insensitive (not shown). With 30 mM Na⁺ basis, like with 0.3 mM Na⁺, external K⁺ at concentration of a few millimolar efficiently inhibited both the inward and the outward OsHKT1 macroscopic conductances (Figure 7A). Half inhibition concentration, derived from mass action law fit, was about the same for the inward and the outward conductances, close to 1 mM (Figures 7E and 7F). Contrary to what was observed in 0.3 mM Na⁺, however, additions of K⁺ to the 30 mM Na⁺ external solution did not induce positive shifts of OsHKT1 reversal potential (Figure 7A), indicating that in presence of high external Na⁺ concentration,

OsHKT1 is not significantly permeable to K^+ . Thus, in these conditions, external K^+ inhibits OsHKT1 without being transported.

OsHKT1 sensitivity to external Cs^+ , Rb^+ and Li^+ was similarly examined, in presence of the same 30 mM Na^+ background (Figures 7B to 7D). Cs^+ (Figure 7B) and Rb^+ (Figure 7C), like K^+ , inhibited OsHKT1 inward and outward conductances, with about the same efficiency in the inward and outward directions, without modifying the current reversal potential, suggesting a mechanism of inhibition similar to that occurring with external K^+ . Among these three inhibitors, the most efficient was K^+ ($K_i \sim 1$ mM in presence of 30 mM Na^+), then Cs^+ ($K_i \sim 2$ mM) and Rb^+ ($K_i \sim 3.5$ mM) (Figures 7E and 7F). In contrast to K^+ , Cs^+ and Rb^+ , Li^+ brought at a concentration up to 70 mM in the 30 mM Na^+ medium did not have any effect on OsHKT1 inward and outward conductances (Figure 7D). Li^+ did not show any sign of permeation through OsHKT1 either. Interestingly, these results are reminiscent of those obtained with K^+ , Cs^+ , Rb^+ or Li^+ "alone" (with only traces of Na^+ , Figures 5A and 5B), where Li^+ was already noticed to behave differently from K^+ , Cs^+ and Rb^+ for permeation in OsHKT1. Thus, both blockage and permeation experiments suggest the presence of binding site(s) with higher affinity for K^+ , Cs^+ and Rb^+ than for Li^+ in OsHKT1 translocation pathway.

Sensitivity to external K^+ , Cs^+ , Rb^+ and Li^+ in presence of 30 mM Na^+ was also analysed in OsHKT4 (Figures 7G to 7I) and OsHKT6 (Figure 7J). OsHKT4 currents were inhibited by K^+ (Figure 7G) and Cs^+ (Figure 7H), however with a strongly lower sensitivity ($K_i \sim 85$ mM) (Figure 7I) than that observed in OsHKT1 currents. OsHKT6 currents were not sensitive to any of the four alkali cations (Figure 7J).

Interactions between Na^+ and K^+ in OsHKT1 at micromolar and millimolar external concentrations

Figures 6 and 7 showed that permeation properties in OsHKT1 were highly dependent on external concentrations of Na^+ and K^+ . OsHKT1 was permeable to both Na^+ and K^+ in the presence of 0.3 mM Na^+ and a few millimolar external K^+ (Figure 5D). It was permeable to Na^+ only when external Na^+ concentration was 30 mM (Figure 7D), and displayed a very weak macroscopic conductance when external K^+ concentration was > 10 mM (Figures. 5A, 5D, 7A).

OsHKT1 permeation properties were further analysed in the presence of low external Na^+ concentrations, 4 μ M (Figures 8A and 8B), external K^+ being varied from the micromolar to the millimolar range. Increasing K^+ concentration induced positive shifts of OsHKT1 zero current potential. The magnitude of the shift was about 52 mV upon a 100 fold increase in K^+ concentration from 10 μ M to 1 mM (Figure 8A). These results indicated that in presence of low external Na^+ concentrations, even as low as a few micromolar, OsHKT1 is permeable to K^+ within a K^+ concentration range from at least a few micromolar to a few millimolar. An inhibitory effect of external K^+ on OsHKT1 macroscopic conductance was also apparent (Figures 8A and 8B), as already mentioned with 0.3 mM external Na^+ background (Figure 5D). However, a detailed investigation of the effect of varying K^+ concentration in the 4 μ M Na^+ background revealed that addition of K^+ first increased OsHKT1 conductance before having an inhibitory effect, the maximal conductance being observed at ~ 10 μ M external K^+ (Figure 8B). It is worth noting that the initial increase in conductance while increasing external K^+ (up to 10 μ M) provides further support to the conclusion drawn from reversal potential analysis that OsHKT1 at low external Na^+ is permeable to K^+ . It is also worth noting

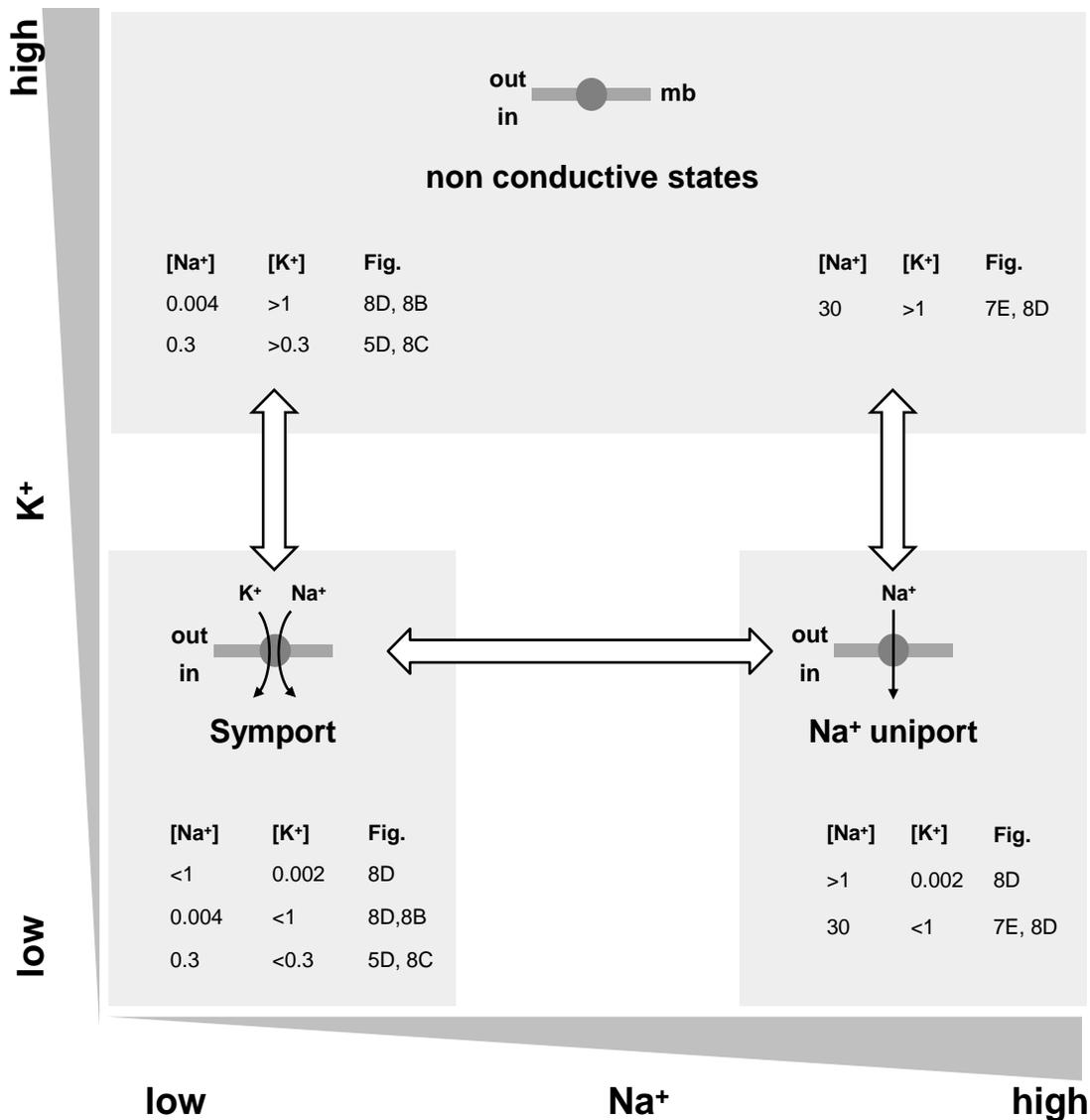


Figure 9. Scheme of OsHKT1 conduction states in *Xenopus* oocytes depending on external K⁺ and Na⁺ concentrations.

Three types of conduction states proposed to be encountered by OsHKT1, Na⁺-K⁺ symport, Na⁺ uniport and non conductive states, are positioned in the scheme according to external K⁺ and Na⁺ concentrations. Sets of external [Na⁺] and [K⁺] (in millimolar) for which each state is expected to be preponderant is indicated with reference to supporting figures below each state. Note that the two illustrated ion transport pathways in the symport state do not mean that Na⁺ and K⁺ could not use a single pore.

that the modulation (stimulation and inhibition) of OsHKT1 macroscopic conductance by external K^+ concerned both the inward and the outward directions.

Compiling experiments highlights also complex non-univocal relationships between OsHKT1 conductance and external K^+ or Na^+ concentrations (Figures 8B and 8C). Inhibition of OsHKT1 conductance by external K^+ was neither determined by the sole external K^+ concentration nor by the Na^+/K^+ concentration ratio (Figure 8C).

Diverse conduction modes in OsHKT1

Putative coupling between Na^+ and K^+ transport in OsHKT1 was examined by analysing more precisely evolution with external K^+ and Na^+ activities of OsHKT1 zero current potential (Figure 8D). In the presence of 4 μM external Na^+ and K^+ in the range 2 μM to 900 μM , variation of OsHKT1 zero current potential was linear in logarithmic scale with a slope of 26 mV per decade of K^+ activity (Figure 8D, filled diamonds). Linear variations of OsHKT1 zero current potential, with similar slope values, were also observed in the symmetrical experiments, when the external concentration of K^+ was kept constant in the submillimolar range and that of Na^+ was varied in the submillimolar range (Figure 8D, filled triangles) : slope of 22 mV per decade of Na^+ activity in presence of 2 μM K^+ and external Na^+ varying from 4 to 900 μM . In summary, variations with external K^+ or external Na^+ of OsHKT1 zero current potential at submillimolar K^+ and Na^+ concentrations were very similar, linear in logarithmic scale with a slope close to what is expected for a Na^+-K^+ symport with a stoichiometry of 1:1 (slope of 29 mV per decade of Na^+ or K^+ activity). Hence, these results strongly suggest that the transport of Na^+ and K^+ in OsHKT1 at submillimolar K^+ and Na^+ concentrations is coupled. The fact that the coupled transport behaviour is still observed with $[Na^+]/[K^+]$ or $[K^+]/[Na^+]$ ratios of about 500 (Figure 8D) suggests the presence of high affinity and selective binding sites for Na^+ and K^+ , able to efficiently discriminate one ion against the other one in OsHKT1 ion translocation pathway.

At external Na^+ in the millimolar range (Na^+ activity from 1 to 25 mM, K^+ kept constant at 2 μM , the slope of OsHKT1 zero current potential variation changed to ~ 50 mV per decade of Na^+ activity (Figure 8D, filled triangles, dotted line), suggesting that OsHKT1 behaves like a Na^+ uniport in the latter external Na^+ and K^+ conditions (slope expected for a selective uniport: 58 mV / decade). This is in agreement with the conclusion previously drawn from Figure 7A that at 30 mM external Na^+ , OsHKT1 is not permeable to K^+ . It is worth noting that, in contrast to OsHKT1, OsHKT6 for which no permeability to K^+ was detected (Figures 5G and 5H) displayed zero current potential variations with a single slope from the submillimolar to the millimolar Na^+ concentration range, close to 50 mV per decade of Na^+ activity (Figure 8D, open circles and triangles).

External K^+ in OsHKT1 symport or uniport modes inhibits the macroscopic conductance. We propose that this inhibition, which concerns both the inward and outward directions (Figures 5D, 7A and 8A), is due to the presence in OsHKT1 population of transporters in non conductive (or very weakly conductive) state(s). Since external K^+ has almost the same effect on inward and outward currents, K^+ binding leading to non conductive state(s) may involve relatively external binding site(s). Similarly, the presence of (an) external binding site(s) is expected to explain Na^+ control of OsHKT1 conduction mode (symport or uniport) from the external side.

Figure 9 summarises the different conduction modes proposed to be encountered by OsHKT1 with examples of external concentrations of K^+ and Na^+ at which each mode is preponderant. Schematically, the symport state is expected to operate mainly at submillimolar

external Na^+ with external K^+ up to a few 100 μM to a few millimolar, the Na^+ uniport state at external Na^+ in the millimolar range and external K^+ in the submillimolar range, and non conductive states at external K^+ in the millimolar to 10 mM range. Thus, the different conduction modes encountered by OsHKT1 while expressed in *Xenopus* oocytes do all operate at physiological concentrations of Na^+ and K^+ . Operation of these different conduction modes in planta is therefore likely.

DISCUSSION

OsHKT1 permeability to monovalent cations

The question whether OsHKT1 is permeant to Na^+ only or to both Na^+ and K^+ was debated. OsHKT1 was reported to work in heterologous systems either as a Na^+ -selective transporter (Horie et al., 2001; Garcíadeblás et al., 2003) or as a poorly selective transporter permeable to both Na^+ and K^+ and to other alkali cation, Li^+ , Rb^+ and Cs^+ , with almost the same permeability to every cation (Golldack et al., 2002). In the later report, the data supporting a permeability to K^+ was obtained at submillimolar external K^+ and Na^+ concentrations in oocytes displaying large OsHKT1 currents. On the other hand, data supporting the poor selectivity were obtained in oocytes displaying low current levels, thus in conditions where extraction of OsHKT1 currents from endogenous conductances was likely to be more difficult. Also, they were obtained in bath solutions containing high (100 mM) monovalent cation concentrations, and it is worth noting that our data (obtained in oocytes displaying high expression levels) indicate that the transporter is very weakly conductive in the presence of 100 millimole. L^{-1} of K^+ , Rb^+ or Cs^+ . Finally, possible interactions between permeating cations were not yet investigated.

Our data show that OsHKT1 behaves at external alkali cation concentrations lower than 1 mM as a cation transporter permeable to Na^+ , K^+ , Cs^+ , Rb^+ , but not Li^+ (Fig. 5B), and at higher concentrations as a Na^+ -selective transporter (Figure 5A, Figures 7A to 7D, Figure 8D). At submillimolar external Na^+ concentrations, we show that the transporter can behave as a symporter with a Na^+ - K^+ stoichiometry close to 1:1 (Figure 8D). Since very similar conductances and current reversal potentials are observed when external K^+ is replaced by Cs^+ or Rb^+ in the presence of a fixed concentration of external Na^+ (Figure 5B), we propose that the transport of Cs^+ and Rb^+ in OsHKT1 is like that of K^+ , coupled to the transport of Na^+ .

Thus, OsHKT1 displays complex permeation properties and ionic selectivity, deeply differing when the external concentrations of cations (Na^+ , K^+ , Rb^+ and Cs^+) are varied from the μM to the 10 to 100 mM range. Initial and apparently contradictory analyses of its ionic selectivity (at least for what concerned Na^+ and K^+ in *Xenopus* oocytes) are thus likely to describe distinct transport behaviours restricted to partial concentration ranges.

Na^+ - K^+ interactions and transport mechanism in OsHKT1

As outlined in Figure 9 and further discussed below, our electrophysiological analyses in *Xenopus* oocytes indicate (see last paragraph of the Result section) that OsHKT1 displays 3 conductive modes depending on external K^+ and/or Na^+ , a Na^+ - K^+ symport, which is the dominating state at submillimolar external Na^+ with external K^+ up to a few 100 μM to a few millimolar, a Na^+ uniport, preponderant when the external concentration of Na^+ is within or above the millimolar range and external K^+ in the submillimolar range, and non conductive states at external K^+ in the millimolar to 10 mM range. This behaviour is reminiscent of, but apparently more complex (see paragraphs below) than that of the wheat TaHKT1 transporter. The later system has been shown to work as a Na^+ - K^+ symport when external Na^+ and K^+

concentrations are balanced, and as Na⁺-selective uniport when external Na⁺ is in excess (Rubio et al., 1995; Gassmann et al., 1996). Thus, it behaves as a symporter in a more restricted range of Na⁺ to K⁺ concentration ratio in the external solution. Furthermore, it displays less sensitivity (blockage) to K⁺ (Rubio et al., 1995; Gassmann et al., 1996).

Kinetic models have been extensively developed in the eighties to account for transport properties in various ion transport systems among which symporters (Hansen et al., 1981; Sanders et al., 1984; Blatt et al., 1987). In these models, symporter behaviour is classically described by 6-state schemes (when stoichiometry is 1:1) comprising steps of successive binding of the two transported ions, voltage-dependent ion translocation across the membrane, release of the transported ions and voltage-independent recycling in the membrane. The attractiveness of these models relies on their simplicity (the 6-state model can be operationally reduced to a 2 to 4-state one when the concentration of only one transported ion is varied at one side of the membrane) and the absence of presupposition concerning the rate limiting steps (McCulloch et al., 1990; Meharg and Blatt, 1995; Maathuis et al., 1997; Haro and Rodríguez-Navarro, 2002). I/V data presented in Figure 4A for external Na⁺ concentrations from 4 to 300 μM (fixed low external [K⁺], OsHKT1 in symport mode; Figure 8D) could satisfyingly be described (not shown) by a 2-state model (voltage-independent steps lumped together, reaction rates kept constant while external Na⁺ concentration varies except the one depending on external Na⁺ binding). However, using such models which do not include the eventuality of competitive binding by the co-transported ion at one or each of the two binding sites, it was not possible (not shown) to fit OsHKT1 I/V relationship evolution in a wider range of Na⁺ concentration (up to 30 mM, Figure 4A) with the switch from the symport to the uniport mode. Likewise, such models could not describe the full set of OsHKT1 I/V data at low fixed external Na⁺ concentration and varying external K⁺ concentration (Figure 8A). Indeed, using similar assumptions (only the reaction rate including K⁺ binding allowed to vary), the first increase in conductance when external K⁺ was increased up to 10 μM could be accounted for, but not the subsequent decrease in conductance when the external concentration of K⁺ was further increased (not shown). It should be noted in particular that these models cannot account for the reduction in current that can be observed in Figure 8A at fixed membrane potential upon increase in external concentration of the permeant cation K⁺ (e.g., at -145 or -160 mV, K⁺ concentration being increased from 0.3 to 1 mM), since they predict (sign of the derivative) (Hansen et al., 1981; Maathuis et al., 1997) that the current should monotonically increase when the concentration of the transported species is increased. Thus, the observed decrease in current intensity with external K⁺ suggests that another state than the Na⁺-K⁺ symport appears in OsHKT1 when external K⁺ increases. Besides this other state, the Na⁺-K⁺ symport mode also is at work, and constitutes the sole conducting system at work in these conditions (low external Na⁺ concentrations) based on reversal potential analyses in the full range of K⁺ concentrations, from 2 μM to 1 mM (Figure 8D). Moreover, since both inward and outward conductances decrease when the external concentration of K⁺ is increased above 10 μM, the other state co-existing with the Na⁺-K⁺ symport mode is certainly a non (or weakly) conductive mode, as already proposed in the result section (Figure 9).

To account for the dual mode of transport (Na⁺-K⁺ symport or Na⁺ uniport) in TaHKT1, Rubio et al. (Rubio et al., 1995) and (Gassmann et al., 1996) have taken into account the eventuality of competitive binding by the co-transported ion at the binding sites. They proposed that two high affinity binding sites, one for K⁺ and the other for Na⁺, named K⁺ and Na⁺ coupling sites, respectively, are present in the transporter and need to be occupied for

uptake to occur. Competitive binding of K^+ and Na^+ at the K^+ "coupling" site results in symport or Na^+ uniport behaviour of the transporter. Our data while varying external Na^+ (Figure 8D) are compatible with this model. Staying in the framework of this "coupling" site model, since the symport behaviour could be observed in presence of only a few micromolar K^+ and concentrations of Na^+ up to 500 times higher (e.g., 2 μM K^+ and 1 mM Na^+ ; Figure 8D), the K^+ "coupling" site in OsHKT1 must display very high affinity and selectivity for K^+ against Na^+ (higher than in TaHKT1 where symport behaviour was only observed in quite balanced Na^+ and K^+ concentrations). Furthermore, experiments with other alkali cations suggest that the K^+ "coupling" site in OsHKT1 would poorly discriminate between K^+ , Cs^+ and Rb^+ but would be selective against Li^+ (Figure 5B). Inhibition of symport activity by "high" external K^+ (Figures 5D and 8A) could also fit the "coupling" site model, assuming that the binding of K^+ at the Na^+ "coupling" site results in non (or weakly) conductive state in OsHKT1. Similarly, concerning the Na^+ "coupling" site, the fact that symport activity was still observed in presence of a few micromolar Na^+ and concentrations of K^+ up to 200 times higher (e.g., 4 μM Na^+ and 1 mM K^+ ; Figure 8D) indicates that the Na^+ "coupling" site must display high affinity and selectivity for Na^+ against K^+ .

The assumption of only two (Na^+ and K^+) highly selective "coupling" sites controlling the transporter mode, however, does not allow to explain the inhibition by external K^+ of OsHKT1 in the Na^+ uniport mode (Figure 7A). Indeed, addition of K^+ in the millimolar range in presence of 30 mM Na^+ , assuming the presence of a highly selective K^+ "coupling" site, should restore symport activity, a phenomenon that can be discarded owing to the absence of shift of OsHKT1 reversal potential upon addition of K^+ in these conditions. The presence of a third binding site would then be necessary to explain these data. Binding of K^+ to this regulation site, which can be proposed to display mild affinity to K^+ and lower affinity to Na^+ , would prevent conduction. Thus, our proposed model to explain the different modes of transport in OsHKT1 would finally be summarised as follows. At low external K^+ , the regulation site is free or occupied by Na^+ (at high external Na^+), OsHKT1 is conductive, in symport or Na^+ uniport modes depending on the occupancy of the two "coupling" sites. At high external K^+ , the regulation site is occupied by K^+ , OsHKT1 is not conductive, whatever the occupancy of the two "coupling" sites. It should be noted that experiments of Na^+ transport inhibition by different alkali cations in the Na^+ uniport mode would indicate a weak discrimination between K^+ , Cs^+ and Rb^+ but discrimination against Li^+ at the proposed regulation site (Figures 7A to 7F). Although this "coupling" and regulation site model remains speculative, interestingly, it seems at least clear from our data that OsHKT1 conduction mode is controlled from the external side of the transporter (at a location non accessible from the internal side), since the three conduction modes (symport, uniport and non conductive states) are determined by the external concentrations of K^+ and Na^+ , even when polarisation conditions result in net effluxes through OsHKT1 (Figures 7A, 8A and 8D).

Functional diversity in the HKT family

The HKT family was described as comprising two major types of transporters when expressed in yeast or *Xenopus* oocytes (Rodríguez-Navarro and Rubio., 2006), those permeable to Na^+ only like AtHKT1, the sole member of this family present in Arabidopsis, or those permeable to both Na^+ and K^+ and eventually endowed with Na^+ - K^+ symport activity as evidenced for two of them, TaHKT1 (Rubio et al., 1995; Gassmann et al., 1996) and HvHKT1 (Haro et al. 2005). The presence in rice of 9 HKT genes (Garcia-deblás et al., 2003) raised the question of the functional diversity within this transporter family. Four rice members were already partly characterised, OsHKT4 and OsHKT8, reported to be permeable to Na^+ only, OsHKT1, the

permeability of which was debated (see above), and OsHKT2, described as permeable to both K^+ and Na^+ . The present report provides detailed electrophysiological analyses for 2 of these members, OsHKT1 and OsHKT4, and for a new member, OsHKT6, that was not previously characterised. OsHKT1 is shown to be permeable to both Na^+ and K^+ and to be able to mediate symport activity in some conditions (Figures 5A to 5D, 8D, 9; see above). OsHKT4 and OsHKT6 are shown to be permeable to Na^+ only (Figures 5E to 5H). Thus the new data are consistent with the view that HKT transporters can be sorted into 2 types when their ionic permeability to Na^+ and K^+ is considered, all transporters being permeable to Na^+ and some also to K^+ . In HKT transporters of the later type, the question of interactions between the two transported species has not been systematically addressed but, when such analyses have been carried out (i.e., for TaHKT1, HvHKT1 and OsHKT1), they have always led to the conclusion that the transporters were able to behave as Na^+ - K^+ symporters at least in some environmental conditions (Rodríguez-Navarro and Rubio, (2006); Figure 8D). This may indicate that every HKT transporter permeable to K^+ is endowed with the capacity to function as Na^+ - K^+ symport.

The rice K^+ -permeable OsHKT2 transporter has not been characterised in detail but the available information suggests that its apparent affinity for Na^+ is lower than that of OsHKT1 and its sensitivity (blockage) to external K^+ weaker (Horie et al., 2001); Figures 4A, 4B, 5D and 7A). Similarly, as discussed above, OsHKT1 displays a higher affinity for Na^+ and a stronger sensitivity to K^+ than the wheat TaHKT1. The present data on OsHKT4 and OsHKT6 also indicate that rice HKT transporters permeable to Na^+ only can strongly differ in terms of affinity for Na^+ , rectification and sensitivity to external K^+ (Ren et al. 2005); Figures 3C, 3D, 4C to 4F, 7G to 7I).

Phylogenetic relationships and functional properties in HKT transporters

Phylogenetic analyses of publicly available HKT sequences revealed, two years ago, that the family splits into two major branches, that were named subfamily 1 and 2 (Platten et al., 2006). This led to the proposal of a new nomenclature to sort out members according to their subfamily membership, the names HKT1;x or HKT2;y referring to transporters belonging to sub-family 1 or 2, respectively, the second number x or y allowing to differentiate genes within a given species, without aiming at reflecting relationships within this species or between species (Platten et al., 2006). Based on these phylogenetic analyses and taking stock of the information that was then available at the functional level, it was proposed that subfamily 1 was likely to correspond to HKT transporters permeable to Na^+ only and sub-family 2 to transporters permeable to both Na^+ and K^+ . The analysis also suggested differences between dicots and monocots concerning the number and functional properties of HKT transporters. Dicotyledonous species appeared to comprise a low number of HKT genes, 1 (like in *Arabidopsis* or *Populus trichocarpa*) or 2 (like in *Eucalyptus camaldulensis*). Furthermore, HKT transporters permeable to both Na^+ and K^+ (sub-family 2) were present only in monocotyledonous species. A much larger number of HKT sequences are available now and a new phylogenetic tree is shown in Figure 10. The data indicate that dicotyledonous species can display a large number of HKT members, for example at least 6 in *Vitis vinifera*. However, all HKT transporters from dicotyledonous species, including the 6 identified *V. vinifera*, belong to sub-family 1, based on sequence analysis, suggesting that the HKT sub-family 2 evolved after the monocot/dicot separation. Taken together, the phylogenetic tree shown in Figure 10 and our electrophysiological analyses also suggest that evolutionarily and functionally distinct sub-groups might exist in monocot sub-family 1: Indeed, in the phylogenetic tree, OsHKT4 and OsHKT6, which are low affinity slightly or strongly

rectifying transporters, appears to belong to the same sub-branch, distinct from that of OsHKT8 which seems a high affinity not rectifying transporter (Ren et al., 2005).

A glycine residue, present in the first pore loop of almost all HKT transporters from subfamily 2 and absent at the same position (replaced by a serine) in HKT transporters from subfamily 1 has been proposed to be an important determinant of HKT transporter K^+ permeability (Mäser et al., 2002). Interestingly, OsHKT1, which on its full sequence basis belongs to HKT subfamily 2 and is clearly demonstrated in the present study to be K^+ -permeable, does not possess a glycine but a serine at the pointed position. This suggests that other determinants than the sole presence of the identified glycine control K^+ permeability in HKT transporters.

Expression patterns and roles in the plant

Information on tissular localisation was available for 3 members of each HKT subfamily so far: AtHKT1 from Arabidopsis (Berthomieu et al., 2003; Sunarpi et al., 2005), OsHKT8 from rice (Ren et al., 2005) and McHKT1 from *Mesembryanthemum crystallinum* (Su et al., 2003) for sub-family 1, and TaHKT1 from wheat (Schachtman and Schroeder, 1994), and OsHKT1 (Gollmack et al., 2002; Kader et al., 2006, Horie et al. 2007) and OsHKT2 (Kader et al., 2006) from rice. The whole set of data emphasised that HKT transporters are strongly expressed in tissues (root epidermis and cortex, xylem and phloem, vascular bundle regions) playing crucial role in ion uptake, long distance transport and redistribution in the plant. The subfamily 1 transporters have been constantly reported to be expressed in the plant vasculature, and rarely in other tissues. The expression patterns of the subfamily 2 transporters have always been found to include root periphery cells, and often tissues in or close to the plant vasculature.

The tissue specificity of OsHKT1 expression presented in this study on the japonica rice cultivar Nipponbare is consistent with the pattern previously reported in the same cultivar by Horie et al. (2007) and overlaps with, but also slightly differs from the expression patterns reported in indica rice varieties (Gollmack et al., 2002; Kader et al., 2006). This discrepancy may at least in part originate from differences in experimental conditions. Our study also provides first information on two other HKT transporters, OsHKT4 and 6. Taken as a whole, the new data reveal broad expression patterns, not restricted to root periphery cells and vascular regions. For example, hybridisation pictures shown in Figure 2 indicate that the 3 HKT under investigation are all expressed in bulliform cells, which are large osmo-contractile cells involved in leaf folding in rice. It is tempting to speculate that these transporters are involved in ion fluxes triggering the changes in turgor that allow these cells to control leaf folding in response to environmental conditions. Thus, the roles of HKT transporters would not be restricted to ion uptake from the soil solution and long distance transport and redistribution in the plant. The present data also indicate that root periphery cells can express HKT transporters from both subfamily 1 and 2. For example, data shown in Figure 1 indicate that root cortical cells express HKT4 and slightly HKT6 along with HKT1. Also, the three HKT are expressed in root phloem. In other words, the present information available in monocots, where the two subfamilies of HKT transporters co-exist, points out complex expression patterns, resulting in intriguing overlaps of transporters endowed with clearly distinctive functional properties in terms of permeation and selectivity (uniport and/or symport activity) and affinity. It is tempting to speculate that this complexity and diversity allow HKT transporters to fulfill highly integrated roles at the whole plant level.

Reverse genetics approaches in Arabidopsis and analysis of quantitative trait loci for salt tolerance in rice have highlighted the roles in planta of two HKT transporters from subfamily 1, AtHKT1 and OsHKT8. In Arabidopsis, AtHKT1 is expressed in stelar tissues of both roots and shoots and plays a role in preventing Na⁺ overaccumulation in shoots by unloading Na⁺ from the ascending sap and loading it into the descending one (Berthomieu et al., 2003; Sunarpi et al., 2005; Davenport et al., 2007). Similarly, in rice, OsHKT8 expression was detected mainly in shoot and root vascular tissues, and shown to play a role in Na⁺ transport by the xylem vasculature and to control Na⁺ accumulation in leaves (Ren et al., 2005). At the whole plant level, each of these two systems contributes to adaptation to salt stress.

The roles of HKT transporters from subfamily 2 remain more mysterious. A role for OsHKT1 in high affinity Na⁺ uptake by rice roots has recently been evidenced using a reverse genetic approach (Horie et al. 2007). When grown under low Na⁺ and K⁺-“free” conditions, knock-out mutant rice lines disrupted in *OsHKT1* displayed strongly reduced high affinity Na⁺ uptake by roots compared to wild type plants. They also displayed reduced size and biomass, suggesting a beneficial role of Na⁺ nutrition on rice growth at low Na⁺ concentration in conditions of severe K⁺ starvation. In wheat, a role for TaHKT1 in root Na⁺ uptake from external solutions containing high Na⁺ concentrations (100-200 mM) was deduced from comparative analyses of wild type and antisense wheat lines (Laurie et al., 2002). Thus, depending on their affinity for this cation, HKT transporters can contribute to Na⁺ uptake in a large concentration range. On the other hand, no evidence is available that these systems contribute to K⁺ transport in the plant. Furthermore, no indication of Na⁺-K⁺ symport activity has yet been obtained in higher plant tissues (Maathuis et al., 1996; Walker et al., 1996b; Haro et al., 2005). The absence of evidence that subfamily 2 HKT transporters contribute to K⁺ fluxes, while these systems which are clearly permeable to K⁺ are highly expressed in plant cells and functional on the cell membrane, as evidenced by their strong contribution to Na⁺ transport, might be due to redundancy in K⁺ transport systems from different families. For instance, in root periphery tissues, when plants are grown in classical environmental conditions and/or when experiments are performed in classical bath solutions, K⁺ transport activity of HKT transporters might be masked by that of K⁺ channels from the Shaker family (Sentenac et al. 1992; Hirsch et al., 1998; Santa-María et al., 2000; Pilot et al., 2003; Véry and Sentenac, 2003) and/or H⁺-K⁺ symporters from the KUP/HAK family (Santa-María et al., 2000; Bãnuelos et al., 2003, Gierth and Mäser, 2007). However, owing to its importance, the question of the existence of Na⁺-K⁺ symport activity in plants would deserve to be re-addressed.

Two HKT transporters, OsHKT1 and TaHKT1, are now clearly demonstrated to be able to mediate Na⁺-K⁺ symport activity. Furthermore, they are both induced upon K⁺ starvation and can complement yeast mutants defective in K⁺ uptake (Schachtman and Schroeder, 1994; Wang et al., 1998; Horie et al., 2001; Gollmack et al., 2002). The eventuality that HKT transporters can actually function as Na⁺-K⁺ uptake systems *in planta* is thus certainly worth being further examined, taking advantage of the important progress that have been made recently in molecular identification of K⁺ transport systems and using rice as a model plant.

METHODS

Plant material

Seeds of *Oryza sativa* L. japonica cv. Nipponbare were provided by the French Agricultural Research Centre for International Development (CIRAD, Montpellier, France). They were

treated with 70% ethanol for 1 min, rinsed with sterile distilled water, treated with 15% potassium hypochlorite solution for 20 min and rinsed 3 times again with sterile distilled water. They were then dipped in water for 12 h. For germination, 5 seeds were placed on one layer of Whatman germination paper (Whatman, Springfield Mill, Kent, UK) in a plastic Petri dish to which 10 ml sterile distilled water had been added. The dishes were then stored in a growth chamber maintained at day/night temperature of 28/25°C in constant light from white fluorescent lamps (500 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) under a 14/10h photoperiod. Seedlings were transferred to aerated hydroponic tanks 12 days after germination. The culture solutions used were based on that described by Yoshida et al. (1976). For control treatment, the Yoshida medium was used. In experiments with reduced K^+ ("K⁺"), NaH_2PO_4 was substituted to KH_2PO_4 and 0.35 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ replaced 0.7 mM KNO_3 . For salt stress treatment, 50 mM NaCl was added to Yoshida or "K⁺" media. The pH of the growth solutions was adjusted between 5,3 and 5,5 every 2 days. K^+ and Na^+ contaminant concentrations were about 100 μM . Plants were grown in a phytotron with a photoperiod of 12 h light at 28 °C/12 h dark at 24 °C under 65% hygrometry. Experiments were performed with 1 month-old plants.

In situ hybridisation

RNA probe synthesis

Primers were designed for PCR amplification of specific regions of *OsHKT1*, *OsHKT4* and *OsHKT6* cDNAs: respectively, *OsHKT1*-Up and *OsHKT1*-Down : 5'-CATACTCGTTGGCTCGTTGC-3' and 5'-GGTTGCTTGGCTTCAGGAAC-3'; *OsHKT4*-Up and *OsHKT4*-Down: 5'-GGAAGTCAATTTCTTCTGATCCA-3' and 5'-TCATTTCAAGGATGAACTCCTTG-3'; and *OsHKT6*-Up and *OsHKT6*-Down: 5'-CTCCAAACTTTCCGCACATT-3' and 5'-TTGACTTGCTCGTGGCTTG-3'. Primers were also designed for PCR amplification of a *18S* ribosome cDNA region (*18S* ribosome probe used as positive control): Rib-Up: 5'-CCGACCCTGATCTTCTGTGAAGGG-3', Rib-Down: 5'-CCAAGTCAGACGAACGATTTGCACG-3'. Primers containing the above sequences but extended at their 5' end with the T7 RNA polymerase promoter sequence (5'-GCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGA-3') were also designed and were named *OsHKT1*-T7-Up and *OsHKT1*-T7-Down, *OsHKT4*-T7-Up and *OsHKT4*-T7-Down, *OsHKT6*-T7-Up and *OsHKT6*-T7-Down, and RibT7-Up and RibT7-Down. Finally, one primer corresponding to T7 end was also designed: E-T7: 5'-GCGAAATTAATACGACTCAC-3'. Sense and antisense probes were synthesised in two steps: a first PCR was performed with one primer Up and one primer T7-Down, or one primer Down and one primer T7-Up. The PCR reaction was carried out with 2 ng of DNA, 1X Taq polymerase reaction buffer, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM dATP, dCTP, dGTP and dTTP, 0.4 μM of forward and reverse oligonucleotide primers and 5 U of Taq polymerase, in a final volume of 50 μl . Samples were subjected to 1 cycle of 3 min at 95°C, 35 cycles (95°C, 30 sec; 55°C, 30 sec; 72°C, 1 min) and 1 cycle of 7 min at 72°C. A second PCR was performed using 200 times dilutions of the first PCR products, E-T7 primer and primer Up or Down, to obtain the DNA template for the desired probe, sense or antisense. The PCR reaction was carried out with 1 μl of DNA dilution and, like in the first PCR, 1X Taq polymerase reaction buffer, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM dATP, dCTP, dGTP and dTTP, 0.4 μM of forward and reverse primers and 5 U of Taq polymerase, in a final volume of 50 μl . Samples were subjected to 1 cycle of 3 min at 95°C, 35 cycles (95°C, 30 sec; 56°C, 30 sec; 72°C, 1 min) and 1 cycle of 7 min at 72°C. Amplification products were fractionated by 1% agarose gel electrophoresis. After purification in ethanol, the fragments were used to generate sense and reverse digoxigenin-

labelled transcripts by *in vitro* transcription (T7 MAXIScript Kit, Ambion Inc., Austin, TX). Final purification of the probes was done using ethanol precipitation. Probes were labelled using the dIG Oligonucleotide Tailing Kit (Roche, Switzerland).

Slide preparation

Root and leaf samples were fixed with 4 % paraformaldehyde in phosphate buffer (0.2 M, pH 7.5) for 16 h. They were washed in phosphate buffer containing 0.1 M glycine and then dehydrated through a series of incubations in ethanol-butanol solutions: ethanol 50 %, twice 7 min; ethanol 70 %, 30 min then 1 h; ethanol 95 %, twice 30 min; butanol 100 %, twice 1 h; butanol 100 %, three days. They were then progressively embedded in paraffin (ParaplastPlus[®], Structure Probes, West Chester, PA) through several bathes: butanol/safesolv (2/1), 1h; butanol/safesolv (1/2), 1h; safesolv/paraplast (1/1), 1h; paraplast, twice 1h then 48h. After inclusion, samples were cut into 8 μm sections and mounted on silanised slides (Dako, Carpinteria, CA). Sections were subjected to de-waxing with Safesolv (Labonord, Templemars, France) and dehydration through an ethanol series: ethanol 100 %, twice 10 min; ethanol 70 %, twice 1 min; ethanol 50 %, 2 min and two 2 min bathes into DEPC sterile water. Slides were then subjected to protein digestion with proteinase K (0.1 unit.mL⁻¹) 30 min at 37°C; the reaction was arrested with an arrest buffer brought twice 5 min at room temperature. Slides were subjected to washing with PBS plus 0.2 % glycine, 2 min and twice 2 min in PBS only, and rehydration through an ethanol series: ethanol 50 %, 1 min; ethanol 70 %, 1 min; ethanol 100 %, twice 1 min.

Hybridisation

Hybridisation was done overnight at 45°C in a humidity chamber, with a denatured (5 min at 65°C) hybridisation mixture: 50 % deionised formamide, 10 % 10x SSC, 10 % dextran sulfate, 2 % Denhardt reagent, 0.1 mg.mL⁻¹ tRNA, ~200 ng of the probe of interest, and DEPC water such that the final volume for 1 hybridisation is 100 μL . Slides were subjected to washing (2x SSC twice 5 min, 0.2x SSC twice 30 min at 50°C, 1x NTE 5 min at 37°C), Rnase treatment (NTE, A Rnase 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 30 min at 37°C), washing (1x NTE twice 5 min at 37°C, 0.2x SSC twice 30 min at 55°C), blocking (1x Blocking Reagent (Roche, Switzerland) 30 min at 37°C), incubation with anti-Dig antibody conjugated with alkaline phosphatase (1:500 dilution (Roche) 1 h at 37°C), washing (PBS three times 10 min at room temperature), and incubation in the colour development buffer (100 mM Tris-HCl pH 9.5, NaCl 100 mM,) 5mM, twice 10 min at room temperature. Hybridisation signals were detected with VectorBlue KIT III (Vector laboratories, Burlingame, CA) in colour development buffer in the dark at 37°C until signal appears. Colour development was stopped by incubation in water then sections were mounted in mowiol. Slides were observed with a DM6000 microscope (Leica, Germany) under white light. Pictures were taken with a Retiga2000R camera (QImaging Co.).

Expression in *Xenopus* oocytes

OsHKT cDNA were subcloned into the pGEMDG vector (D. Becker, Würzburg, Germany) downstream of the T7 promoter and between the 5' and 3' untranslated regions of the *Xenopus beta-globin* gene. Capped and polyadenylated cRNA were synthesized *in vitro* from linearised vector using the mMESAGE mMACHINE T7 kit (Ambion Inc., USA). Oocytes were isolated as previously described (Véry et al., 1995), injected with 50 ng of *OsHKT* cRNA in

50 nL of DEPC-treated water or with 50 nL of DEPC-treated water (for control oocytes), and then kept at 18°C in "ND96" solution (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 2.5 mM Na-pyruvate and 5 mM HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid]-NaOH (pH 7.4), supplemented with 0.5 mg.L⁻¹ gentamycin) until electrophysiological recordings.

Electrophysiology

Whole-oocyte currents were recorded using the two-electrode voltage-clamp technique, 1 to 3 days after cRNA injection. The voltage-clamp amplifier was an Axoclamp 2A (Axon Instruments, USA). Voltage-pulse protocols, data acquisition and data analyses were performed using pClamp9 (Axon Instruments) and Sigmaplot8 softwares (Jandel Scientific, Germany). Both membrane potential and current were recorded. Correction was made for voltage drop through the series resistance of the bath and the reference electrode by using a voltage-recording microelectrode in the bath close to the oocyte surface (potential difference between the local electrode and the reference subtracted from the potential of intracellular electrodes in the amplifier for real-time series resistance correction). All electrodes were filled with KCl 1 M. The oocyte was continuously perfused during the voltage-clamp experiment. All bath solutions contained a background of 6 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 10 mM Mes-BTP (1,3-bis[tris(hydroxymethyl)methylamino]propane), pH 5.5. Monovalent cations were added as glutamate or chloride salts (chloride concentration constant in each set of solutions). D-mannitol was added when necessary to adjust the osmolarity (same osmolarity in each set of solutions in the range 220 to 280 mOsM). In experiments where external pH was changed to 7.5, HEPES replaced Mes in the background solution. K⁺ and Na⁺ actual concentrations in solutions were systematically measured by flame photometry. K⁺ and Na⁺ brought as contaminants were in the range 2 to 25 µmol.L⁻¹ (see figure legends for detailed values). To extract OsHKT-mediated currents from total oocyte currents, mean currents recorded in water-injected oocytes ($n = 4$ to 7) from the same batch in the same ionic conditions were subtracted from those recorded in OsHKT-expressing oocytes. Unless otherwise stated, presented I-V relationships were drawn with OsHKT-extracted currents.

Acknowledgments

We are grateful to Alonso Rodríguez-Navarro (Madrid, Spain) for generously providing us with rice *HKT* cDNA, and to Mike Blatt (Glasgow, U.K) and Jean-Baptiste Thibaud (Montpellier, France) for helpful discussions. This work was supported in part by an AUF graduate fellowship and a national doctoral fellowship from the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Tunisia (to M.J.), by a ERA-NET Plant Genomics Programme (ERA-PG FP/06.018B) (to E.G. and H.S.) and by a BBSRC-INRA (2006) grant (to H.S.).

REFERENCES

- Bañuelos, M.A., Garcíadeblás, B., Cubero, B., and Rodríguez-Navarro, A.** (2002). Inventory and functional characterization of the HAK potassium transporters of rice. *Plant Physiol.* **130**, 784–795.
- Berthomieu, P., Conéjero, G., Nublat, A., Brackenbury, W.J., Lambert, C., Savio, C., Uozumi, N., Oiki, S., Yamada, K., Cellier, F., Gosti, F., Simonneau, T., Essah, P.A., Tester, M., Véry, A-A., Sentenac, H., and Casse, F.** (2003). Functional analysis of AtHKT1 in Arabidopsis shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance, *EMBO J.* **22**, 2004–2014.
- Bihler, H., Gaber, R.F., Slayman, C.L., and Bertl, A.** (1999). The presumed potassium carrier Trk2p in *Saccharomyces cerevisiae* determines an H⁺-dependent, K⁺-independent current. *FEBS Lett.* **447**, 115–120.
- Blatt, M.R., Rodríguez-Navarro, A., and Slayman, C.L.** (1987). Potassium-proton symport in *Neurospora*: kinetic control by pH and membrane potential, *J. Membr. Biol.* **98**, 169–189.
- Clarkson, D. T., and Hanson, J. B.** (1980). The mineral nutrition of higher plants. *Ann. Rev. of P. Physiol.*, **31**, 239–298.
- Davenport, R.J., Muñoz-Mayor, A., Jha, D., Essah, P.A., Rus, A., and Tester, M.** (2007). The Na⁺ transporter AtHKT1 controls xylem retrieval of Na⁺ in Arabidopsis. *Plant Cell. Environ.* **30**, 497–507.
- Fairbairn, D.J., Liu, W., Schachtman, D.P., Gomez-Gallego, S., Day, S.R., and Teasdale, R.D.** (2000). Characterisation of two distinct HKT1-like potassium transporters from *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Mol. Biol.* **43**, 515–525.
- Garcíadeblás, B., Senn, M.E., Bañuelos, M.A. and Rodríguez-Navarro, A.** (2003). Sodium transport and HKT transporters: the rice model. *Plant J.* **34**, 788–801.
- Gassmann W., Rubio F., and Schroeder J.L.**, Alkali cation selectivity of the wheat root high-affinity potassium transporter HKT1. (1996). *Plant J.* **10**, 852–869.
- Gierth M., and Mäser, P.** Potassium transporters in plants-involvement in K⁺ acquisition, redistribution and homeostasis. (2007). *FEBS Lett.* **581**, 2348–2356.
- Golldack D., Su, H., Quigley, F., Kamasani, U.R., Munoz-Garay, C., Balderas, E., Popova, O.V., Bennett, J., Bohnert, H.J., and Pantoja O.** (2002). Characterization of a HKT-type transporter in rice as a general alkali cation transporter, *Plant J.* **31**, 529–542.
- Hansen, U.P., Gradmann, D., Sanders, D., and Slayman, C.L.** (1981). Interpretation of current-voltage relationships for "active" ion transport systems: I. Steady-state reaction-kinetic analysis of Class-I mechanisms. *J. Membr. Biol.* **63**, 165–190.
- Haro R., Bañuelos, M.A., Senn, M.E., Barrero-Gil, J., and Rodríguez-Navarro, A.** (2005). HKT1 mediates sodium uniport in roots. Pitfalls in the expression of HKT1 in yeast. *Plant Physiol.* **139**, 1495–1506.
- Haro, R. and Rodríguez-Navarro, A.** (2002). Molecular analysis of the mechanism of potassium uptake through the TRK1 transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioch. Biophys. Acta.* **1564**, 114–122.
- Hirsch, R.E., Lewis, B.D., Spalding, E.P., and Sussman, M.R.** (1998). A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* **280**, 918–921.

- Horie, T., Costa, A., Kim, T.H., Han, M.J., and Horie, R.** (2007). Rice OsHKT1 transporter mediates large Na⁺ influx component into K⁺-starved roots for growth. *EMBO J.* **26**, 1–14.
- Horie, T., Yoshida, K., Nakayama, H., Yamada, K., Oiki S., and Shinmyo, A.** (2001). Two types of HKT transporters with different properties of Na⁺ and K⁺ transport in *Oryza sativa*. *Plant J.* **27**, 129–138.
- Kader, M.A., Seidel, T., Gollmack, D., and Lindberg, S.** (2006). Expressions of OsHKT1, OsHKT2, and OsHVA are differentially regulated under NaCl stress in salt-sensitive and salt-tolerant rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *J. Exp. Bot.* **57**, 4257–4268.
- Laurie, S., Feeney, K.A., Maathuis, F.J., Heard, P.J., Brown, S.J., and Leigh R.A.** (2002). A role for HKT1 in sodium uptake by wheat roots. *Plant J.* **32**, 139–149.
- Lichtenberg-Frate, H., Reid, J. D., Heyer, M., and Höfer, M.** (1996). TKHp in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Membr. Biol.* **152**, 169–181.
- Maathuis, F. J., Verlin, D., Smith, F.A., Sanders, D., Fernández, J.A., Walker, N.A.** (1996). The physiological relevance of Na⁺-coupled K⁺-transport. *Plant Physiol.* **112**, 1609–1616.
- Maathuis F.J., Sanders, D., and Gradmann, D.** (1997). Kinetics of high-affinity K⁺ uptake in plants, derived from K⁺-induced changes in current-voltage relationships. A modelling approach to the analysis of carrier-mediated transport. *Planta.* **203**, 229–236.
- Mäser, P., Hosoo, Y., Goshima, S., Horie, T., Eckelman, B., Yamada, K., Yoshida, K., Bakker, E.P., Shinmyo, A., Oiki, S., Schroeder, J.I., and Uozumi, N.** (2002). Glycine residues in potassium channel-like selectivity filters determine potassium selectivity in four-loop-per-subunit HKT transporters from plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 6428–6433.
- McCulloch, S.R., Beilby, M.J., Walker, N.A.** (1990). Transport of potassium in *Chara australis* II. Kinetics of a symport with sodium. *J. Membr. Biol.* **115**, 129–143.
- Meharg, A.A. and Blatt, M.R.** (1995). NO₃⁻ transport across the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* root hairs: kinetic control by pH and membrane voltage. *J. Membr. Biol.* **145**, 49–66.
- Pilot, G., Gaymard, F., Mouline, K., Chérel, I., and Sentenac, H.** (2003). Regulated expression of Arabidopsis Shaker K⁺ channel genes involved in K⁺ uptake and distribution in the plant. *Plant Mol. Biol.* **51**, 773–787.
- Platten, J.D., Cotsaftis, O., Berthomieu, P., Bohnert, H., Davenport, R.J., Fairbairn, D.J., Horie, T., Leigh, R.A., Lin, H-X., Luan, S., Mäser, P., Pantoja, O., Rodríguez-Navarro, A., Schachtman, D.P., Schroeder, J.I., Sentenac, H., Uozumi, N., Véry, A-A., Zhu, J-K., Dennis, E.S., and Tester, M.** (2006). Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends Plant. Sci.* **11**, 372–374.
- Ren, Z-H., Gao, J-P., Li, L-G., Cai, X-L., Huang, W., Chao, D-Y., Zhu, M-Z., Wang, Z-Y., Luan, S., Lin, H-X.** (2005). A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nat. Genet.* **37**, 1141–1146.
- Rodríguez-Navarro A.** (2000). Potassium transport in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta.* **1469**, 1–30.

- Rodríguez-Navarro, A., and Rubio, F.** (2006). High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *J. Exp. Bot.* **57**, 1149 – 1160.
- Rubio, F., Gassmann, W., Schroeder, J.I.** (1995). Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science* **270**, 1660–1663.
- Sanders, D., Hansen, U.P., Gradmann, D., and Slayman, C.L.** (1984). Generalized kinetic analysis of ion-driven cotransport systems: a unified interpretation of selective ionic effects on Michaelis parameters. *J Membr. Biol.* **77**, 123–152.
- Santa-María, G.E., Danna, C.H., and Czibener C.** (2000). High-affinity potassium transport in barley roots: ammonium-sensitive and -insensitive pathways. *Plant Physiol.* **123**, 297–306.
- Schachtman, D.P., and Schroeder, J.I.** (1994). Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature.* **370**, 655–658.
- Sentenac, H., Bonneaud, N., Minet, M., Lacroute, F., Salmon, J-M., Gaymard, F., and Grignon, C.** (1992). Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science.* **256**, 663-665
- Su, H., Balderas, E., Vera-Estrella, R., Golldack, D., Quigley, F., Zhao, C., Pantoja, O., Bohnert, H.J.** (2003). Expression of the cation transporter McHKT1 in a halophyte. *Plant Mol. Biol.* **52**, 967–980.
- Sunarpi, Horie, T., Motoda, J., Kubo, M., Yang, H., Yoda, K., Horie, R., Chan, W-Y., Leung, H-Y., Hattori, K., Konomi, M., Osumi, M., Yamagami, M., Schroeder, J.I., and Uozumi, N.** (2005). Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na⁺ unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Plant J.* **44**, 928–938.
- Uozumi, N., Kim, E.J., Rubio, F., Yamaguchi, T., Muto, S., Tsuboi, A., Bakker, E.P., Nakamura, T., and Schroeder, J.I.** (2000). The *Arabidopsis* HKT1 gene homolog mediates inward Na⁺ currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol.* **122**, 1249–1259.
- Véry, A-A. and Sentenac, H.** (2003). Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* **54**, 575–603.
- Walker, D.J., Leigh, R.A., and Miller, A.J.** (1996). Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 10510–10514.
- Wang, T-B., Gassmann, W., Rubio, F., Schroeder, J.I., and Glass, A.D.M.** (1998). Rapid up-regulation of HKT1, a high-affinity potassium transporter gene, in roots of barley and wheat following withdrawal of potassium. *Plant Physiology.* **118**, 651–659.
- Yoshida, S., Forno, D.A., Cock, J.H., and Gmez, K.A.** (1976). Laboratory manual for physiological studies of rice. Los Baños, Laguna, The Philippines: International Rice Research Institute 61–66.

CHAPITRE IV

Isolement et purification de mutants perte de fonction pour trois gènes HKT de riz

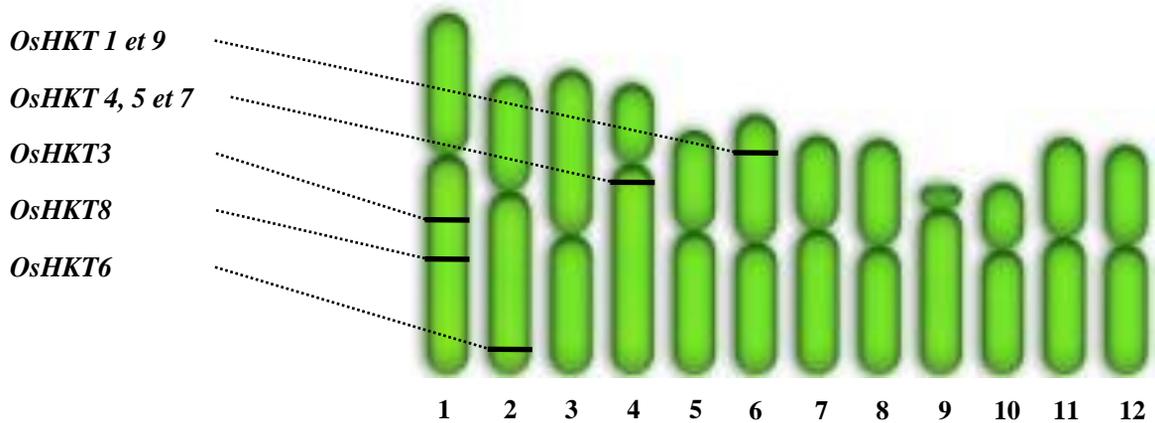


Figure IV.1. Position des huit gènes *HKT* dans le génome du riz, cultivar Nipponbare.

OsHKT1, chromosome (chr) 6: 29537942..29540221. *OsHKT3*, chr 1: 19568889..19570698. *OsHKT4*, chr 4: 30505381..30508003. *OsHKT5*, chr 4: 30511251..30520167. *OsHKT6*, chr 2: 4103330..4105654. *OsHKT7*, chr4: 30515100..30520251. *OsHKT8*, chr 1: 11455734..11460220. *OsHKT9*, chr6: 29533236..29535607. Les gènes *OsHKT9* et *OsHKT1* se suivent. *OsHKT4*, 5 et 7 sont également en “cluster”.

IV.1 Introduction

Les analyses fonctionnelles en système hétérologue et de localisation tissulaire de trois membres de la famille *HKT* de riz, présentées dans le chapitre précédent (Cf. Chapitre III), s'inscrivent dans une démarche visant à préciser la fonction de ces systèmes chez le riz. Dans le cadre de cet objectif, en complément des données fonctionnelles et de localisation, une approche de génétique inverse a donc été mise en œuvre et l'isolement de mutants perte de fonction pour ces gènes *HKTs* a été entrepris. L'analyse de mutants perte de fonction (issus d'un crible génétique) pour *AtHKT1*, l'unique gène *HKT* d'*Arabidopsis*, avaient permis de démontrer que ce transporteur joue un rôle important dans la tolérance de la plante au stress salin (Berthomieu *et al.*, 2003). Aucune donnée sur le rôle des *HKTs* de riz issue de l'analyse de mutants n'était disponible au début de ma thèse. Cependant, l'important développement par la communauté internationale de ressources génomiques chez le riz, en particulier l'annotation du génome et la disponibilité de collections de mutants d'insertion étiquetés rendait des études par génétique inverse possibles.

Dans ce contexte, mon premier objectif a été de rechercher dans les collections internationales des lignées d'insertion étiquetées dans les gènes *HKTs* de riz. Cette partie du projet a été initiée, en collaboration avec le groupe d'Emmanuel Guiderdoni du CIRAD Montpellier, qui gère plusieurs collections de mutants d'insertion chez le riz (Sallaud *et al.*, 2004; Piffanelli *et al.*, 2007) et a développé une base de données, OryGenesDB³ (CINES⁴, CIRAD Montpellier), recueillant un large ensemble de données génomiques comprenant en particulier les lignées d'insertions étiquetées dans les différentes collections internationales.

Ce chapitre relate tout d'abord comment les mutants ont été choisis, isolés et caractérisés sur le plan moléculaire. Ensuite je décris le travail de purification sur ces mutants (multi-insertionnels) qui a été effectué avant de débiter la caractérisation phénotypique.

IV.2 Recherche et choix de mutants d'insertions dans les gènes *HKT* chez le riz

Les huit gènes *HKTs*, chez le cultivar de riz séquencé et annoté, Nipponbare (sous-espèce *japonica*), sont répartis sur 4 chromosomes, comme le décrit la figure (IV.1). Deux gènes sont présents sur le chromosome 1, un gène sur le chromosome 2, trois gènes en "cluster" sur le chromosome 4 et deux gènes également en "cluster" sur le chromosome 6. Un neuvième gène, *OsHKT2* (Horie *et al.*, 2001), a été identifié chez le cultivar Pokkali (sous-espèce *indica*). Sa localisation chromosomique n'est pas déterminée.

Les collections internationales de mutants d'insertion chez le riz sont construites en utilisant différents types d'éléments insertionnels, ADN-T (Jeon *et al.*, 2000; Sallaud *et al.*, 2004; Hsing *et al.*, 2007), rétrotransposon de riz *tos17* (Miyao *et al.*, 2003; Piffanelli *et al.*, 2007), transposons de maïs *En* ou *Ds* (Kim *et al.*, 2004; Van Enkevort *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2005), chez différents cultivars de riz (Dongjin, Hwayoung, Nipponbare, Tainung67...).

Je souhaitais trouver des mutants sur les gènes *HKTs* chez le cultivar Nipponbare, ce cultivar étant celui sur lequel les ADNc d'un plus grand nombre de membres (huit) étaient disponibles. En particulier, les transporteurs que j'avais commencé à caractériser fonctionnellement dans l'ovocyte de Xénope provenaient tous de ce cultivar.

³ <http://orygenesdb.cirad.fr/>

⁴ Centre Informatique National de l'Enseignement Supérieur-Montpellier –France

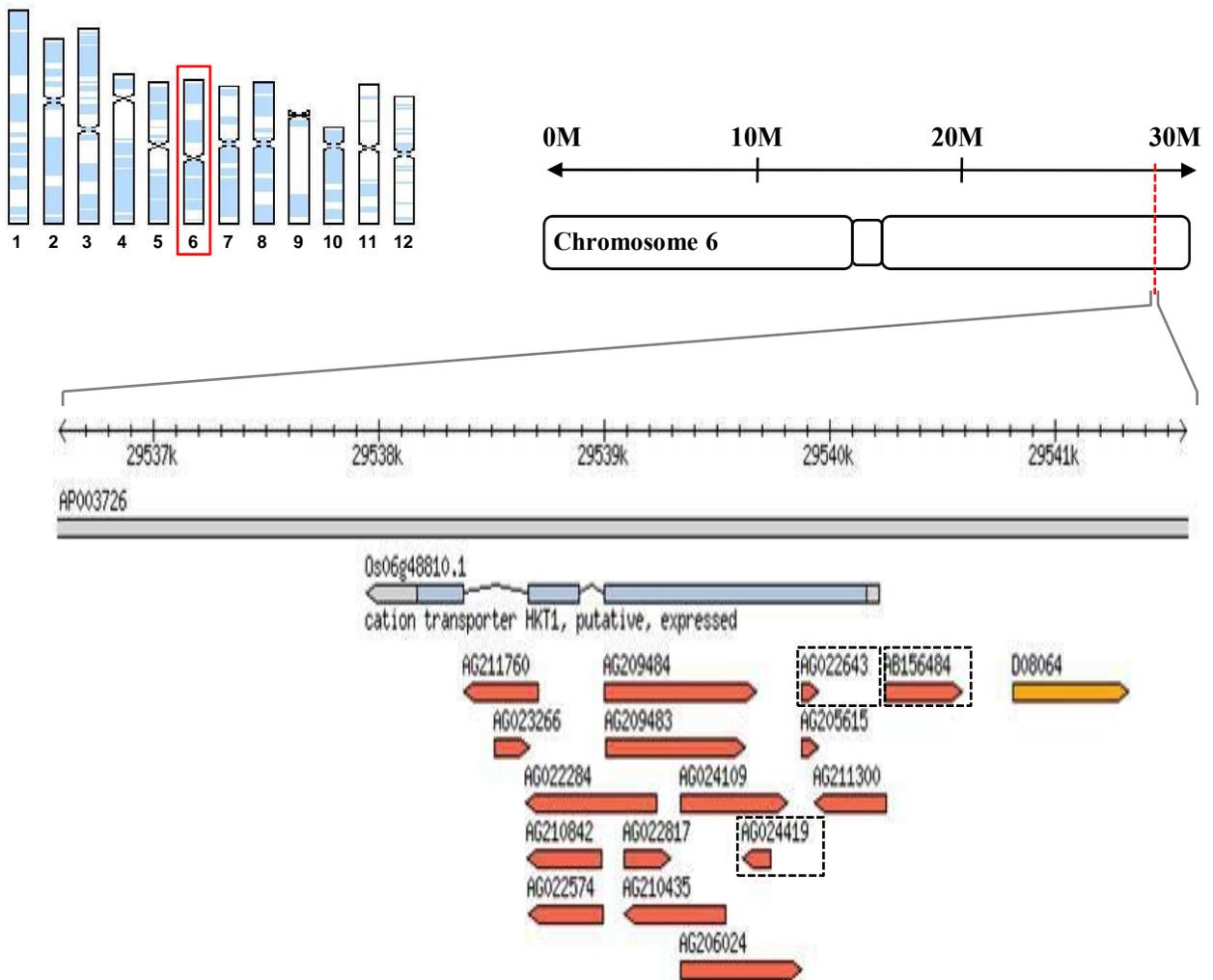


Figure IV.2. Cartographie des lignées d'insertions existantes dans les collections internationales dans le gène *OsHKT1*.

En haut à droite, position du gène *OsHKT1* sur le chromosome 6, dans la région située entre 29,537239 et 29,540924 millions de paires de bases. En bas, capture d'écran du logiciel "Genome Browser" dans la base OryGenesDB représentant une région de 5 kpb du chromosome 6 du riz. Différentes couches d'annotations sont visibles: FST, gènes prédicts, clones BAC. La séquence codante d'*OsHKT1* est représentée par les rectangles bleus interrompus par les deux introns du gène. Les régions 5' et 3' UTR sont représentées par des rectangles gris. Chaque lignée d'insertion indépendante dans le gène ou dans le promoteur d'*OsHKT1* est représentée par un marqueur coloré, soit en rouge pour les insertions par *tos17* (collection NIAS), soit en orange pour les insertions par ADN-T (collection Postech). Le numéro d'accèsion dans la banque de données génomiques NCBI de la séquence nucléotidique flaquante de l'insertion (FST) est indiqué au dessus de chaque marqueur. Les FST des lignées choisies pour le gène *OsHKT1* sont encadrées en pointillés. AG022643: lignée NC2534, AG024419: lignée ND4057 et AB156484: NF7785. La direction du marqueur renseigne sur l'orientation de l'insertion du transposon. Les FST des lignées d'insertions se trouvent à l'extrémité 3' de l'élément insertionnel. Les lignées possédant une insertion par transposon *tos17* sont produites dans le cultivar de riz Nipponbare alors que celle possédant une insertion par ADN-T est produite dans le cultivar Hwayoung.

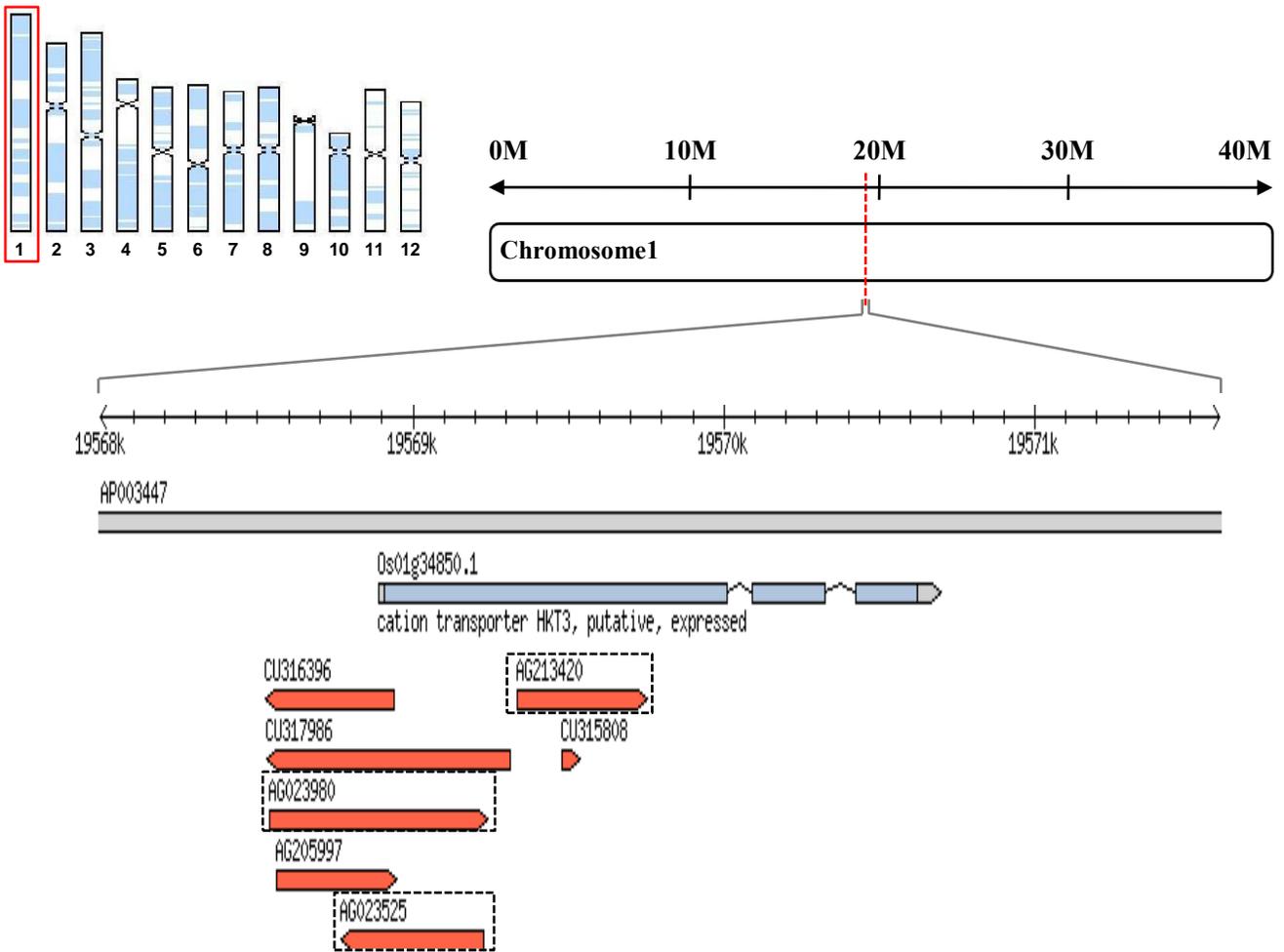


Figure IV.3. Cartographie des lignées d'insertions existantes dans les collections internationales dans le gène *OsHKT3*.

En haut à droite, position du gène *OsHKT3* sur le chromosome 1, dans la région située entre 19,567994 et 19,571593 millions de pb. En bas, capture d'écran du logiciel "Genome Browser" dans la base OryGenesDB représentant une région de 3,6 kpb du chromosome 1 du riz. Les lignées d'insertion par *tos17* dans le gène *OsHKT3* sont représentées par un marqueur coloré en rouge (collection du NIAS, FST AG*; collection T-DNA Genoscope, FST CU*) avec le numéro d'accèsion dans la banque de données NCBI de la séquence nucléotidique flanquante de l'insertion (FST) indiqué au dessus de chaque marqueur. Les FST des lignées choisies pour le gène *OsHKT3* sont encadrées en pointillés. AG023525: lignée ND1011, AG023980: lignée ND3005 et AG213420: ND3058. Les lignées présentées sont produites dans le cultivar de riz Nipponbare.

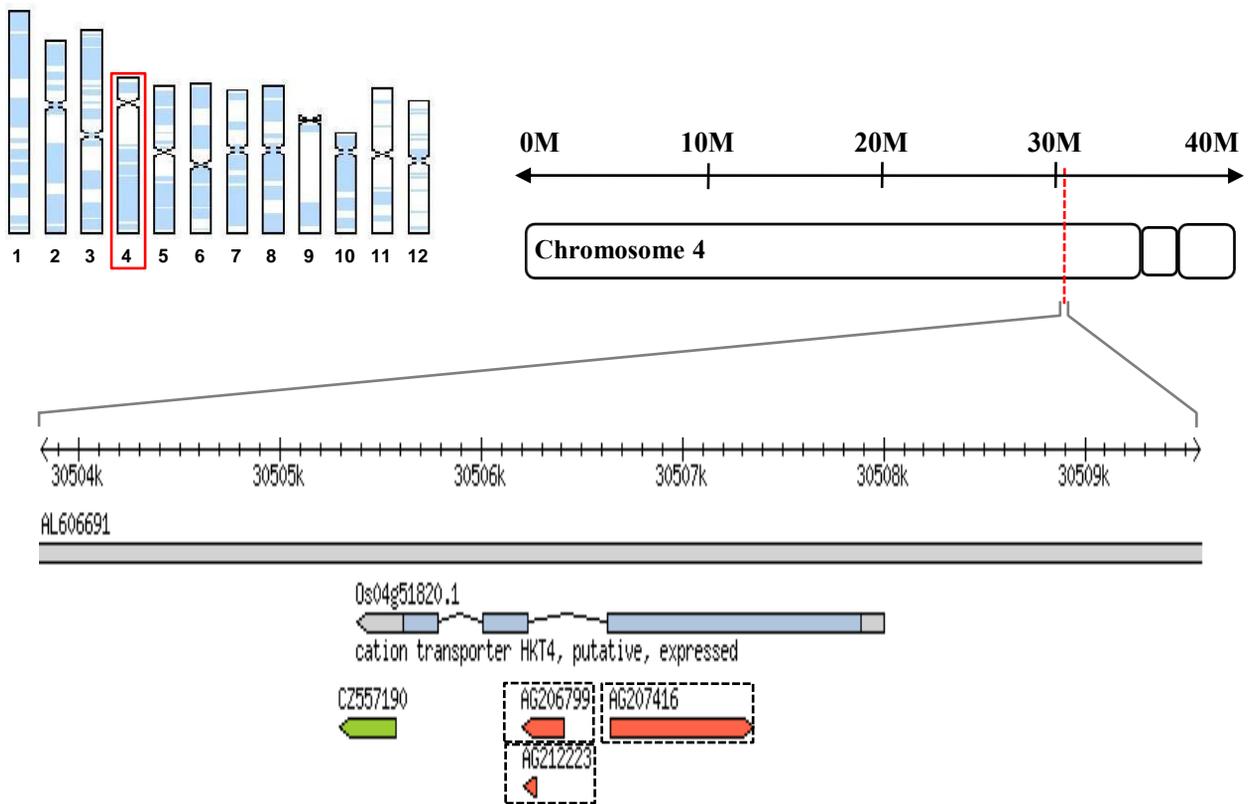


Figure IV.4. Cartographie des lignées d'insertions existantes dans les collections internationales dans le gène *OsHKT4*.

En haut à droite, position du gène *OsHKT4* sur le chromosome 4, dans la région située entre 30,503812 et 30,509571 millions de pb. En bas, capture d'écran du logiciel "Genome Browser" représentant une région de 5,76 kpb du chromosome 4 du riz. Les lignées d'insertion dans le gène *OsHKT4* sont représentées par un marqueur coloré soit en rouge pour les insertions par *tos17* (collections du NIAS), soit en vert pour les insertions par ADN-T (collection du TRIM) avec le numéro d'accès dans la banque de données NCBI de la séquence nucléotidique flanquante de l'insertion (FST) indiqué au dessus de chaque marqueur. Les FST des lignées choisies pour le gène *OsHKT4* sont encadrées en pointillés. AG206799: lignée ND6046, AG207416: lignée ND8018 et AG212223: NF7030. Les FST des lignées d'insertions se trouvent à l'extrémité 3' de l'élément insertionnel. Les lignées possédant une insertion par transposon *tos17* sont produites dans le cultivar de riz Nipponbare alors que la lignée possédant une insertion par ADN-T est produite dans le cultivar Tainung 67.

<i>OsHKT#</i>	Nom de la lignée	FST	Région	Orientation	Position de l'insertion*	Délétion **	Phénotype de la lignée***
1	NF7785	AB156484	Promoteur	Antisens	-81	-	-
	NC2534	AG022643 AG205615	Exon	Antisens	290	-	-
	ND4057	AG024419	Exon	Sens	424	-	-
3	ND3005	AG205997 AG023980	Promoteur	Sens	-346	2 (-367)	-
	ND1011	AG023525	Exon	Antisens	318	-	Albinos, faible thallage, feuilles fines, feuilles tombantes, feuilles enroulées, plante naine, semi-précocité, entrenoeuds courts
	ND3058	AG213420	Exon	Sens	426	-	Plantes naines
4	ND8018	AG207416	Exon	Antisens	1243 ?	-	Plantes naines
	ND6046	AG206799	Intron	Sens	1472	-	-
	NF7030	AG212223	Intron	Sens	1613	-	-

Tableau IV.1. Bilan des mutants d'insertion par transposon *tos17* de riz commandés dans la collection du NIAS.

Le nom des lignées est celui donné par le NIAS (National Institute of Agrobiological Sciences). Le numéro d'accèsion de la FST est donné dans Genbank. La position de l'insertion (indiquée en pb par rapport à l'ATG)(*), l'orientation de l'élément mutagène par rapport au sens du gène et les délétions éventuelles au voisinage de l'insertion (nombre de bases délétées suivi de la position de la délétion à partir de l'ATG entre parenthèses, (**)) ont été vérifiées/identifiées par séquençage après amplification de la région flanquante par PCR. La position de l'insertion dans la lignée ND8018 n'a pas été confirmée. Les phénotypes des lignées (***) sont décrits sur le site du NIAS. *N.B.* Les deux références de FST indiquées pour les lignées NC2534 et ND3005 correspondent à une seule et même insertion du transposon *tos17*.

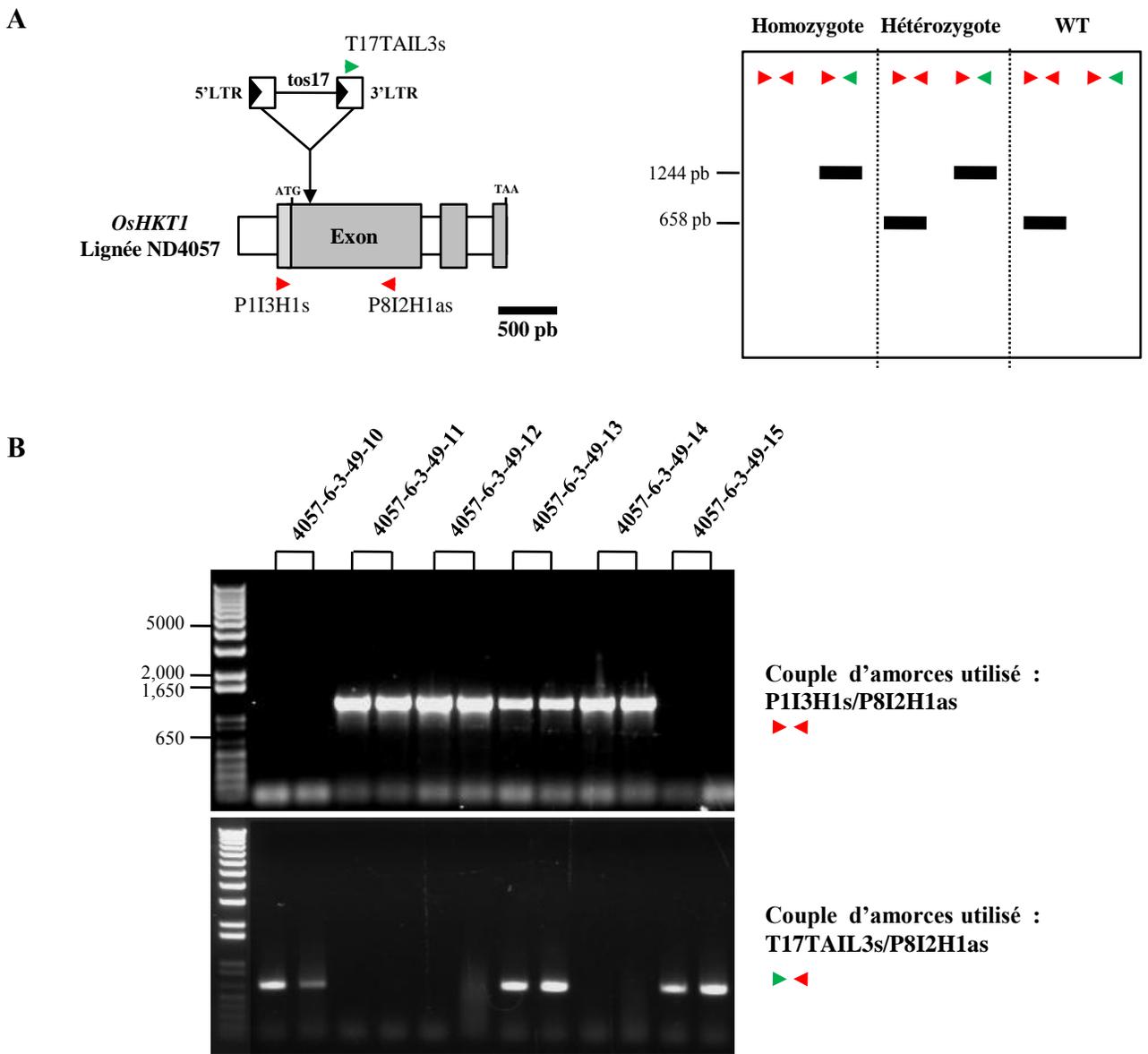


Figure IV.5. Test de détection par PCR de l'insertion du transposon *tos17* et exemple de détermination de génotype de plantes issues de la lignée ND4057.

A. A gauche, position de l'insertion du transposon *tos17* (cas de la lignée ND4057) dans le premier exon du gène et positionnement des amorces utilisées pour le génotypage. A droite, schéma illustrant les différents profils pouvant être obtenus par PCR (avec les deux couples d'amorces T17tail3s/P8I2H1as) permettant l'identification du génotype des plantes. **B.** Résultat sur gel d'agarose d'un génotypage de plantes de la lignée ND4057 utilisant les deux couples d'amorces mentionnés en (A). Les plantes utilisées, sont des descendants de la plante ND40576-3-49, hétérozygote pour l'insertion dans le gène *OsHKT1*. Cent ng d'ADNg ont été utilisés comme matrice. Deux extractions à partir d'échantillons foliaires sont effectuées sur chaque plante à génotyper. Les amplifications obtenues à partir des ADNg de la même plante sont déposées dans deux puits successifs. La synthèse des résultats du génotypage indique que les plantes 10 et 15 sont homozygotes, les plantes 11, 12 et 14 sont sauvages pour l'insertion et la plante 13 est hétérozygote.

En interrogeant la base de données OryGenesDB, j'ai identifié des mutants par insertion du transposon *tos17* dans six gènes *HKTs*, *OsHKT1*, *OsHKT3*, *OsHKT4*, *OsHKT5*, *OsHKT7* et *OsHKT9* (cultivar Nipponbare), dans la collection de mutants "Rice *tos17* Insertion Mutant Database" construite par le NIAS au Japon (Miyao *et al.*, 2003). Aucun mutant n'a été identifié dans les gènes *OsHKT6* et *OsHKT8*. Il est à noter qu'actuellement, les différentes collections ne comprennent toujours pas de mutant dans le gène *OsHKT6* et pas de mutant chez le cultivar Nipponbare dans le gène *OsHKT8*.

Le *tos17* est un rétroélément de 4 Kb, appartenant à la famille des retrotransposons LTR, et plus particulièrement au groupe Ty1-copia (figure II.5.A) (Kumar et Bennetzen, 1999), qui a été utilisé comme mutagène intentionnel pour générer des collections de mutants.

Cet élément est mobile grâce aux enzymes reverse transcriptase et RNaseH pour lesquelles il code, et qui permettent la rétrotranscription de son ARN en ADN extra chromosomal et la réinsertion de l'ADN obtenu par tétrotranscription dans le génome. Le riz compte un nombre important de rétrotransposons, entre autres 32 éléments de type *tos* (Hirochika *et al.*, 1992, 1996, Wang *et al.*, 1997) dont cinq seulement (*tos10*, *tos17*, *tos19*, *tos25*, et *tos27*) sont "actifs" (activables). Parmi les cinq, *tos17* est décrit comme étant le plus "actif" (Hirochika *et al.*, 1996). Tous sont activés par la culture *in vitro* et sont de nouveau inactifs dans les plantes régénérées. Dans les collections de mutants de riz par insertion du transposon *tos17*, les lignées contiennent entre 5 et 30 copies nouvelles du rétroélément (Hirochika *et al.*, 1996). Le cultivar Nipponbare (utilisé dans cette étude) contient deux copies natives du transposon *tos17*, une sur le chromosome 7, "active", et une sur le chromosome 10, inactive, présentant une forte méthylation.

J'ai choisi de commander des lignées d'insertions mutantes pour des membres de la famille que j'avais commencé à caractériser fonctionnellement dans l'ovocyte de Xénope (Cf. Chapitre III.), *OsHKT1*, *OsHKT3* et *OsHKT4*. Le nombre de lignées disponibles dans la collection du NIAS pour chaque gène était variable. J'ai identifié respectivement 16, 4 et 3 lignées d'insertions pour *OsHKT1*, *OsHKT3* et *OsHKT4*. Les lignées d'insertion dans ces gènes diffèrent quant au nombre, à la position, à la région (exon, intron ou promoteur) et à l'orientation de l'insertion du transposon *tos17* (sens ou antisens). Les figures IV.2, IV.3 et IV.4 montrent des agrandissements des régions des chromosomes 4, 6 et 1 du riz contenant respectivement les gènes *OsHKT1*, *OsHKT3* et *OsHKT4*, avec différentes couches d'annotations indiquant la position et le sens des différentes insertions dans les différentes collections dont celle du NIAS, la référence des régions flanquantes des insertions (FST) séquencées mais également le clone bac à partir duquel a été déterminée la séquence et la structure du gène.

Dans une première étape, trois lignées par gène ont été commandées au NIAS pour permettre de débiter une caractérisation phénotypique, avant l'élimination complète des transposons surnuméraires (*i.e.*, transposons autres que ceux insérés dans le gène *HKT* parmi ceux qui ont transposé lors de la création de la collection). Pour *OsHKT3* et *OsHKT4*, seulement trois lignées par gène étaient alors disponibles. Les trois lignées ont été commandées. Dans ces lignées les insertions du *tos17* se trouvent pour la plupart dans la séquence transcrite (région exonique : 2 lignées pour *OsHKT3*, 1 pour *OsHKT4*; région intronique: 2 lignées pour *OsHKT4*). Une lignée dans le gène *OsHKT3* a une insertion située dans le promoteur. Pour *OsHKT1*, 16 lignées avec des insertions de *tos17* étaient disponibles. J'ai recherché des lignées avec des insertions en début de gène, qui ne présentaient pas de phénotype de faible fertilité ou nanisme (tableau IV.1). Ces derniers phénotypes sont en effet fréquents dans la collection à cause du grand nombre d'insertions et peuvent compliquer la

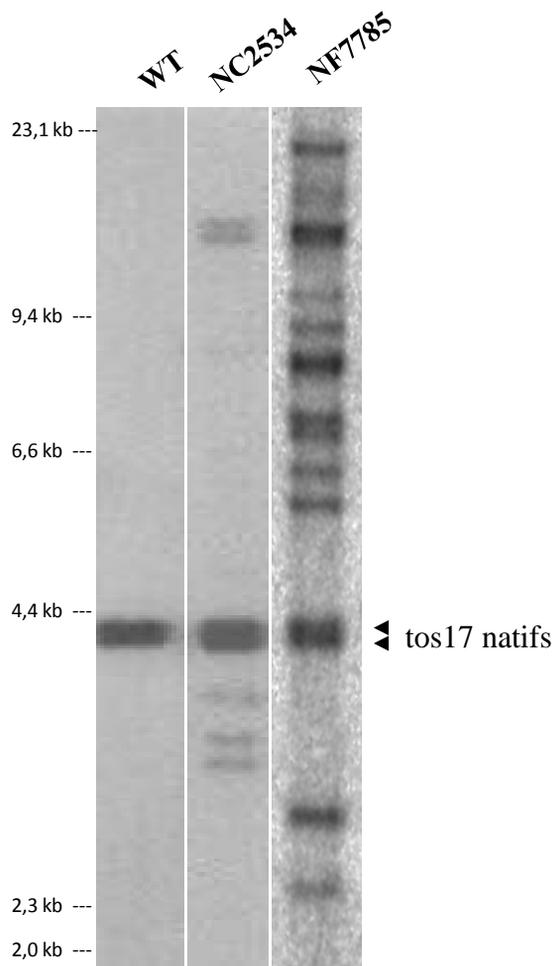


Figure IV.6. Estimation par “Southern blot” du nombre de copies du transposon *tos17* chez deux lignées mutantes pour le gène *OsHKT1*.

Environ 5 µg d'ADNg de plantes sauvage ou mutante pour le gène *OsHKT1* (lignées NC2534 et NF7785) sont digérés par l'enzyme *Xba*I. Les plantes mutantes NC2534-8-204 et NF7785-4-269 ont été obtenues par autofécondation (générations T4 et T3, respectivement). Elles sont toutes les deux homozygotes pour l'insertion dans le gène *OsHKT1*. Les trois échantillons sont hybridés avec une sonde spécifique du *tos17* marquée par du ^{32}P (voir Figure II.7). L'échelle à gauche indique la taille des bandes en kb.

purification des mutants. Finalement, j'ai choisi 2 lignées avec une insertion dans le premier exon et une dans le promoteur. Le tableau IV.1 dresse un bilan des neuf lignées d'insertion commandées pour les trois gènes *OsHKT1*, *OsHKT3* et *OsHKT4*. Ce tableau comprend en particulier le nom des lignées donné par le NIAS qui correspond aux FST indiquées sur les figures IV.2 à IV.4. Les lignées seront identifiées par ce nom du NIAS dans le reste du manuscrit.

Pour chacune des lignées commandées, 20 grains ont été reçus du NIAS. Ils correspondent à la génération F1 à l'exception des lignées NC2534 (insertion dans *OsHKT1*) et ND1011 (insertion dans *OsHKT3*) issues d'une amplification par autofécondation de la génération F1.

IV.3 Caractérisation moléculaire des mutants

IV.3.1 Détermination du génotype des plantes mutantes par PCR: recherche de plantes homozygotes

Les grains des neuf lignées commandées ont été semés dans des terrines (figure II.1A). Lorsque les plantes ont atteint 3 à 4 semaines (2 grandes feuilles étendues), une extraction d'ADN génomique a été effectuée à partir d'échantillons foliaires (Cf. § II.4.1.1). Le génotypage des plantes a été effectué par PCR, en se basant sur l'utilisation de deux couples d'amorces définis pour chaque lignée à partir de séquences codantes du gène et du transposon *tos17* (tableau II.1; figure II.5; figure IV.5). Une première PCR avec une amorce sur le transposon et l'autre sur le gène dans ou à proximité de la FST (figure II.5) permet de détecter la présence du transposon *tos17* dans le gène d'intérêt (plante homozygote ou hétérozygote pour cette insertion). La deuxième PCR avec deux amorces sur le gène de part et d'autre de la position de l'insertion du transposon permet de déterminer les plantes qui possèdent une copie intacte du gène d'intérêt (plantes sauvage ou hétérozygote pour cette insertion) (figures II.5 et IV.5). La synthèse de ces deux informations permet d'identifier le génotype des plantes pour l'insertion dans le gène *HKT* (figure IV.5).

Pour la plupart des lignées, au moins 1 plante homozygote a été identifiée parmi les plantes issues des grains envoyés par le NIAS. Pour les lignées NC2534 (mutation sur *OsHKT1*), et ND3005 (mutation sur *OsHKT3*), seulement des plantes hétérozygotes ont été identifiées. Une nouvelle recherche de plantes homozygotes a dû être effectuée dans la descendance de ces plantes. Pour la lignée ND8018, aucune insertion du transposon *tos17* au niveau ou à proximité de la FST (sur *OsHKT4*) n'a été identifiée dans les grains envoyés.

IV.3.2 Détermination de la position exacte de l'insertion dans le gène d'intérêt

Pour déterminer la position exacte des insertions dans le gène d'intérêt et la présence éventuelle de modifications dans la séquence du gène au voisinage de l'insertion, les morceaux d'ADN amplifiés lors du génotypage contenant l'extrémité 3' de la séquence du transposon ont été clonés et séquencés. Les positions des insertions du transposon *tos17* (à part pour la lignée ND8018 où l'insertion dans *OsHKT4* n'a pas été confirmée) se sont révélées être identiques à celles données dans les bases de données (tableau IV.1). Par contre, chez la lignée ND3005, une délétion de 2 pb en amont de l'insertion dans le promoteur d'*OsHKT3* a été identifiée (tableau IV.1). L'analyse de la bordure 5' du transposon chez les différentes lignées n'a pas été effectuée.

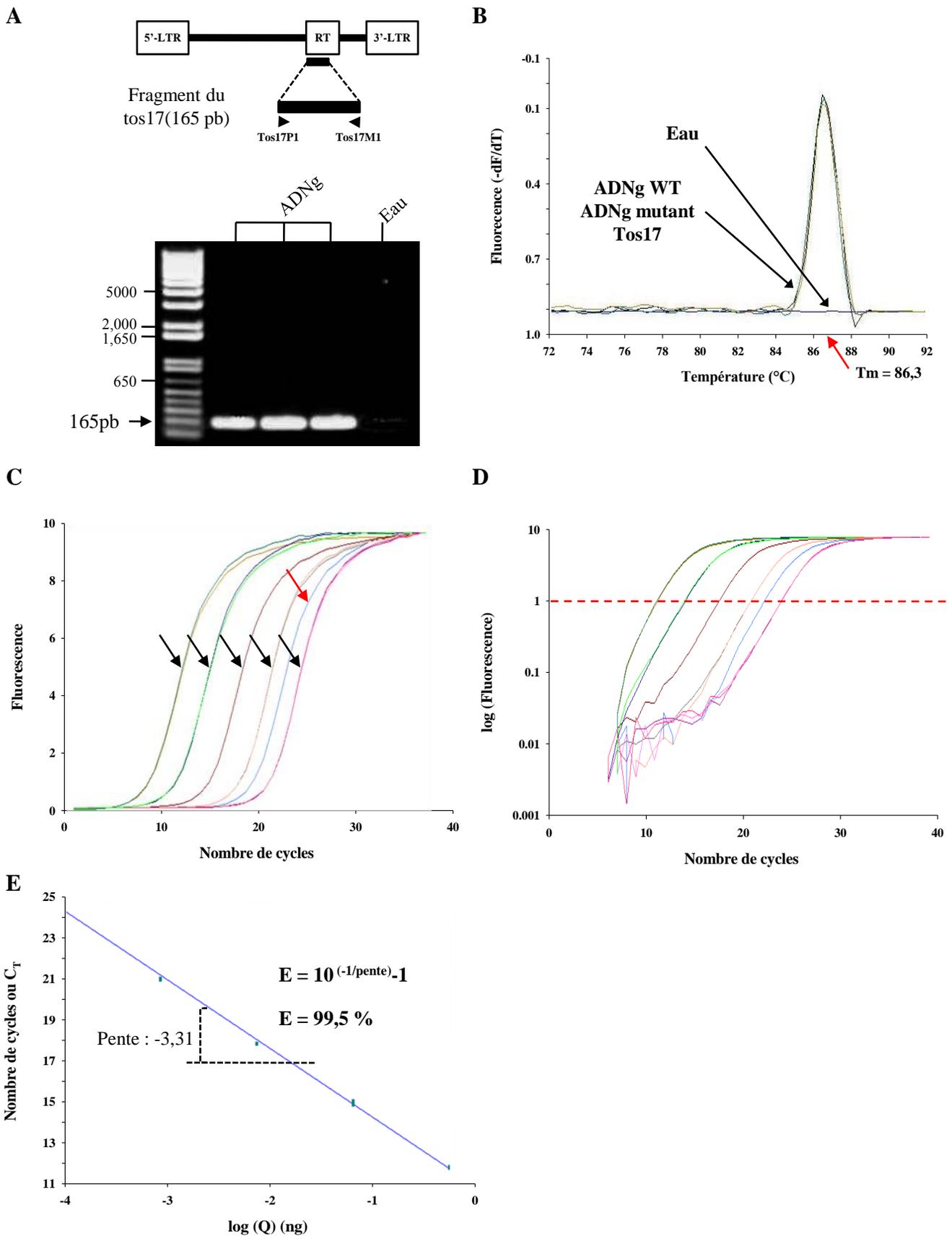


Figure IV.7. Analyse par PCR en temps réel du nombre de copies du transposon *tos17* sur des lignées d'insertion sur *OsHKT1* partiellement purifiées.

A et B. Analyse de la spécificité des amorces. **A.** En haut, positionnement du couple d'amorces

utilisées sur la séquence du gène de la reverse transcriptase du transposon *tos17*. En bas, vérification sur gel de l'amplification d'une seule bande de 165 pb. Cent ng d'ADNg ont été utilisés comme matrice dans les 3 premières pistes. La dernière piste est un contrôle négatif avec de l'eau comme matrice. **B.** Analyse de la courbe de fusion des amplicons obtenus par PCR en temps réel. Sont représentées les courbes de fusion de trois échantillons contenant, respectivement, l'ADNg d'une plante sauvage (100 ng), le plasmide contenant la sonde *tos* (100 ng) et l'ADNg d'un mutant insertionnel (100 ng). La courbe de fusion du traitement contrôle (eau) est représentée également. La courbe de fusion est obtenue par dérivation de la courbe d'intensité de la fluorescence en fonction de la température ($-dF/dT$) lors d'une rampe d'accroissement de la température. L'abscisse du maximum de la courbe donne le T_m ("température de fusion") du produit de la PCR. La présence d'un seul pic au même T_m (ici 86,3°C) pour les 3 échantillons indique que les amorces sont spécifiques, et qu'un seul produit est amplifié. L'absence de pic dans la courbe de fusion contrôle indique l'absence de contaminations. **C à E.** Analyse de l'efficacité de la PCR en temps réel. **C.** Courbes de fluorescence en fonction du nombre de cycles (données brutes). La gamme étalon pour la quantification du *tos17* est composée de cinq solutions contenant, respectivement, 0,5, $5 \cdot 10^{-2}$, $5 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-4}$ et $5 \cdot 10^{-5}$ ng de matrice (plasmide contenant le fragment de *tos*, flèches noires) passées chacune trois fois. La courbe de fluorescence d'un échantillon d'ADNg (50 ng) est indiquée par une flèche rouge. **D.** Mêmes courbes qu'en (A) avec la fluorescence portée en échelle logarithmique et la fixation du seuil de détection (pointillés en rouge) au dessus du bruit de fond dans la phase exponentielle d'amplification, permettant la détermination des C_T (de l'anglais Cycle Threshold pour "seuil du cycle"). **E.** C_T représentés en fonction du logarithme de la quantité d'ADN des échantillons de la gamme étalon (Q , en ng). L'équation de la régression linéaire passant par ces points donne la pente à partir de laquelle on déduit l'efficacité (E) de la PCR, ici égale à 99,5%.

Nom de la plante	C _T moyen	Nombre de copies de tos17/génome	Nombre de copies surnuméraires
WT	21,76 0,02	4	*
2534-8-204	19,92 0,01	14,15 0,11	8
4057-6	19,01 0,01	26,66 0,38	20
4057-6-43-5	20,95 0,02	6,99 0,10	1
4057-6-43-7	20,94 0,01	6,9 0,11	1
4057-6-43-17	20,91 0,01	7,12 0,10	1
4057-6-49-6	20,93 0,01	7,04 0,02	1
4057-6-49-10	20,95 0,01	6,94 0,12	1
4057-6-49-15	20,94 0,01	6,99 0,02	1

Tableau IV.2. Nombre d'insertions du transposon tos17 chez des plantes (différentes générations) de deux lignées mutantes *OsHKT1*, NC2534 et ND4057.

Le nombre de copies du tos17 dans le génome des plantes, dont le nom est mentionné à gauche, a été estimé par PCR en temps réel (figure IV.7) en utilisant la formule $2^{-\Delta C_T}$, ΔC_T étant la différence de C_T entre l'échantillon de la plante mutante et celui d'une plante sauvage (WT). Le nombre de copies du tos17 dans l'ADNg sauvage est de 4 (2 copies sur chaque allèle). Toutes les plantes mutantes testées sont homozygotes pour l'insertion dans le gène *OsHKT1*. Dix ng/ μ l de matrice ont été utilisés. Tous les échantillons ont été passés en triple dans chaque PCR, trois PCR ont été effectuées. Moyenne \pm ES (n=3).

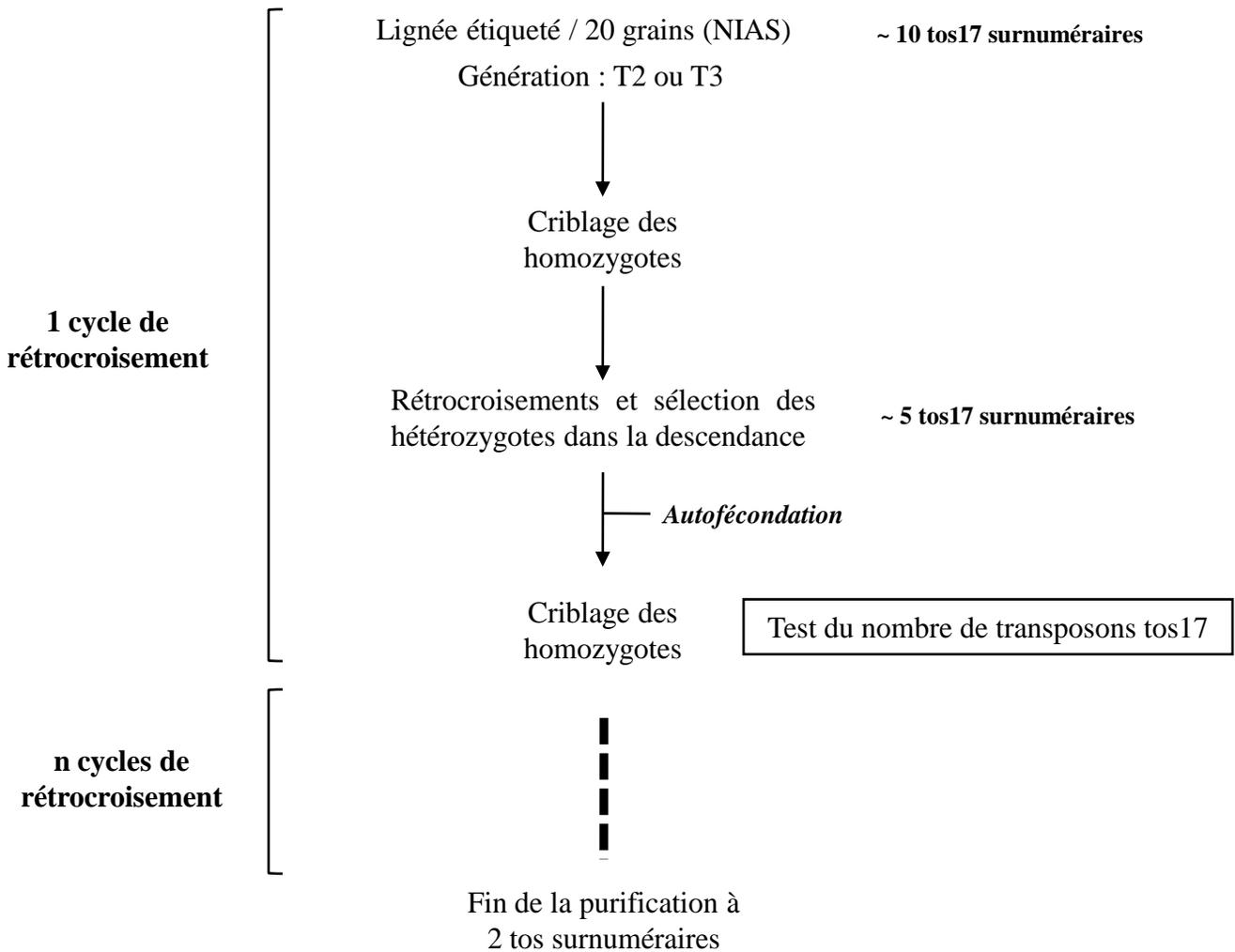


Figure IV.8. Schéma de purification de mutants d'insertions par transposon *tos17*.

La purification des mutants est réalisée moyennant des rétrocroisements successifs. Le criblage des plantes homozygotes (après autofécondation) ou hétérozygotes (après rétrocroisement) est réalisé par PCR. Un cycle entier de grain à grain chez le riz, dans nos conditions, dure 6 mois. Le nombre moyen attendu de transposons *tos17* surnuméraires (*i.e.*, en plus des natifs) dans le génome des plantes mutantes est indiqué sur la figure aux différentes étapes de purification. Deux lignées de mutants sur *OsHKT1* (NF7785 et DN4057), les 3 lignées de mutants sur *OsHKT3* et une lignée sur *OsHKT4* (NF7030) ont subi un cycle de rétrocroisement.

IV.3.3 Analyse du nombre initial de copies du transposon *tos17* par “Southern blot”

Afin d'évaluer le nombre d'insertions *tos17* dans les lignées mutantes du NIAS (avant rétrocroisement), des expériences de Southern blot ont été réalisées, après digestion de l'ADN génomique avec l'enzyme de restriction *Xba*I, *Hind*III ou *Eco*RI, en utilisant pour sonde l'ADN de la reverse transcriptase du transposon *tos17* marqué au ^{32}P (figure II.7A). Les plantes testées sont homozygotes pour l'insertion dans le gène *HKT*. Elles ont été obtenues par autofécondation des plantes issues des grains envoyés par le NIAS (génération T3 ou T4).

La figure IV.6 montre le résultat du “Southern blot” pour deux plantes mutantes (lignées NC2534 et NF7785, mutations dans le gène *OsHKT1*) et une plante de génotype sauvage, après digestion de l'ADN génomique par l'enzyme *Xba*I. Au moins 5 insertions du transposon en plus des deux insertions natives peuvent être identifiées chez la plante de la lignée ND2534 et au moins 14 insertions chez la plante de la lignée NF7785, ce qui est en accord avec les informations données par le NIAS pour l'ensemble de la collection. Le nombre de *tos17* transposés dans le génome est variable et dépend en particulier du temps que les cellules ont passé en culture *in vitro* avant la régénération des plantes. Hirochika *et al.* (1996) indiquent que le nombre moyen d'événements de transposition du transposon *tos17* chez des plantes de cultivar Nipponbare augmente de 5 à 30 lorsque le temps passé en culture *in vitro* augmente de 3 à 16 mois. La collection du NIAS a été construite avec une étape de culture *in vitro* de 5 mois. Le nombre moyen de nouvelles insertions du transposons *tos17* a été estimé à 7 dans les lignées NC* et 11 dans les lignées ND* (Miyao *et al.*, 2003). Les Southern blots effectués sur l'ADN génomique de plantes des autres lignées commandées indiquent, comme ceux de la figure IV.6, un nombre de copies du transposons (en plus des 2 copies natives) compris entre 5 et 15 (non montré).

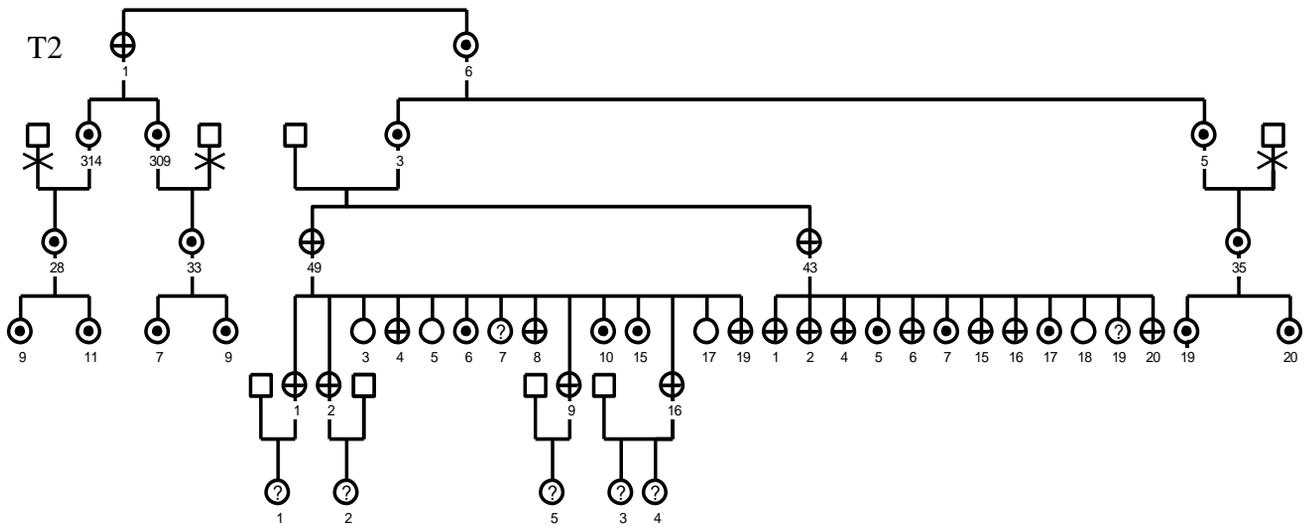
IV.3.4 Analyse du nombre de copies du transposon *tos17* par PCR en temps réel

Le “southern blot” est l'approche la plus utilisée pour l'analyse du nombre de copies d'un transgène. Cette approche est cependant consommatrice en temps et en matériel (ADN génomique). Une autre approche plus récemment utilisée est la PCR en temps réel (figure II.3) (Callaway *et al.*, 2002; Chiang *et al.*, 1996; Ingham *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2002; Zhiwu *et al.*, 2004). J'ai choisi d'utiliser la PCR en temps réel pour quantifier le nombre de copies de transposons *tos17* présents dans le génome des lignées mutantes, pour des analyses à "grande échelle" (suivi de l'évolution du nombre de transposons dans le génome des plantes des différentes lignées au cours de la purification des mutants; Cf. § IV.4).

Des amorces ont été définies, permettant une amplification spécifique du transposon *tos17* avec une très bonne efficacité (figure IV.7). La stratégie de quantification est basée sur une comparaison du nombre de cycles de PCR nécessaire pour arriver à une certaine quantité d'ADN *tos17* synthétisée (nombre de cycles au seuil ou C_T , dépendant de la quantité initiale d'ADN *tos17*) entre des échantillons d'ADN génomique de plantes de génotype sauvage et des échantillons d'ADN génomique de plantes de génotype mutant, sachant que les plantes de génotype sauvage possèdent 4 copies du transposon *tos17* dans leur génome (2 copies par allèle). Le seuil où les C_T sont déterminés est placé au niveau de la phase exponentielle d'amplification, de façon à ce que l'analyse soit quantitative. La quantité d'ADN *tos17* produite au seuil est égale à la quantité initiale d'ADN *tos17* multipliée par $(2)^{C_T}$, la quantité d'ADN doublant à chaque cycle de PCR. Le rapport des quantités initiales d'ADN *tos17* chez un mutant (mut) et chez une plante de génotype sauvage (wt) est donc égal à $(2)^{C_{Twt}-C_{Tmut}}$. Le nombre de transposons *tos17* (N_{tos17}) chez une lignée mutante homozygote, présents en plus des deux exemplaires dans le gène d'intérêt et des quatre exemplaires natifs, est finalement

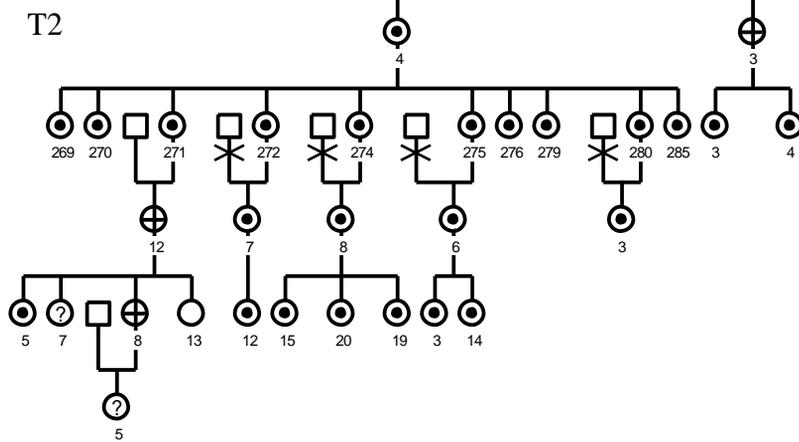
A

ND4057



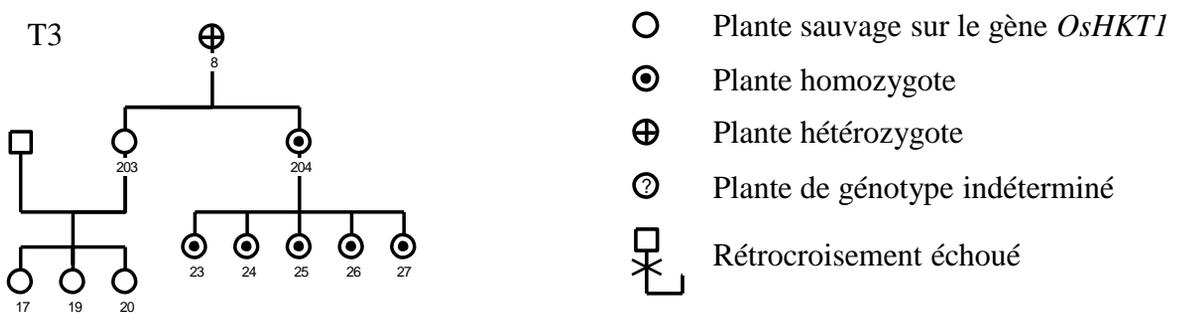
B

NF7785



C

NC2534



- Plante sauvage
- Plante sauvage sur le gène *OsHKT1*
- Plante homozygote
- ⊕ Plante hétérozygote
- ⊙ Plante de génotype indéterminé
- ✖ Rétrocroisement échoué

Figure IV.9. Purification des mutants d'insertion dans le gène *OsHKT1*: arbres généalogiques.

Les numéros des plantes sont indiqués au dessous de chaque symbole. N'ont pas été représentées sur ces arbres, les plantes éliminées volontairement et celles qui n'ont pas poussé après une autofécondation ou un rétrocroisement. La génération (T*) des premières plantes apparaissant sur l'arbre est indiquée à gauche de ces plantes. La légende pour les trois lignées est indiquée en bas à droite.

déterminé par l'équation $N_{\text{tos17}} = (4 \cdot 2)^{C_{\text{T-wt}} - C_{\text{T-mut}}} - 6$. Alors que l'analyse par southern blot indique le nombre de positions d'insertion du transposon, la PCR en temps réel indique le nombre de transposons dans le génome (double à chaque position où l'insertion est homozygote).

Le tableau IV.2 donne le résultat de la quantification des transposons *tos17* par PCR en temps réel chez deux plantes mutantes homozygotes pour l'insertion dans le gène *OsHKT1* (lignées NC2534 et ND4057), avant rétrocroisement (génération T4 et T2, respectivement). La plante de la lignée NC2534 est la même que celle dont l'analyse du nombre d'insertions par Southern blot est montrée dans la figure IV.6. L'analyse par PCR en temps réel confirme que le nombre d'insertions surnuméraires est très variable d'une lignée à l'autre (variations de plus d'un facteur 2). Pour la plante 8-204 de la lignée NC2534, la différence entre le nombre de transposons surnuméraires déterminé par Southern blot (4) et celui déterminé par PCR en temps réel (8), pourrait être due à une sous-estimation du nombre de positions d'insertion par Southern blot (bandes confondues) et par l'existence de plusieurs insertions à l'état homozygote.

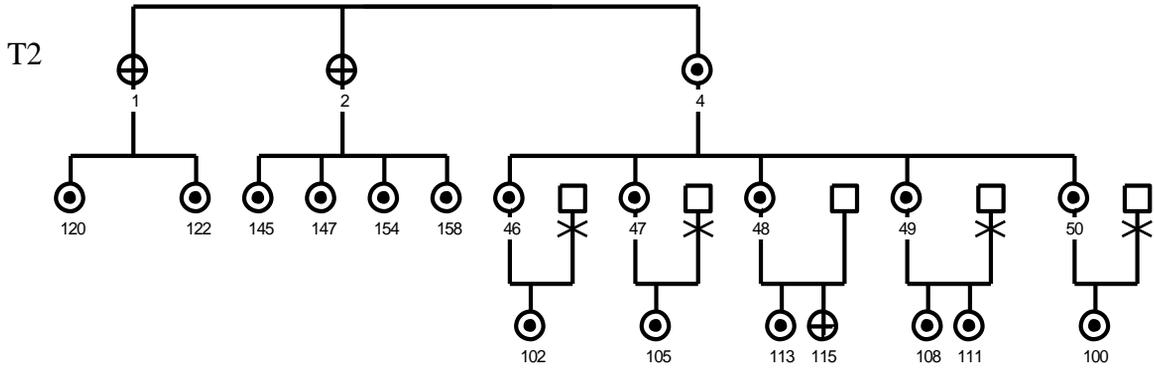
IV.4 Purification des mutants par rétrocroisement successifs

L'analyse par Southern blot et PCR en temps réel du nombre d'insertions du transposon *tos17* a révélé de multiples insertions. Chez les mutants analysés, 4 à 14 positions surnuméraires d'insertions ont été comptabilisées. De plus, l'analyse des sites d'insertions du transposon *tos17* dans la collection du NIAS a montré que le transposon *tos17* transpose dans les régions riches en gènes (Miyao *et al.*, 2003). Ainsi, le risque d'observer un phénotype produit par une (ou des) insertion(s) autre(s) que celle dans le gène d'intérêt est non négligeable. Pour éviter ce problème, des rétrocroisements avec un fond génétique sauvage jusqu'à l'obtention de lignées monoinserctionnelles sont nécessaires. Toutefois, en travaillant en parallèle sur plusieurs lignées insertionnelles indépendantes, une purification partielle des mutants peut certainement permettre de démarrer l'analyse phénotypique.

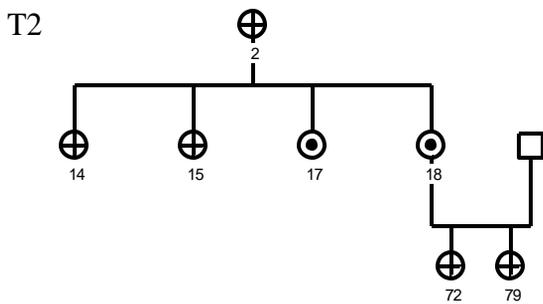
La purification des mutants a été effectuée dans les serres du CIRAD de Montpellier. Les rétrocroisements chez le riz constituent une opération délicate (figure II.6): organes à castrer peu visibles cachés par les glumelles, risque d'autofécondation avant ou lors de la castration important, grains obtenus non complètement protégés par les enveloppes, fragiles, un seul grain obtenu par épillet rétrocroisé. Pour ces raisons, j'ai choisi pour les rétrocroisements la stratégie suivante (figure IV.8): les rétrocroisements sont effectués sur des plantes mutantes homozygotes pour l'insertion dans le gène *HKT#*. La réussite de chaque rétrocroisement (plante issue du rétrocroisement hétérozygote) est testée par PCR. Les plantes rétrocroisées sont ensuite autofécondées pour isoler des homozygotes dans leur descendance qui seront utilisés pour les rétrocroisements suivants. Le nombre de transposons *tos17* restant à éliminer chez les mutants est estimé par PCR en temps réel à la fin de chaque cycle de rétrocroisement sur les plantes homozygotes pour l'insertion dans le gène *HKT* issues de l'autofécondation des plantes rétrocroisées.

Un premier rétrocroisement a été effectué sur 7 lignées mutantes, les 3 lignées d'insertion dans les gènes *OsHKT1* et *OsHKT3* et une lignée dans le gène *OsHKT4* (NF7030). Les plantes rétrocroisées étaient des homozygotes pour l'insertion dans le gène *HKT*, de génération T3 ou T4 (figures IV.9, IV.10, IV.11). Pour ce premier rétrocroisement, les plantes mutantes ont été castrées pour être utilisées comme panicules "femelles" et les plantes sauvages ont servi de pollinisateurs. Environ 150 rétrocroisements ont été effectués sur l'ensemble des lignées, 117 grains se sont développés. Parmi ces grains, 30 seulement ont

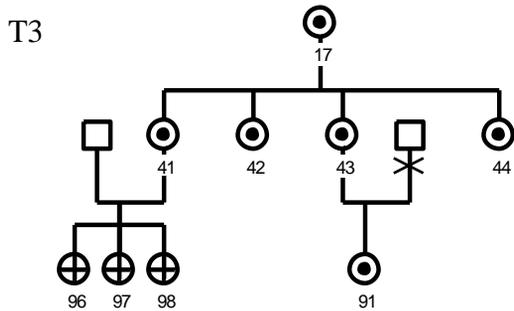
A
ND3058



B
ND3005



C
ND1011



- Plante sauvage
- Plante sauvage sur le gène *OsHKT3*
- ⊙ Plante homozygote
- ⊕ Plante hétérozygote
- ⊙ Plante de génotype indéterminé
- * Rétrocroisement échoué

Figure IV.10. Purification des mutants d'insertion dans le gène *OsHKT3*: arbres généalogiques.

Les numéros des plantes sont indiqués au dessous de chaque symbole. N'ont pas été représentées sur ces arbres, les plantes éliminées volontairement et celles qui n'ont pas poussé après une autofécondation ou un rétrocroisement. La génération (T*) des premières plantes apparaissant sur l'arbre est indiquée à gauche de ces plantes.

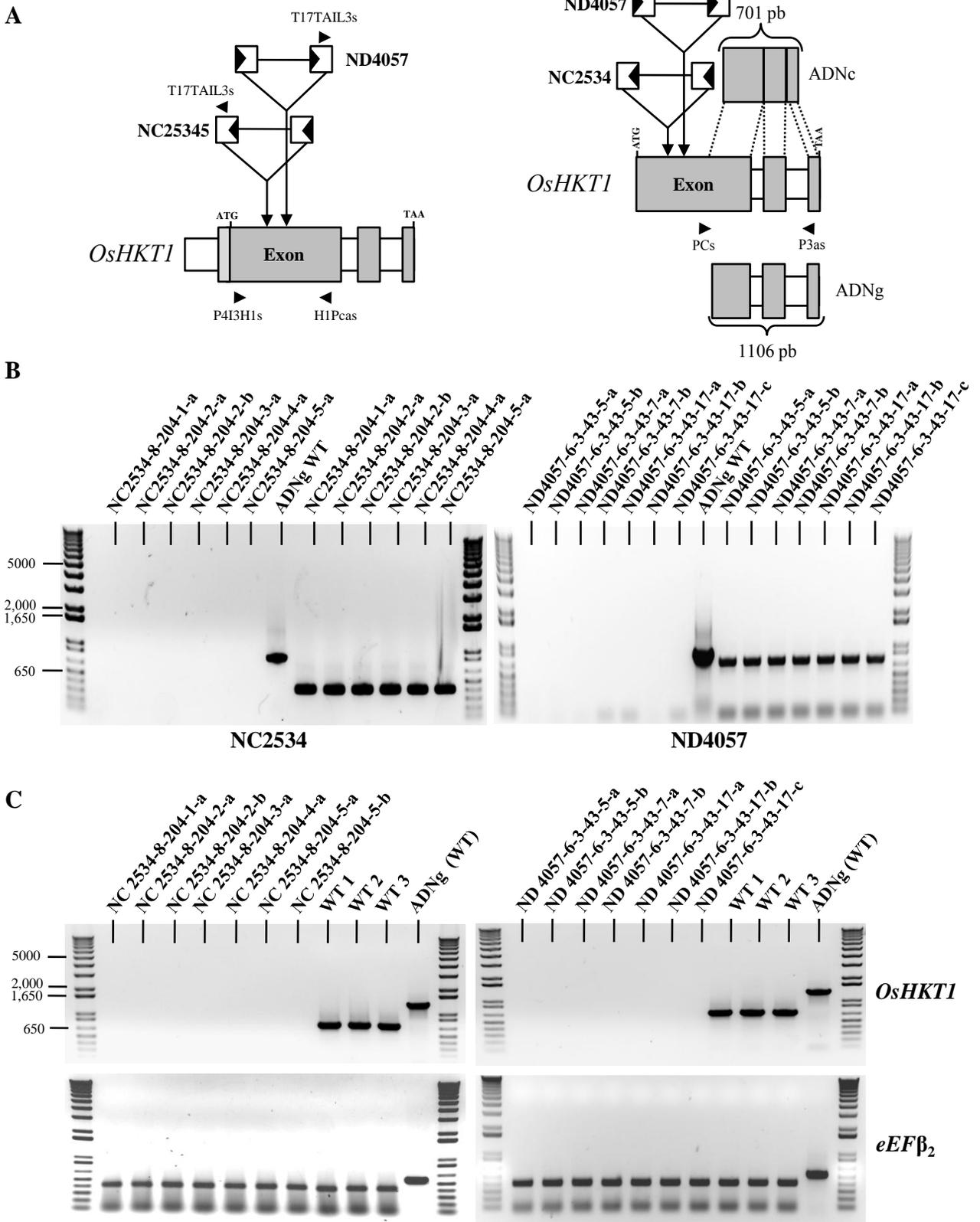
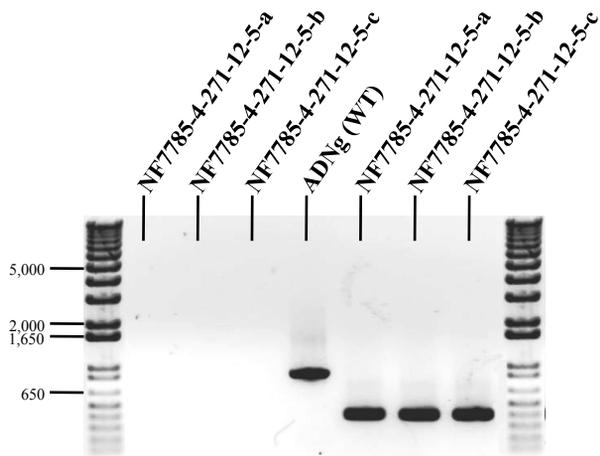
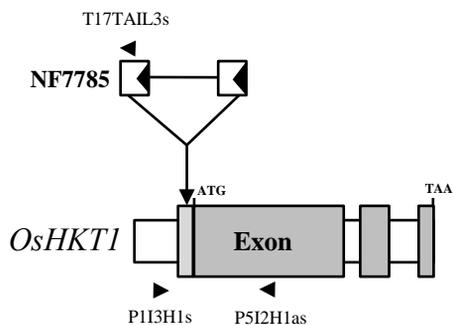


Figure IV.12. Analyse du caractère perte de fonction d'*OsHKT1* chez des plantes homozygotes des lignées NC2534 et ND4057.

A. Position des amorces utilisées pour la détermination du génotype des plantes (à gauche) et pour l'analyse du caractère perte de fonction du gène *OsHKT1* (à droite). Sur le panneau de gauche, le couple d'amorces P4I3H1s/H1Pcas (position 542 à 1436 pb à partir de l'ATG) encadre la position

de l'insertion dans les deux lignées NC2534 et ND4057 et permet d'amplifier un fragment de 895 pb sur le gène en absence de transposon. L'amorce "T17tail3s" est utilisée sur le tos17. Lorsque le transposon est présent dans *OsHKTI*, T17tail3s en combinaison avec P4I3H1s amplifie un fragment de 488 pb chez la lignée NC2534, et en combinaison avec H1Pcas amplifie un fragment de 756 pb chez la lignée ND4057. Sur le panneau de droite, le couple d'amorces Pcs/P3as permet d'amplifier, soit un fragment de 701 pb sur l'ADNc (position 848-1548 pb par rapport à l'ATG), soit un fragment de 1106 pb sur l'ADNg (contrôle) (position 848-1953 pb). **B.** Analyse du caractère homozygote de l'insertion du transposon tos17 dans le gène *OsHKTI* chez différentes plantes de lignée NC2534 ou ND4057. Le résultat du test de génotypage par PCR des plantes mutantes sur les lignées NC2534 et ND4057 est montré sur gel d'agarose (10 µl de produits d'amplification déposés). Environ 100 ng d'ADNg ont été utilisés comme matrice. L'ADNg d'une plante sauvage est utilisé comme contrôle positif sur le gène (amorces P4I3H1s et H1Pcas). Sept premières pistes sur le gel de gauche, huit premières pistes sur le gel de droite: amorces P4I3H1s et H1Pcas; sept dernières pistes sur le gel de gauche: amorces T17tail3s et P4I3H1s; Huit dernières pistes sur le gel de droite: amorces T17tail3s et H1Pcas. **C.** Analyse du niveau d'accumulation de transcrits *OsHKTI* chez des plantes mutantes de lignée NC2534 ou ND4057. Les échantillons contiennent des rétrotranscrits obtenus à partir d'ARN totaux racinaires de plantes cultivées sur un milieu carencé en potassium "0 mM K⁺" (1 mM CaSO₄). Les plantes mutantes sont les mêmes que celles analysées en (B). Dix ng de matrice ont été utilisés dans la PCR. Les plantes sauvages (WT1), (WT2) et (WT3) sont des plantes différentes. Gels du haut: amplification de rétrotranscrits *OsHKTI*; gels du bas (contrôle): amplification de rétrotranscrits *eEFβ₂* à partir des mêmes échantillons (couple Pcsβ₂/Pcasβ₂ amplifiant un fragment de 420 pb sur l'ADNc ou 581 pb sur d'ADNg). La même quantité (10 µl) a été déposée sur gel pour tous les échantillons.

A



B

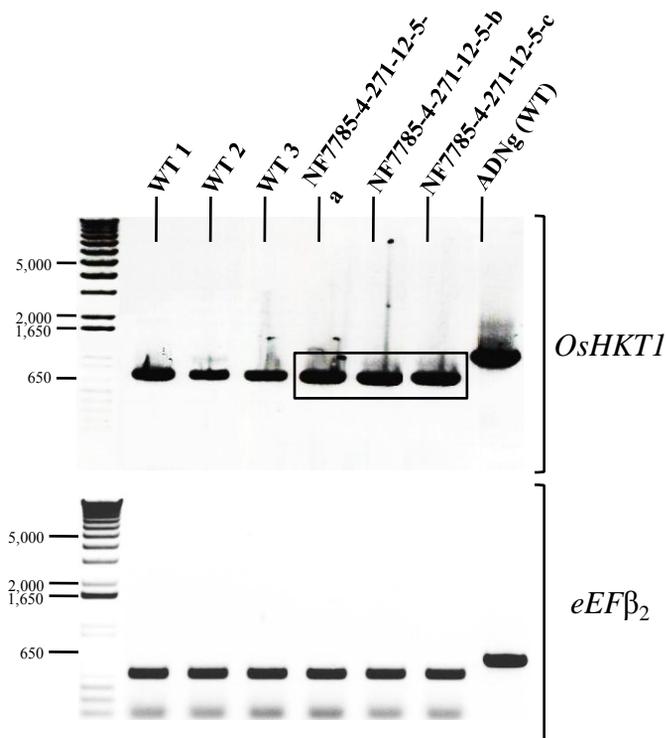
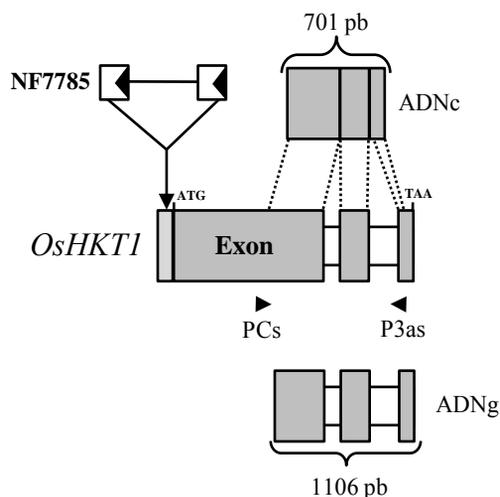


Figure IV.13. Analyse du caractère perte de fonction d'*OsHKT1* chez des plantes homozygotes de la lignée NF7785.

A. Détermination du génotype de 3 plantes mutantes descendantes de la plante NF7785-271-12-5. A gauche, position des amorces utilisées pour le génotypage. A droite 10 μ l de produits d'amplification déposés sur gel d'agarose montrant le résultat du test de génotypage des plantes mutantes par PCR. Environ 100 ng d'ADNg ont été utilisés comme matrice. Les couples d'amorces utilisés dans la PCR et les tailles attendues sont de 918 pb et 486 pb pour respectivement P113H1s/P512H1as et T17tail3s/P113H1s. **B.** Analyse du caractère perte de fonction d'*OsHKT1* chez des descendants de la plante homozygote NF7785-4-271-12-5. Les plantes mutantes sont les mêmes que celles analysées en (A). A gauche, position du couple d'amorces utilisé pour l'analyse du caractère perte de fonction. Ce couple permet d'amplifier, soit un fragment de 701 pb sur l'ADNc (position 848-1548 pb par rapport à l'ATG), soit un fragment de 1106 pb sur l'ADNg (contrôle) (position 848-1953 pb). A droite, gels: en haut, rétrotranscrits *OsHKT1*, en bas, rétrotranscrits *eEF β ₂* (contrôle).

germé. Treize plantes se sont révélées être hétérozygotes. Ces plantes effectivement rétrocroisées appartenait à 6 des 7 lignées sur lesquelles les tentatives de rétrocroisement ont été effectuées (seule la lignée NC2534 n'a finalement pas été rétrocroisée avec succès) (figures IV.9, IV.10, IV.11).

Finalement, le résultat de ces premiers rétrocroisements a conforté mon choix d'avoir utilisé pour ces rétrocroisements des plantes homozygotes, vu l'investissement en temps et le faible taux de réussite (< 10%) (une seule plante rétrocroisée chez 2 lignées, 0 chez la lignée NC2534). Cependant, en effectuant les rétrocroisements sur des plantes homozygotes chez le cultivar Nipponbare, dans nos conditions, seulement 1 rétrocroisement par an peut être effectué. Pour le deuxième rétrocroisement, pour essayer de gagner du temps, j'ai finalement tenté d'utiliser des plantes hétérozygotes, provenant de la descendance des plantes rétrocroisées. Utiliser les plantes hétérozygotes plutôt que les homozygotes de cette génération me permettait également de faire produire des grains aux plantes homozygotes, pour démarrer les analyses phénotypiques sur des plantes partiellement purifiées (Cf. Chapitre V). Lors de ce deuxième rétrocroisement, j'ai effectué les castrations sur des épillets de génotype sauvage et les plantes mutantes ont été utilisées comme pollinisateurs. Ce deuxième cycle de rétrocroisement a concerné trois lignées chez lesquelles le premier rétrocroisement avait réussi, les deux lignées ND4057 et NF7785 sur *OsHKT1* et la lignée NF7030 sur *OsHKT4* (figures IV.9 et IV.11). Dix plantes ont été obtenues à partir des grains issus de ce deuxième cycle de rétrocroisements. Leur génotype n'a pas encore été analysé.

Les arbres généalogiques présentées dans les figures IV.9 à IV.11 résument les travaux de purification des lignées d'insertions dans les trois gènes *OsHKT1*, *OsHKT3* et *OsHKT4*. Vu la lourdeur du travail de rétrocroisement, la purification des trois lignées d'insertion pour le gène *OsHKT3*, pour lequel je n'ai pas pu obtenir de données fonctionnelles dans l'ovocyte, a été interrompue après le premier rétrocroisement. D'autre part, ayant choisi, sur la base des données fonctionnelles obtenues dans l'ovocyte (Cf. Chapitre III), d'effectuer l'analyse phénotypique des mutants d'insertion sur le gène *OsHKT1* (Cf. Chapitre V), j'ai démarré la procédure d'estimation par PCR en temps réel du nombre de transposons restant à éliminer après le premier rétrocroisement chez les lignées d'insertion sur *OsHKT1* (tableau IV.2). Pour les analyses phénotypiques, deux lignées ont été sélectionnées, NC2534 et ND4057, la troisième lignée NF7785 s'étant révélée ne pas être une lignée perte de fonction (Cf. ci-dessous § IV.5). Chez la lignée NC2534, non rétrocroisée, les analyses par PCR en temps réel indiquent que 8 transposons resteraient à éliminer chez la plante 8-204. Chez la lignée ND4057 par contre, la purification serait presque terminée après le premier rétrocroisement avec un seul transposon restant à éliminer chez les différentes plantes homozygotes issues des plantes rétrocroisées (figure IV.9; tableau IV.2).

IV.5 Analyse du caractère perte de fonction du gène *OsHKT1* chez les lignées mutantes NC2534, ND4057 et NF7785

L'analyse du caractère perte de fonction des mutants d'insertion sur les gènes *HKT* a été effectuée chez les trois lignées d'insertion sur le gène *OsHKT1*, ce gène ayant été choisi pour les premières analyses phénotypiques sur les mutants *OsHKT* (Cf. Chapitre V). La présence de transcrits *OsHKT1* a été examinée chez des plantes homozygotes appartenant à chacune des trois lignées, NC2534, ND4057 (figure IV.12) et NF7785 (figure IV.13). Les ARN totaux ont été extraits à partir de racines provenant de plantes cultivées en hydroponie pendant 15 jours sur un milieu carencé en K^+ ($CaSO_4$ 1 mM, MES-BTP 2 mM, pH=6,0), qui sont des conditions de culture connues pour provoquer la surexpression d'*OsHKT1* chez les plantes de

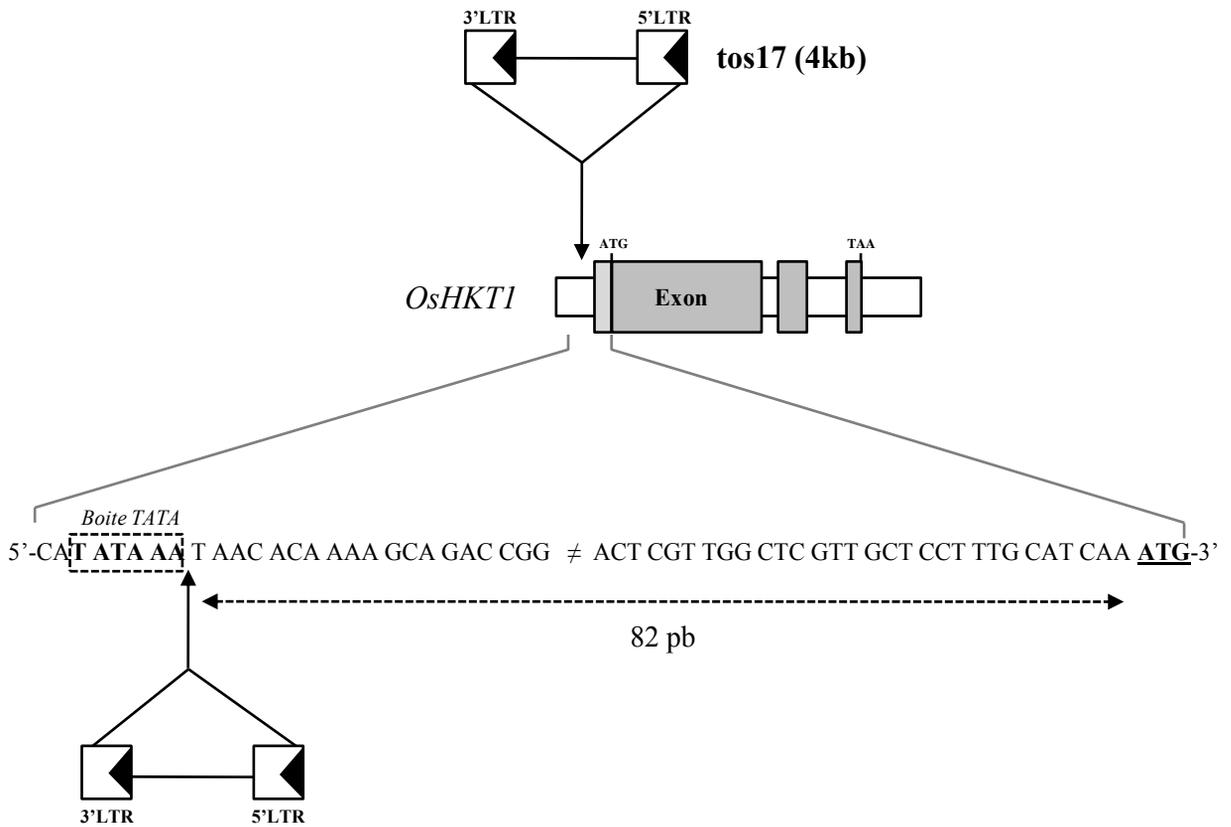


Figure IV.14. Analyse de la zone d'insertion du transposon *tos17* chez la lignée NF7785.

L'insertion du transposon *tos17* est localisée dans le promoteur du gène *OsHKTI* à 82 pb en amont de l'ATG, immédiatement en aval de la boîte TATA (encadrée en pointillés). Les exons du gène *OsHKTI* sont colorés en gris.

génotype sauvage (Horie *et al.*, 2001; Gollmack *et al.*, 2002; Garciadeblás *et al.*, 2003). Les ARN ont été traités à la DNase, dosés au fluorimètre puis rétrotranscrits. Les analyses d'expression ont été effectuées par PCR sur les rétrotranscrits obtenus à partir d'au moins 3 plantes de chaque lignée mutante et trois plantes de génotype sauvage, en temps que contrôle positif. L'amplification systématique (pour tous les génotypes), en parallèle, de rétrotranscrits du facteur d'élongation *eEFβ2* a constitué un deuxième contrôle positif.

Aucun rétrotranscrit *OsHKT1* n'a été détecté chez les deux lignées NC2534 et ND4057 (figure IV.12.C). En revanche, des rétrotranscrits *OsHKT1* ont été détectés chez la lignée NF7785 (figure IV.13.B) en aval de l'insertion du transposon *tos17*, ce qui indique que le gène *OsHKT1* s'exprime chez cette lignée en dépit de l'insertion du transposon. Le niveau d'expression est globalement comparable à celui des plantes de génotype sauvage (figure IV.13.B). Les plantes de la lignée NF7785 utilisées dans ces analyses étaient bien homozygotes comme le montre la figure IV.13.A. Chez la lignée NF7785, le transposon *tos17* inséré dans le gène *OsHKT1* est localisé dans le promoteur du gène, en position reverse par rapport au gène, à 82 pb en amont de l'ATG (figure IV.14). Le site d'insertion du transposon se trouve être immédiatement en aval de la boîte TATA prédite par analyse *in silico* (figure IV.14). La position de l'insertion et la détection d'un transcrit *OsHKT1* chez cette lignée indiquent que la synthèse d'un transporteur *OsHKT1* fonctionnel chez cette lignée est probable (pas de protéine de fusion déduite d'analyses *in silico*). En l'absence de données supplémentaires, la lignée NF7785 a été écartée pour la suite des analyses sur *OsHKT1* (caractérisation phénotypique des mutants). Seules les deux lignées mutantes NC2534 et ND4057 ont été conservées.

IV.6 Conclusion

L'étude de mutants perte de fonction dans les gènes de la famille *HKT* de riz représente une approche majeure pour l'analyse du rôle de ces gènes chez cette plante. J'ai isolé des mutants d'insertion dans trois des gènes de la famille, *OsHKT1*, *OsHKT3* et *OsHKT4*. Il faut noter qu'aucun phénotype n'a été observé en cultivant ces mutants. Cela n'est toutefois pas très étonnant, ces cultures ayant été effectuées en absence de stress.

La purification de mutants d'insertion de la collection du NIAS est longue, en raison du nombre important d'insertions. Elle a été engagée sur sept lignées d'insertion, deux lignées commandées sur le gène *OsHKT4* ayant été abandonnées pour absence de mutant identifié dans le gène d'intérêt (lignée ND8018) ou mutants perdus (lignée ND6046). Finalement, aujourd'hui, une seule lignée (sur *OsHKT1*, ND4057), pourrait être complètement purifiée (à vérifier sur les plantes issues du deuxième cycle de rétrocroisement). Quatre lignées sont partiellement purifiées (3 sur *OsHKT3*, 1 sur *OsHKT4*). Le nombre de transposons restant à éliminer chez les plantes rétrocroisées de ces lignées n'a pas été examiné. Une lignée sur *OsHKT1*, NC2534, n'a pas été rétrocroisée et contient encore un nombre important de transposons. Enfin, le caractère perte de fonction des lignées d'insertion n'a été examiné que chez les lignées sur *OsHKT1*. Une des lignées chez laquelle un transcrit *OsHKT1* a été détecté (NF7785) a été abandonnée.

Le choix des lignées d'insertion sur le gène *OsHKT1* pour démarrer les caractérisations phénotypiques semblait le plus judicieux à la suite de ce travail de purification et des analyses menées en parallèles en système hétérologue sur les propriétés fonctionnelles des transporteurs codés par ces gènes (voir Chapitre III). En effet, deux lignées pertes de fonction

indépendantes, dont une quasiment complètement purifiée, étaient désormais disponibles pour *OsHKT1* à la suite du travail de purification. D'autre part, les propriétés fonctionnelles d'*OsHKT1* en système hétérologue s'étaient révélées intrigantes et complexes, avec plusieurs modes fonctionnels en fonction des conditions ioniques externes, incluant un mode symport Na^+ - K^+ . Il paraissait donc particulièrement intéressant d'examiner le fonctionnement de ce transporteur *in planta*.

*

* *

CHAPITRE V

OsHKT1 est impliqué dans le transport de sodium et de potassium à haute affinité dans la racine de riz

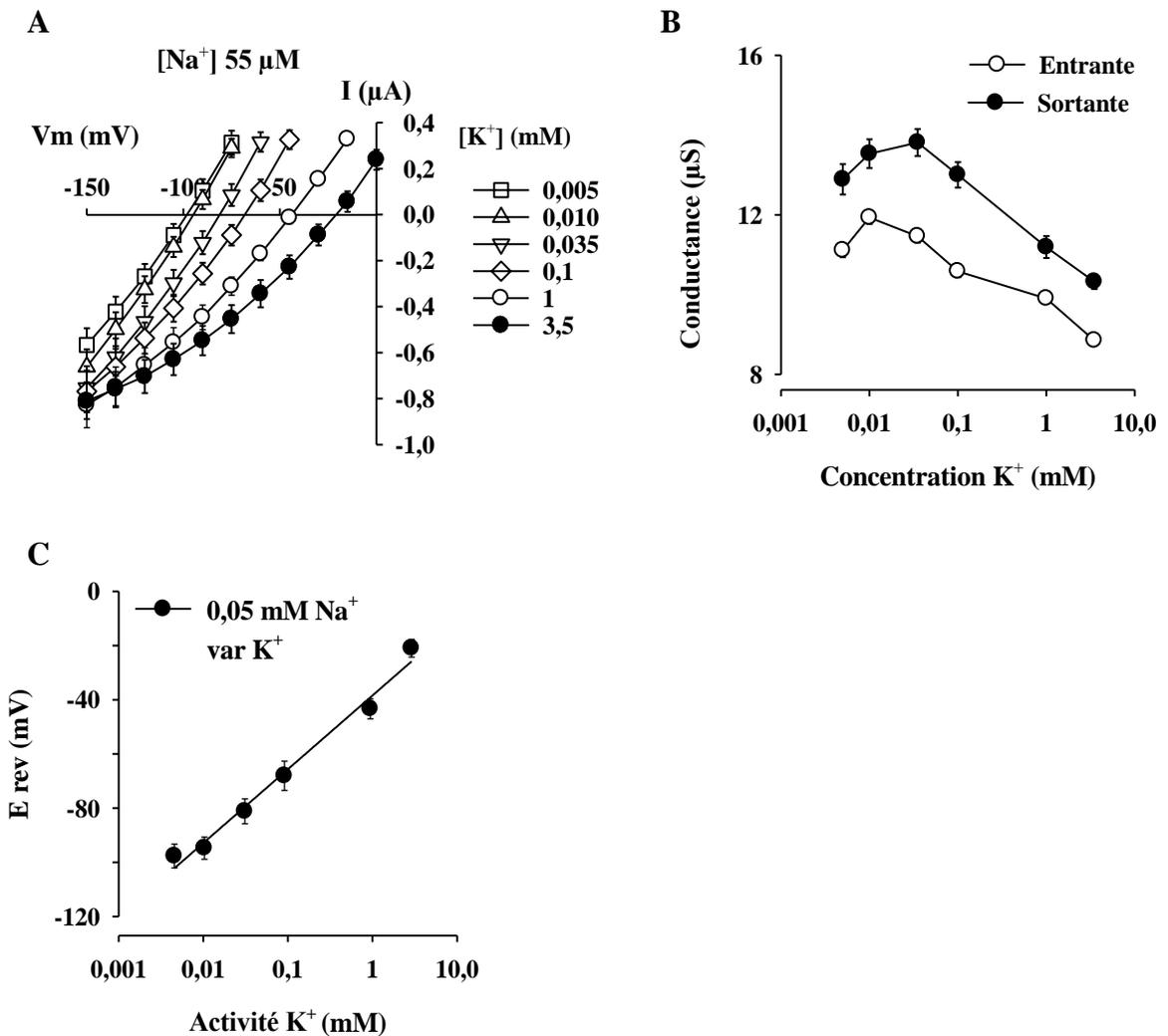


Figure V.1. Interaction entre Na⁺ et K⁺ chez OsHKT1 en présence d'une faible concentration externe de Na⁺.

A et B. Effet de l'augmentation de la concentration externe de K⁺ sur les propriétés de transport d'OsHKT1 en présence d'une faible concentration externe de Na⁺. La concentration externe de Na⁺ est égale à 55 μM (Na⁺-glutamate 50 μM). La concentration externe de K⁺ varie de 5 μM à 3,5 mM. La contamination en K⁺ est égale à 5 μM. Quand la concentration de K⁺ est supérieure à 5 μM, K⁺ a été introduit dans les solutions sous forme de K⁺-glutamate. **A.** Courbes I-V. **B.** Conductances calculées à partir des courbes I-V montrées en (A). Les conductances entrantes et sortantes sont déterminées à proximité des potentiels d'inversion (sur 3 et 2 points, respectivement). **C.** Variation du potentiel d'inversion du courant à travers *OsHKT1* (E_{rev}) en fonction de l'activité externe de K⁺. L'activité des ions est indiquée en mM. La pente de la droite de régression E_{rev} = f(log[K⁺]) est égale à 27 mV/décade d'activité de K⁺. Les données sont des moyennes ± ES (n=6).

V.1 Introduction

Les résultats présentés dans ce chapitre s'inscrivent dans l'objectif d'élucidation de la fonction *in planta* des différents transporteurs HKTs chez le riz. Pour démarrer cette étude, j'ai choisi le transporteur *OsHKT1*. Ce transporteur est chez le riz (cultivar Nipponbare) le plus proche homologue du premier HKT identifié chez le blé, *TaHKT1* (67% d'identité). *TaHKT1* a été isolé par complément fonctionnelle d'un mutant de levure déficient pour le transport de K^+ à haute affinité et a été caractérisé après expression en système hétérologue comme symport Na^+-K^+ (Schachtman et Schroeder, 1994; Rubio *et al.*, 1995). *TaHKT1* est fortement exprimé au niveau du cortex racinaire (Schachtman et Schroeder, 1994). Sa fonction dans la plante reste mal comprise. Aucun indice d'une activité de type symport Na^+-K^+ liée à l'expression de ce gène dans la racine de blé n'a été obtenu (Laurie *et al.*, 2002). De manière plus générale, aucun indice d'une activité de type symport Na^+-K^+ n'a été obtenu chez les plantes supérieures.

Mes analyses dans l'ovocyte de xénope montrent qu'*OsHKT1*, comme *TaHKT1*, peut fonctionner en symport Na^+-K^+ (Cf. Chapitre III). En particulier, le symport est le mode fonctionnel principal d'*OsHKT1* à faibles concentrations externes de Na^+ et K^+ . *OsHKT1*, comme *TaHKT1*, est fortement exprimé dans les tissus périphériques de la racine (Gollmack *et al.*, 2002; Chapitre III) et un rôle *in planta* pour *OsHKT1* dans l'absorption racinaire de Na^+ à haute affinité a déjà été mis en évidence (Horie *et al.*, 2007). Mon hypothèse est qu'*OsHKT1* pourrait être également impliqué dans l'absorption racinaire de K^+ à haute affinité, et qu'il pourrait fonctionner dans la racine de riz, comme dans l'ovocyte, en symport Na^+-K^+ à faibles concentrations externes de Na^+ et K^+ .

J'ai isolé deux lignées d'insertion perte de fonction dans le gène *OsHKT1* chez le cultivar de riz Nipponbare (Chapitre IV). Dans ce chapitre, je rapporte l'étude que j'ai entamée sur la fonction de ce gène dans la racine de riz par la mesure de flux nets de K^+ et Na^+ et de potentiel de membrane des cellules corticales dans des racines de riz de génotype sauvage ou mutant.

V.2 Résultats

V.2.1 *OsHKT1* fonctionne en symport Na^+-K^+ dans l'ovocyte à faible concentration externe de Na^+ et K^+

J'ai montré dans le Chapitre III que la perméabilité d'*OsHKT1* est fortement dépendante des concentrations externes de Na^+ et K^+ . *OsHKT1* est perméable à Na^+ et K^+ en présence de 0,3 mM Na^+ et 0,3 à 10 mM de K^+ dans la solution externe (Chapitre III, figure 5D). Quand la concentration externe de Na^+ est supérieure à 1 mM, *OsHKT1* devient exclusivement perméable à Na^+ (Chapitre III, figures 7A, 8D), une très faible conductance macroscopique est enregistrée quand la concentration externe de K^+ devient supérieure à 10 mM (Chapitre III, figures 5A, 5D et 7A). En présence de concentrations micromolaires de Na^+ (4 μ M) et de concentrations variables submillimolaires de K^+ , une activité symport Na^+-K^+ a été mise en évidence chez *OsHKT1* (Chapitre III, figure 8D).

Dans la figure V.1, une analyse des propriétés de perméabilité d'*OsHKT1* dans l'ovocyte est effectuée en présence d'une concentration de Na^+ moins faible (Na^+ 55 μ M, K^+ 0,005 à 3,5 mM). Pour ces expériences, le protocole appliqué est celui décrit dans la figure II.8.

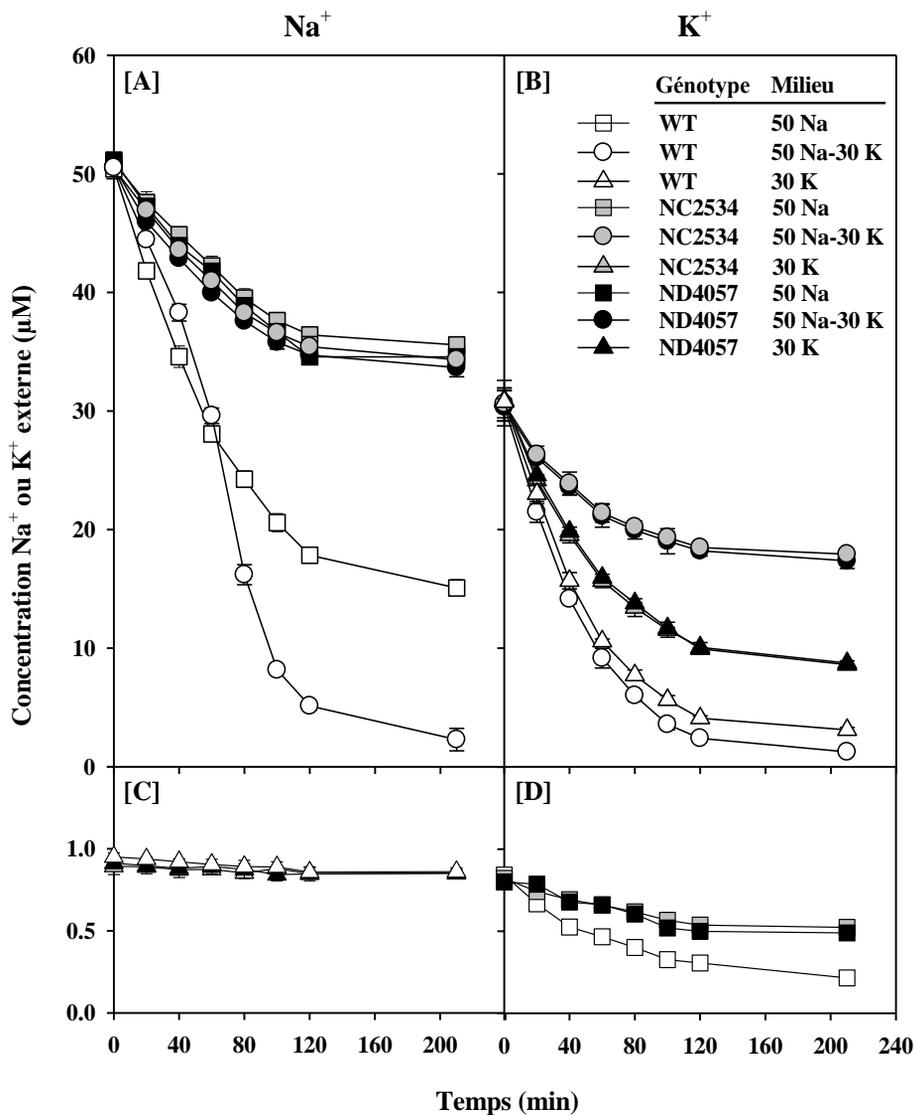


Figure V.2. Appauvrissement du milieu en Na⁺ ou K⁺ par des racines de riz de plantes de génotype sauvage ou perte de fonction *oshkt1*.

A à D. Variations en fonction du temps de la concentration de Na⁺ (A et C) et de K⁺ (B et D) dans le milieu baignant les racines des plantes de génotype sauvage ou mutant. Les plantes ont germé à l'obscurité, sur papier filtre pendant 7 jours, sur un milieu carencé en K⁺ (CaSO₄ 1 mM, MES 2 mM, pH=6,0 (BTP)) puis ont été transférées à la lumière en hydroponie sur le même milieu pendant 10 jours (voir chapitre II- Matériels et méthodes). Avant l'expérience, les racines sont excisées, puis prétraitées pendant 1 heure dans leur milieu de croissance, à 28°C. En début d'expérience, les racines sont transférées dans des solutions expérimentales contenant, en plus du milieu de prétraitement, soit Na⁺ 50 µM, ou K⁺ 30 µM ou à la fois Na⁺ 50 µM et K⁺ 30 µM (milieu 50 Na-30 K). Na⁺ et K⁺ sont apportés, respectivement, sous forme de Na₂SO₄ et K₂SO₄. Environ 600 mg (poids frais) de racines excisées sont placés dans 50 ml de solution expérimentale pour chacun des traitements. Tous les traitements ont été conduits en parallèle au cours de la même expérience dans une chambre de culture en conditions contrôlées (28°C, hygrométrie 65%). L'appauvrissement de la solution en Na⁺ et K⁺ a été suivi au cours du temps par prélèvement et dosage à l'aide d'un spectrophotomètre à émission atomique. Deux lignées mutantes dans le gène *OsHKT1*, NC2534 et ND4057 (descendants des plantes NC2534-8-204-2 et ND4057-6-3-49-10), ont été comparées à des plantes sauvages (WT). Les données sont des moyennes ± ES (n=5).

Les enregistrements de l'activité électrophysiologique d'*OsHKT1* sur la membrane des ovocytes exprimant ce gène sont représentées sous forme de courbes courant-voltage (courbes I-V). Les courbes I-V montrées concernent les courants passant seulement à travers *OsHKT1* (différence entre les courants enregistrés sur des ovocytes exprimant *OsHKT1* et ceux enregistrés dans des ovocytes témoins injectés avec de l'eau). La concentration de K^+ externe varie de quelques μM à quelques mM. Cette variation de concentration entraîne un déplacement du potentiel à courant nul dans le sens des dépolarisations (vers des potentiels plus positifs)(figure V.1.A). L'amplitude du déplacement du potentiel à courant nul atteint 54 mV quand l'activité de K^+ est multipliée par un facteur 100 (déplacement de 27 mV par décade de concentration) (figures V.1.A et V.1.C). Ceci indique que dans ces conditions, l'activité *OsHKT1* enregistrée est une activité de type symport.

Par ailleurs, le potassium exerce un effet inhibiteur sur la conductance macroscopique apparente d'*OsHKT1* dès que sa concentration est supérieure à 10 μM (figures V.1.A et V.1.B) comme cela a été observé dans d'autres conditions de concentration externes de Na^+ (Chapitre III, figures 5D, 8D).

V.2.2 L'invalidation du gène *OsHKT1* affecte les flux nets racinaires de Na^+ et K^+

Une Analyse comparative (entre des plantes sauvages et des mutants invalidés *oshkt1*) de l'appauvrissement du milieu en Na^+ ou K^+ a été effectuée pour déterminer l'effet de l'extinction de ce gène sur les flux nets des ces cations dans les racines.

À cette fin, des grains de riz de génotype sauvage ou mutant ont été mis à germer pendant 7 jours sur un milieu carencé en K^+ ($CaSO_4$ 1 mM, MES 2 mM, BTP (pH=6,0), qui permet une forte expression d'*OsHKT1*. Les contaminations externes en K^+ et Na^+ dans les solutions sont égales, respectivement, à 0,23 μM et 0,33 μM . Les plantules ont été ensuite cultivées en milieu hydroponique pendant 10 jours, puis leurs racines ont été excisées, et rincées pendant 1 heure dans leur milieu de culture, (Cf. § II.3), permettant en particulier de stabiliser l'activité métabolique et l'activité de transport d'ions après le traumatisme de l'excision.

Il est à noter que la mutation *oshkt1* n'a eu aucun effet sur la croissance des plantes dans nos conditions de culture. En effet, je n'ai observé aucune différence au niveau de la biomasse racinaire. Les grains des deux génotypes germent de manière synchrone dans les boîtes de Petri. De plus, la mutation n'a pas eu d'impact sur la morphologie générale de la plante (résultat non montré).

Pour la mesure des flux nets racinaires, les racines ont été placées dans une solution contenant Na^+ seul (50 μM), K^+ seul (30 μM) ou Na^+ en mélange avec K^+ , respectivement 50 et 30 μM en respectant le même poids frais pour les différents traitements. Na^+ et K^+ ont été apportés, respectivement, sous forme de Na_2SO_4 et K_2SO_4 . L'appauvrissement de la solution en Na^+ et K^+ a été suivi au cours du temps en effectuant des prélèvements réguliers d'échantillons de solution baignant les racines (toutes les 20 min jusqu'à 120 min puis après 90 min) qui ont été dosés au spectrophotomètre à absorption atomique. Dans certaines expériences, la variation de la concentration de potassium dans la solution a été également suivie par une macro-électrode ion sélective. Des résultats similaires ont été obtenues en utilisant l'électrode sélective ou le dosage au spectrophotomètre (non montrés). Les résultats présentées dans la figure (V.2) sont issus de dosages au spectrophotomètre.

Je décrirai d'abord le comportement des plantes de génotype sauvage au niveau de l'absorption de Na^+ et de K^+ (figure V.2, panneaux A à D). Le suivi de l'appauvrissement de

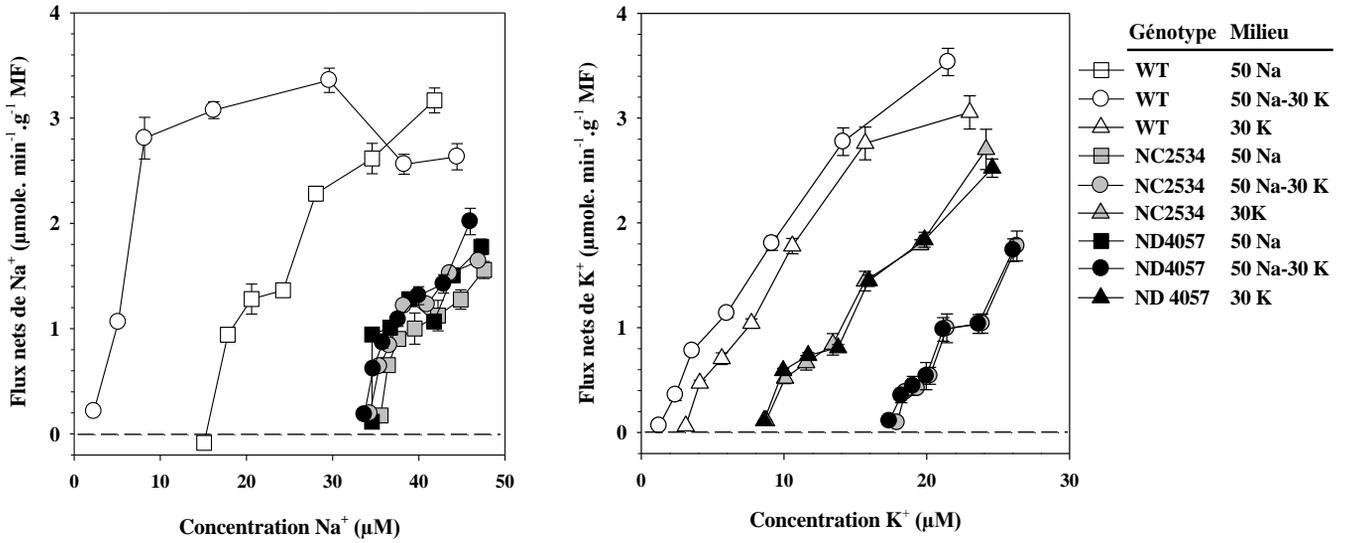


Figure V.3. Variation des flux nets racinaires de Na⁺ et K⁺ en fonction des concentrations externes de Na⁺ et K⁺ chez des plantes de génotype sauvage et des plantes perte de fonction pour *OsHKT1*.

Les flux nets racinaires de Na⁺ et K⁺ ont été calculés à partir des résultats de l'expérience d'appauvrissement du milieu (Figure V.2). Moyennes ± ES (n=5).

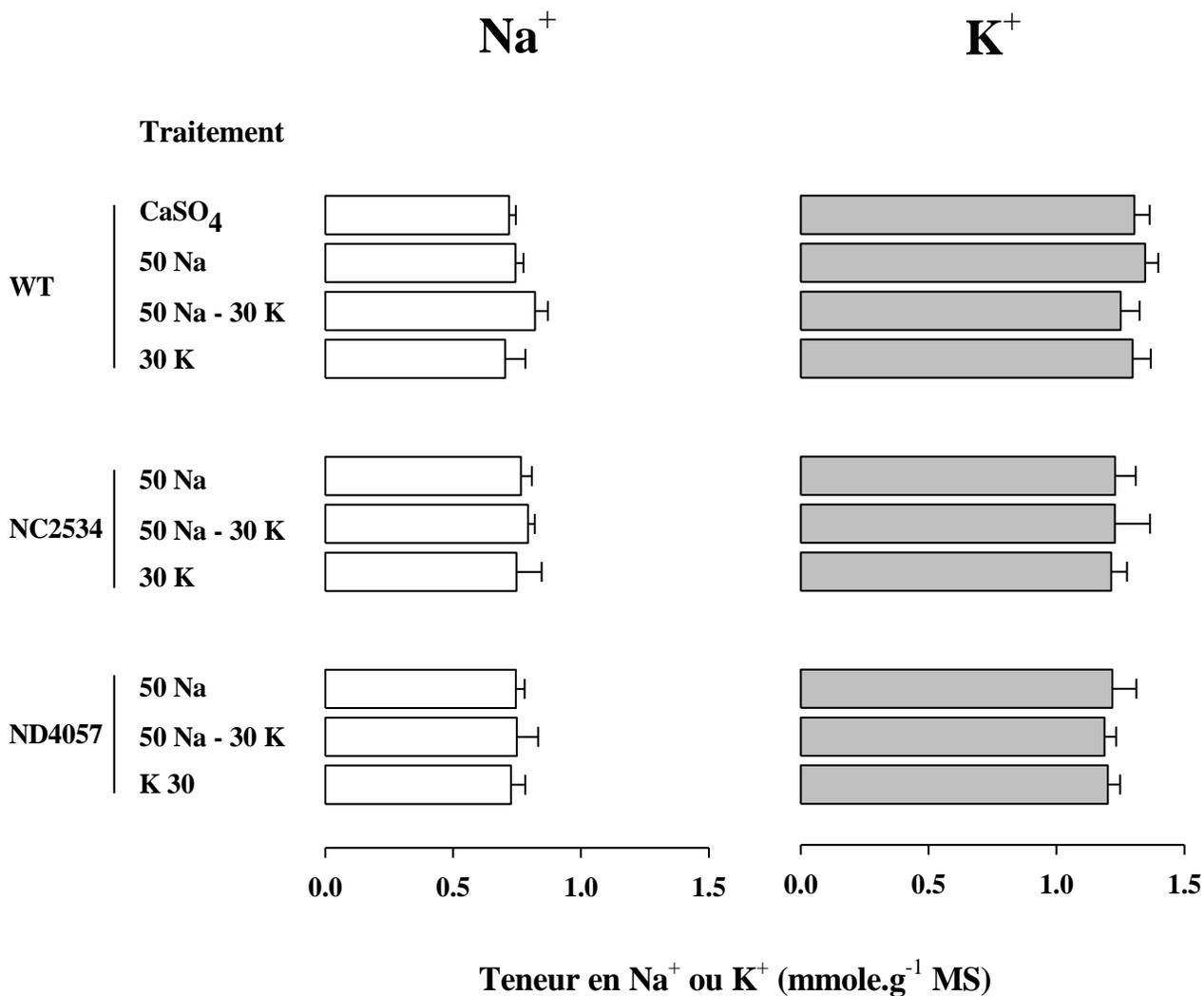


Figure V. 4. Teneurs moyennes en Na^+ et K^+ de racines excisées de plantes de riz de génotype sauvage ou perte de fonction pour *OsHKT1*.

La teneur moyenne en Na^+ (panneau de gauche) ou en K^+ (panneau de droite) dans des racines de riz a été déterminée chez des plantes de génotype sauvage (WT) ou mutant (descendants des plantes NC2534-8-204-2 et ND4057-6-3-49-10). Les plantes âgées de 17 jours ont poussé sur un milieu contenant CaSO_4 1 mM, MES 2 mM, pH=6,0 (BTP). Les racines ont été collectées (traitement " CaSO_4 "), ou excisées, prétraitées pendant 1 h dans leur milieu de culture (Cf. figure V.2), puis placées pendant 2,5 heures dans le milieu de culture complétement par Na_2SO_4 25 μM et/ou K_2SO_4 15 μM (mêmes racines que dans la figure V.2; traitements indiqués à gauche sur la figure). Moyennes \pm ES (n=5).

la solution expérimentale contenant 50 μM de Na^+ seul (figure V.2, panneau A, symbole: \square) montre que les racines de riz de génotype sauvage ont absorbé une partie du sodium contenu dans la solution. L'appauvrissement du milieu est d'abord rapide (entre 0 et 100 min). Ensuite, à partir de 100 min la concentration de Na^+ du milieu tend à se stabiliser. Après 210 minutes, il restait 15 μM de sodium dans la solution. Ce résultat montre qu'en présence de Na^+ seul, les racines de riz cultivés en conditions de carence en potassium sont capables d'absorber le sodium à haute affinité. Toutefois, l'ajout de 30 μM de K^+ à la solution contenant 50 μM de Na^+ a fortement amélioré l'absorption de Na^+ par les racines après 210 minutes, comme le montre la figure (V.2, panneau A, symbole: \circ). En effet, l'appauvrissement de la solution en Na^+ était presque total (après 210 minutes, il ne restait qu'environ 2 μM de Na^+). L'absorption de Na^+ à haute affinité par la racine chez les plantes de génotype sauvage est donc plus efficace en présence de K^+ dans la solution externe.

Il est intéressant de noter, cependant, que l'allure de la courbe d'appauvrissement obtenue en solution mixte de Na^+ et K^+ (figure V.2, panneau A, symbole: \circ) est biphasique. L'épuisement de Na^+ est d'abord plus lent en présence de K^+ (jusqu'à 60 min) puis plus rapide (de 60 à 210 min). En regardant dans cet intervalle de temps la concentration de K^+ dans le milieu, on remarque qu'elle est supérieure à 10 μM pendant la période où l'épuisement de Na^+ dans le milieu est plus lent en présence de K^+ (figure V.2, panneau B, symbole : \circ). Ce ralentissement de l'appauvrissement de la solution en Na^+ rappelle la diminution de la conductance sodique en présence de potassium observée en système hétérologue lorsque la concentration de potassium dépasse 10 μM (voir figure V.1.B).

Le suivi de l'appauvrissement de la solution en potassium (concentration initiale 30 μM K^+) par les racines de génotype sauvage, en absence ou en présence de 50 μM Na^+ (figure V.2, panneau B, symbole : \circ) (figure V.3, panneau B, symbole : \triangle), montre que les racines absorbent également le potassium, quasiment indifféremment de la présence de sodium dans le milieu (absorption légèrement supérieure en présence de K^+). L'appauvrissement en K^+ de la solution est presque total après 210 minutes (concentration résiduelle ≤ 3 μM) indiquant que le transport de K^+ se fait à haute affinité. L'absorption de potassium par les racines peut même avoir lieu en présence de plus faibles concentrations (figure V.2, panneau D, symbole : \square). Dans la solution 50 μM Na^+ , K^+ n'est présent que sous forme de contaminations (0,8 μM). Après 210 minutes il ne reste dans la solution que 0,2 μM de K^+ .

Chez les mutants, l'appauvrissement de la solution en Na^+ par les racines est bien moindre que celui observé chez le génotype sauvage (figure V.2, panneau A). Après 120 minutes, selon la composition de la solution initiale, Na^+ 50 μM ou Na^+ 50 μM + K^+ 30 μM , on obtient, respectivement, une diminution de l'appauvrissement de l'ordre de 50 et 85 % par rapport à celui chez le génotype sauvage. L'inactivation d'*OsHKT1* affecte donc fortement l'absorption de cet ion dans les racines. La diminution de l'appauvrissement est plus important dans la solution contenant Na^+ et K^+ .

De façon très intéressante, la mutation *oshkt1* affecte aussi la voie d'absorption du potassium (figure V.2, panneaux B et D). L'examen de l'appauvrissement de K^+ chez les mutants en présence de 30 μM K^+ dans la solution, montre que l'absorption de K^+ est fortement diminuée en comparaison avec celle du génotype sauvage (appauvrissement après 120 minutes diminué de 30 % en absence de Na^+ dans la solution et de 86% en présence de sodium). L'absorption de K^+ à très faibles concentrations (<1 μM) est aussi affectée par l'inactivation du gène *OsHKT1*, comme le montre la figure (V.2, panneau D). Dans la solution

Na^+ 50 μM où K^+ est présent sous forme de contaminant, l'appauvrissement en K^+ de la solution chez les mutants est deux fois plus faible que chez le génotype sauvage.

Les flux nets racinaires de Na^+ et K^+ ont été calculés à partir des résultats de l'expérience d'appauvrissement du milieu (figure V.2). Après analyse, il apparaît que les flux nets restent le plus souvent des influx (signe positif sur la figure V.3) tout au long de l'expérience, à la fois dans les racines du génotype sauvage et dans les racines des mutants. Toutefois, comme on pouvait s'y attendre, les flux nets racinaires de Na^+ ou K^+ dépendent fortement de la concentration de l'ion dont le flux est mesuré, chez le génotype sauvage et chez les mutants (figure V.3). Les influx nets de K^+ ne montrent pas de saturation que ce soit chez le génotype sauvage ou chez les mutants (concentration de $\text{K}^+ \leq 20 \mu\text{M}$ chez le génotype sauvage, $\leq 26 \mu\text{M}$ chez les mutants). Les influx de Na^+ , chez le génotype sauvage dans le milieu contenant à la fois Na^+ et K^+ , passent par un maximum pour une concentration externe de Na^+ proche de 30 μM . La diminution de l'influx de Na^+ à forte concentration est certainement liée à la plus forte concentration de K^+ dans ces conditions (les deux ions sont absorbés en même temps) comme déjà indiqué plus haut. Dans le milieu sans K^+ ajouté ($\text{K}^+ < 1 \mu\text{M}$), l'influx de Na^+ ne sature que légèrement lorsque la concentration de Na^+ augmente de 15 à 40 μM . Chez les mutants, l'influx de Na^+ sature également légèrement lorsque la concentration de Na^+ augmente de 35 à 45 μM , quelque soit la concentration de K^+ dans le milieu.

La Figure V.2 confirme, par ailleurs, que les seuils d'absorption de Na^+ et K^+ chez les mutants sont bien plus faibles que ceux chez le génotype sauvage et que les seuils d'absorption de Na^+ et K^+ chez le génotype sauvage sont plus faibles lorsque les deux ions sont présents à des concentrations $> 1 \mu\text{M}$ dans la solution.

En conclusion, l'ensemble des résultats présentés dans ce paragraphe indique qu'*OsHKT1* est impliqué dans l'influx de sodium dans la racine de riz dans la gamme des faibles concentrations (micromolaires) ce qui est en accord avec les résultats décrits par Horie et ses collaborateurs (2007) indiquant un rôle prépondérant de ce système dans la racine de riz dans la gamme de concentrations de 1 à 200 μM .

Contrairement aux conclusions d'Horie *et al.*, (2007) sur le rôle d'*OsHKT1* dans l'absorption potassique, nos résultats indiquent clairement que la mutation *oshkt1* affecte, aussi, la voie d'absorption de K^+ à haute affinité dans la racine de riz.

Les résultats rapportés dans les figures (V.2.A) et (V.2.B) indiquent, chez le génotype sauvage, que l'absorption de Na^+ et celle de K^+ sont améliorées en présence des deux cations. Chez les mutants, l'absorption de sodium n'est pas dépendante de la présence de potassium dans le milieu (figure V.2.A). Pour le potassium par contre, l'absorption chez les mutants est plus faible en présence de sodium (figure V.2.B).

V.2.3 La disruption d'*OsHKT1* n'affecte pas les teneurs racinaires de K^+ et Na^+

Pour déterminer si l'altération du processus d'absorption de Na^+ et K^+ chez les mutants affecte l'accumulation de K^+ ou Na^+ dans les racines excisées, la teneur racinaire en Na^+ ou K^+ a été déterminée chez les génotypes mutants et sauvage.

L'expérience a été réalisée sur les racines issues des expériences de mesure de flux nets racinaires (voir paragraphe V.2.2), c'est-à-dire sur des racines cultivées à l'obscurité pendant 7 jours sur un milieu carencé en K^+ puis, ayant séjournées pendant 210 minutes dans trois types

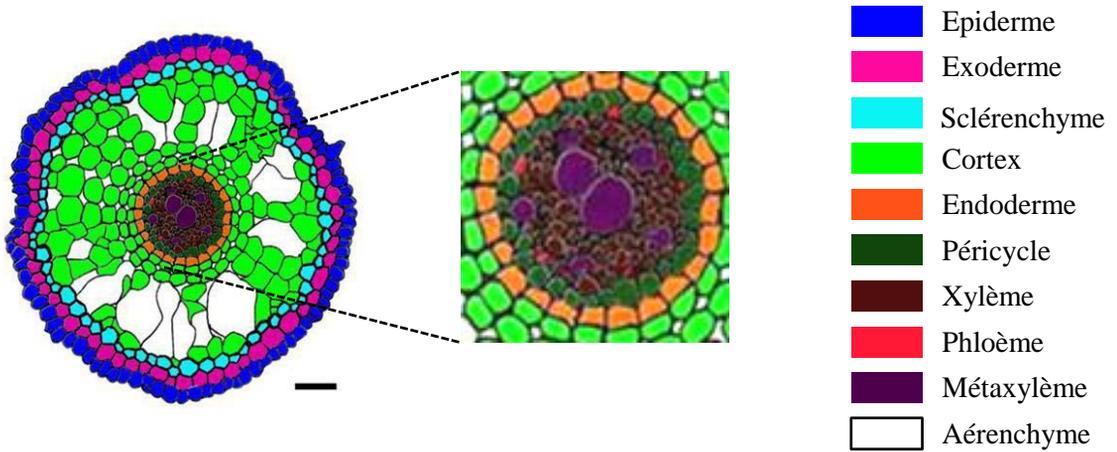
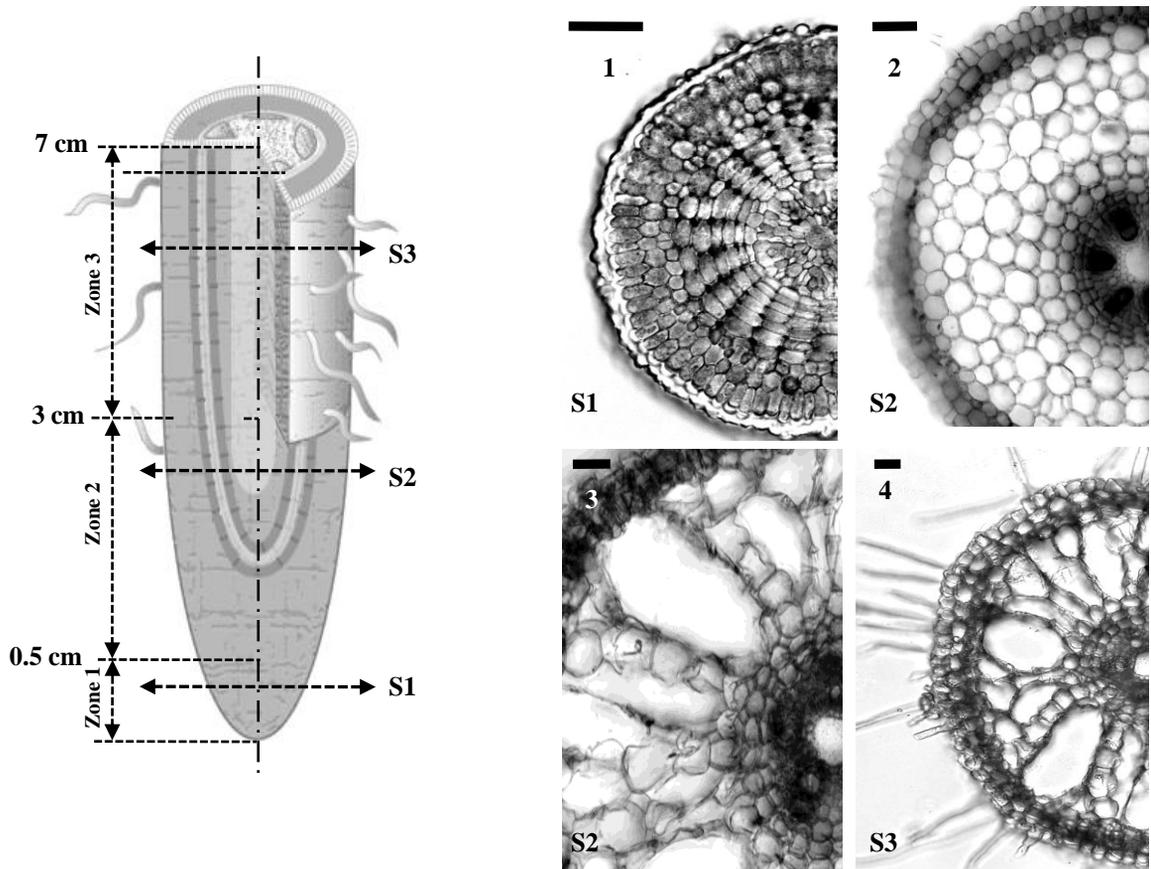
A**B**

Figure V.5. Anatomie radiale de la racine embryonnaire de riz.

A. Représentation schématique d'une section de racine de riz montrant son organisation radiale. Coupe à environ 3 cm de l'apex. **B.** Evolution de l'anatomie radiale de la racine embryonnaire de riz en fonction de la distance à l'apex. Différentes sections ont été réalisées (S1 à S3) dans différentes zones de la racine. Zone 1 (panneau 1): zone apicale (0 à 0,5 cm); zone 2 (panneaux 2 et 3): zone d'élongation (0,5 à 3 cm); zone 3 (panneau 4): zone de maturation (3 à 7 cm). Les racines embryonnaires sont collectées sur des plantes de 7 jours cultivées sur milieu gélosé dans des boîtes de Petri à l'obscurité. Epaisseur de la coupe: 60 μm . Echelle (A) et (B): 50 μm .

de solutions, contenant Na^+ 50 μM , K^+ 30 μM ou les deux cations. Des racines de génotype sauvage, n'ayant pas été utilisées dans les expériences d'influx, ont également été analysées.

Les résultats présentés dans la figure V.4 ne révèlent aucune différence significative de la teneur racinaire en Na^+ ou K^+ entre les plantes de génotypes mutants ou sauvage, et pas d'effet de la composition de la solution expérimentale.

V.2.4 Mesure de potentiel de membrane des cellules corticales de la racine sur des plantes sauvages ou mutants invalidés *oshkt1*: mises au point.

Dans les cellules de plantes ayant subi une carence en potassium, une augmentation de la concentration externe en K^+ dans le domaine des concentrations micromolaires génère des dépolarisations au niveau de la membrane qui ont comme origine l'augmentation de la conductance potassique entrante générée par l'activité de transporteurs de K^+ . Ainsi la mesure des variations du potentiel membranaire (dépolarisations significatives, dans le cas de cations, une entrée d'ions à partir du milieu externe) constitue une méthode possible pour obtenir des indications sur la présence d'activité de transport à haute affinité du potassium.

La détection de couplage des flux de K^+ et Na^+ peut se faire en examinant les dépolarisations générées par K^+ et Na^+ séparément puis la dépolarisation en présence des deux substrats dans la solution. Une réponse synergique en présence des deux ions serait interprétée comme un couplage des flux de K^+ et Na^+ , comme cela a été observé chez l'algue *Chara australis* (McCulloch *et al.*, 1990), mais jamais démontré *in vivo* chez les plantes supérieures.

Dans cette étude, je me suis placé dans des conditions expérimentales similaires de celles des expériences de mesure de flux nets racinaires (*Cf.* § II.3), c'est-à-dire, en utilisant des racines cultivées sur un milieu très similaire, excisées et prétraitées de la même façon que dans les expériences de mesures de flux, et soumises lors de l'expérience à des conditions de concentration de K^+ et Na^+ similaires en présence d'une même base ionique (CaSO_4 1 mM, pH 6,0 MES/BTP). Le dispositif expérimental utilisé dans ces expériences est décrit dans la figure II.9.

L'électrode de mesure est fixe. Un déplacement vertical de la cuve expérimentale permet de modifier la profondeur de la pique, une fois que la microélectrode intracellulaire est implantée dans une cellule. En modifiant la profondeur de la pique, cette électrode peut accéder à différents types cellulaires dans les tissus racinaires. Des études d'anatomie radiale de la racine embryonnaire de riz (racine principale sur laquelle ont été effectuées toutes les mesures) ont été réalisées afin de déterminer la profondeur des différents tissus à partir de l'épiderme, en particulier celle du cortex. A cette fin, des coupes histologiques ont été pratiquées dans différentes zones de racines de plantes de riz sauvage (cv. Nipponbare) cultivées pendant 7 jours, en boîtes de Petri, sur papier filtre en présence d'une solution de CaSO_4 1 mM, pH=6,0 (MES/BTP) (figure V.5).

Ces coupes montrent une anatomie radiale de la racine de riz typique de celle des plantes semi-aquatiques, possédant des tissus spécialisés permettant à la plante de croître dans des conditions où elle est partiellement immergée. Une représentation schématique d'une section transversale de racine est présentée en figure V.5.A. De l'extérieur vers l'intérieur de la racine, on observe l'épiderme, l'exoderme, le sclérenchyme, puis le cortex, l'endoderme et enfin le cylindre central. Ces différentes couches cellulaires sont présentes dans tous les types de racines de riz (Périn *et al.*, 2005). L'exoderme (à environ 50 μm de la surface) joue un rôle de protection dans les vieilles racines lorsque l'épiderme dégénère (Périn *et al.*, 2005). Le cortex (situé entre 50 et 250 μm) est composé de 4 ou 5 couches de cellules. Selon le niveau

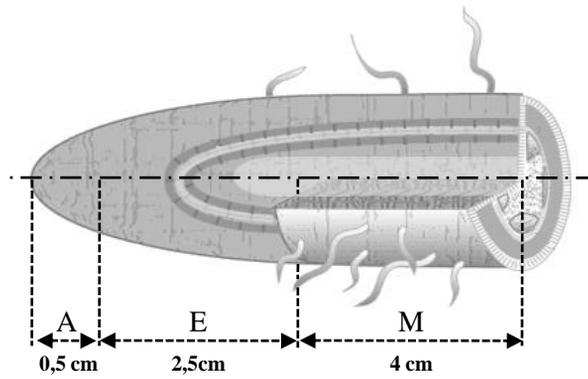
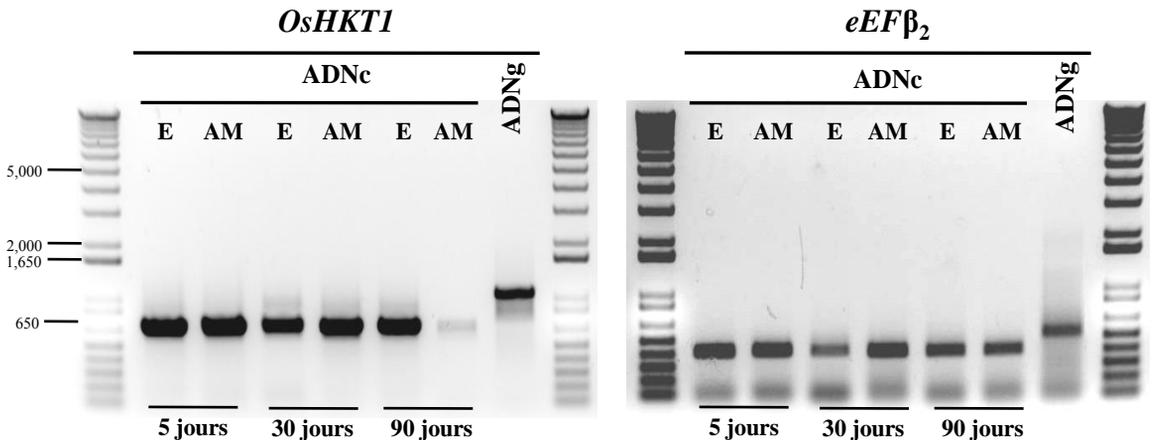
A**B**

Figure V.6. Effet de la durée du traitement de carence potassique sur l'expression d'*OsHKTI* dans la racine de riz.

A. A gauche, représentation schématique des zones d'échantillonnage utilisées pour l'étude de l'expression d'*OsHKTI* dans la racine. Les lettres "A", "E" et "M" indiquent les segments de racines échantillonnés. "E": segment de ~2,5 cm de longueur au niveau de la zone d'élongation cellulaire de la racine embryonnaire. "AM": reste de la racine embryonnaire (zone apicale + zone mature). **B.** Analyse du niveau d'accumulation de transcrits racinaires *OsHKTI* par RT-PCR. Les racines proviennent de plantes de riz sauvages cultivées en boîtes de Petri sur un milieu gélosé carencé en K⁺ contenant CaSO₄ 1 mM, MES 2 mM, pH=6,0 (BTP). L'âge des plantes est indiqué (en jours) en bas des gels. Six premiers puits sur chacun des 2 gels: amplification de rétrotranscrits. Dernier puit dans chacun des deux cycles: amplification d'ADN génomique provenant d'une plante sauvage. Le gel de gauche concerne *OsHKTI*, le gel de droite est un contrôle montrant l'amplification à partir des mêmes échantillons du facteur d'élongation *eEFβ₂* (Cf. figure IV.12). Cent ng de matrice ont été utilisés pour toutes les amplifications. Les PCR ont été faites en même temps (35 cycles effectués). Douze µl de chaque produit d'amplification ont été déposés sur gel.

de différenciation, ces cellules peuvent se transformer en un aerenchyme qui est un tissu comprenant des grandes cavités permettant à l'air de circuler dans le corps de la plante. Sur les coupes présentées en figure V.5.B, on distingue aisément les différents types de cortex (présence d'aerenchyme ou non) observés (sections S2, photos 2 et 3). Ces sections ont été réalisées, sur des plantes différentes mais ayant poussé dans les mêmes conditions, ayant le même âge et à la même distance de l'apex. Les photos n° 2, 3 et 4 présentées dans la figure V.5.B, montrent que le sclérenchyme peut se différencier en un tissu très lignifié. Cependant, on a constaté que la lignification était moins forte sur les coupes de racines n'ayant pas encore développé d'aerenchyme (Cf. les deux sections S2, photos n°2 et 3). L'endoderme se situe à une profondeur entre 250 et 300 μm . Le cadre de Caspary, typique de cette couche cellulaire est visible sur la photo n°3. Les coupes au niveau de l'apex figure (V.5.B), section S1, photo1, montrent une structure très compacte avec un cylindre central peu différencié.

Il ressort de l'analyse de l'anatomie de la racine que la zone 2, représentée sur la figure V.5.B semble mieux convenir aux expériences de mesures de potentiel de membrane de la racine de riz. Grâce aux coupes réalisées j'ai pu me rendre compte qu'il serait plus difficile de planter l'électrode dans la zone 3 ("mature") que dans la zone 2 (en élévation), à cause de la présence dans la zone mature d'un exoderme trop lignifié ainsi que d'un cortex très lacuneux.

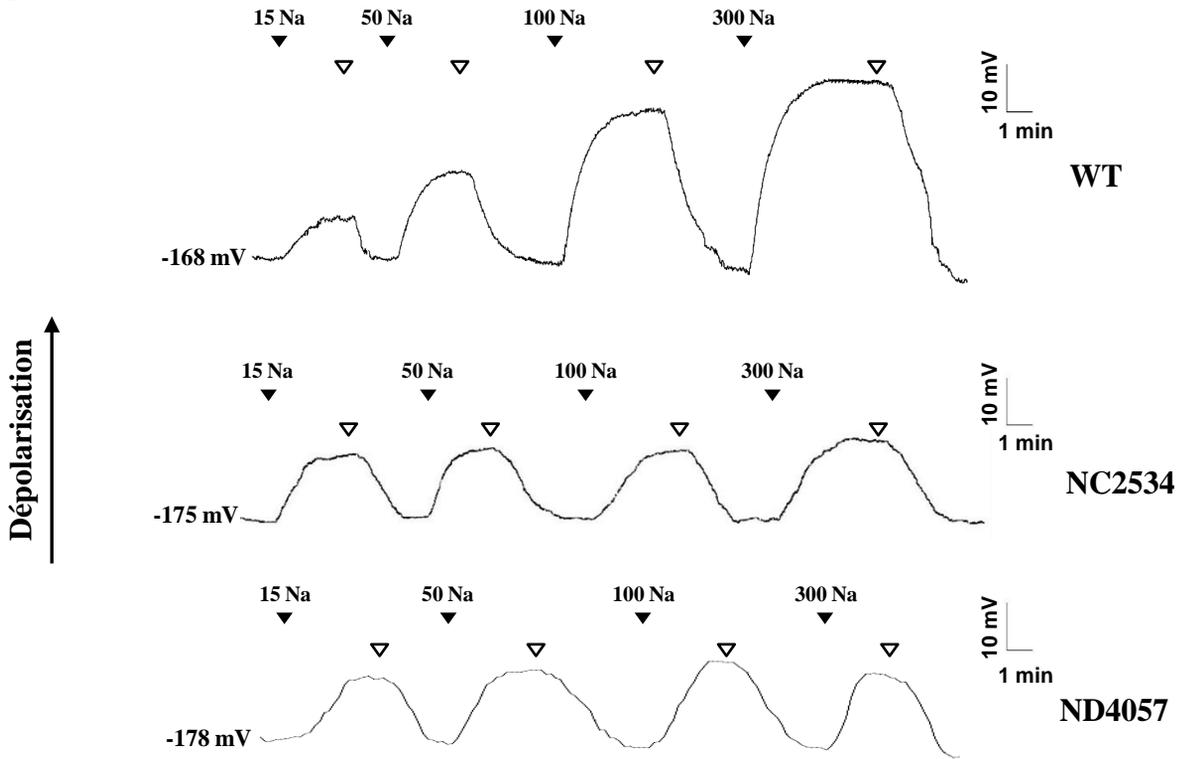
Dans une deuxième étape, j'ai examiné l'expression d'*OsHKT1* dans différentes régions de la racine, dans l'optique de caractériser les réponses électriques dans des cellules où il est exprimé. Une étude réalisée sur des rétrotranscrits *OsHKT1* obtenus à partir d'ARN extraits de racines (Garcia de Blas *et al.* 2003), ont révélé une très forte augmentation de l'accumulation de transcrits (~ 400 fois) dans des conditions de carence sévère en K^+ (pas de K^+ ajouté dans le milieu de culture) pendant toute la croissance de la plante. J'ai examiné, dans nos conditions, l'effet de la durée du traitement de carence potassique ("0 mM" K^+) sur l'expression d'*OsHKT1* dans la racine de riz. Les résultats, présentés dans la figure V.6 confirment qu'*OsHKT1* est bien exprimé dans la racine dans nos conditions expérimentales. D'autre part, ils montrent que dans les racines des plantes jeunes (jusqu'à 30 jours), *OsHKT1* est bien exprimé à la fois dans les régions en élévation et les régions matures. Chez les plantes plus âgées (90 jours) par contre, une forte expression d'*OsHKT1* n'est observée que dans la zone d'élévation.

D'après les données de localisation d'*OsHKT1* réalisées par la technique d'hybridation *in situ* (Cf. Chapitre III), il semble que ce gène soit fortement exprimé dans les cellules corticales et l'épiderme des racines. Ces données sont globalement en accord avec celles obtenues par Horie *et al.* (2007) sur des plantes transgéniques exprimant la GFP sous contrôle du promoteur d'*OsHKT1* (expression dans le cortex et l'endoderme). Finalement, ces données permettent de cibler un tissu pour les mesures de potentiel qui est le cortex racinaire. Ce tissu est assez facile à atteindre car relativement épais (chance accrue de réussir l'implantation d'une électrode dans une cellule). D'après nos coupes il est situé à une profondeur comprise entre 50 et 250 μm .

V.2.4.1 La disruption d'*OsHKT1* affecte la réponse du potentiel de membrane des cellules corticales racinaire à un changement de la concentration externe de Na^+

La variation du potentiel de membrane des cellules corticales de la racine de riz en réponse à un changement de concentration de Na^+ externe a été enregistrée chez des plantes sauvages ou perte de fonction *oshkt1*. Les concentrations de sodium utilisées sont égales, respectivement à 15, 50, 100 et 300 μM , apportées sous forme de Na_2SO_4 .

A



B

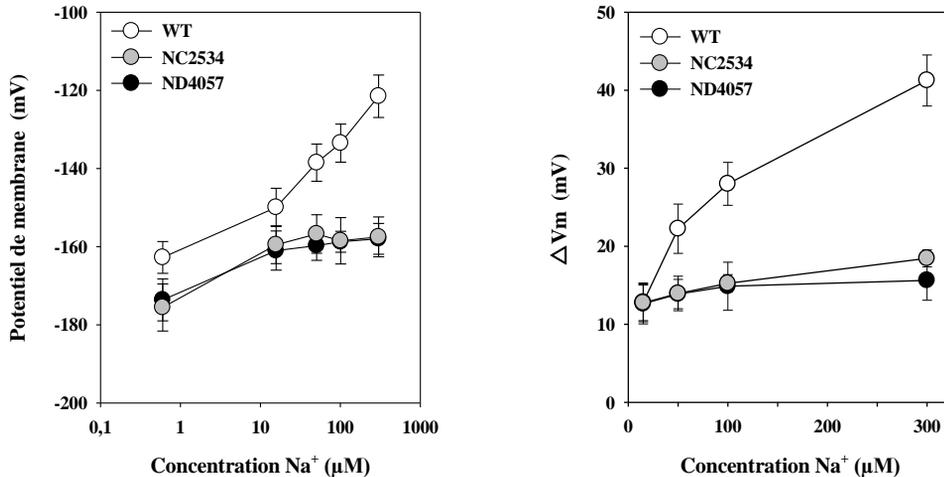


Figure V.7. Variation du potentiel de membrane des cellules corticales de la racine de riz en réponse à un changement de concentration externe de Na^+ chez des plantes de génotype sauvage ou perte de fonction pour le gène *OsHKT1*.

A. Enregistrements de potentiels de membrane dans des cellules corticales de la racine de riz chez une plante de génotype sauvage (WT) (trace du haut) ou chez des plantes de génotype mutant perte de fonction pour le gène *OsHKT1*: lignée NC2534, descendant de la plante 8-204-2 (trace au centre) et lignée ND4057, descendant de la plante 6-3-49-10 (trace du bas). Les traces montrent des modifications de potentiel de l'électrode intracellulaire en réponse à des changements de concentration externe de Na^+ dans le milieu baignant la racine. Les enregistrements débutent dans une solution contenant CaSO_4 1 mM, MES 2 mM, pH=6,0 (BTP) (potentiel en début d'enregistrement indiqué à gauche des traces). Na^+ est ajouté sous forme de Na_2SO_4 (concentration

de Na⁺ indiquée en μM au dessus des traces). Les triangles noirs indiquent les moments où la racine est mise en présence de solutions complémentées en Na⁺, les triangles blancs, les moments de retour à la solution initiale. Les plantes ont poussé en boites de Petri, sur un milieu carencé en K⁺ (CaSO₄ 1 mM, MES 2 mM, pH=6,0 (BTP)) gélosé. Les enregistrements ont été réalisés sur des racines embryonnaires de 11 jours, excisées puis acclimatées pendant 2 heures dans CaSO₄ 1 mM, MES 2 mM, pH=6,0 (BTP). L'électrode intracellulaire est implantée à une profondeur de 75 μm (trace du haut) ou de 82 μm (trace du centre) ou de 81μm (trace du bas) à environ 1,5 cm de l'apex. **B.** Effet de la perte de fonction d'*OsHKT1* sur la polarisation des cellules corticales de la racine en présence de faibles concentrations externes de Na⁺. A gauche: évolution du potentiel de membrane des cellules corticales en fonction de la concentration externe de Na⁺ chez des plantes sauvages ou mutantes. A droite: amplitudes de la dépolarisation induite par l'ajout de Na⁺ dans le bain (dans CaSO₄ 1 mM pH=6,0) en fonction de la concentration externe de Na⁺ additionnée dans le bain. Les plantes mutantes sont du même lot (descendance des mêmes plantes) que dans le panneau (A). Les données sont des moyennes ± ES (n=5 à 7). La contamination en K⁺ dans les solutions est voisine de 0,2 μM. La contamination en Na⁺ dans la solution de CaSO₄ est voisine de 0,5 μM.

La figure V.7.A montre des traces représentatives de potentiels de membrane enregistrés dans les cellules du cortex de racines de riz carencées en potassium chez une plante de génotype sauvage (WT) ou des plantes mutantes *oshkt1* (lignées NC2534 et ND4057).

Toutes les mesures débutent dans la solution CaSO_4 1 mM, MES/BTP 2 mM (pH=6,0), qui est la solution dans laquelle les plantes ont poussé et les racines ont été prétraitées après excision. Elle contient $0,2 \mu\text{M K}^+$ et $0,6 \mu\text{M Na}^+$ en tant que contaminants. Chez le génotype sauvage, le potentiel moyen donné par l'électrode intracellulaire dans cette solution est de $-163 \pm 4,0$ mV. Le changement de la concentration externe de Na^+ dans les solutions, de 15 à 300 μM , entraîne des dépolarisations de la membrane, croissantes avec l'augmentation de la concentration de Na^+ . Les valeurs moyennes de dépolarisations sont comprises entre 13 ± 2 mV (pour un changement de concentration de Na^+ de 0,8 à 15 μM) et 41 ± 3 mV (pour un changement de concentration de 0,8 à 300 μM)(figure V.7.B).

Chez les racines des plantes mutantes, les valeurs de potentiels enregistrées dans la solution de base "sans Na^+ " (CaSO_4 1 mM) sont en moyenne une dizaine de mV plus négatives que celles enregistrées chez les racines de génotype sauvage (-174 ± 5 mV et $-176,6 \pm 6$ mV). Les traces enregistrées sur ces plantes, montrent, aussi, une dépolarisation en réponse au changement de la concentration de Na^+ externe. Cependant, l'amplitude de la dépolarisation est indépendante de la concentration de sodium appliquée entre 15 et 300 μM , contrairement à ce qui est observé chez le génotype sauvage (Figure V.7.A). Cette dépolarisation est de plus faible amplitude (en moyenne 13 mV; figure V.7.B).

Les valeurs de la polarisation de la membrane à l'état stationnaire ont été tracées en fonction de la concentration externe de Na^+ (figure V.7.B, panneau gauche) et ont révélé, de façon intéressante, que la polarisation générale de la membrane est plus négative chez les mutants que chez le génotype sauvage (de 10 à 18 mV en fonction de la concentration de Na^+). Cet écart de polarisation est d'autant plus important que la concentration externe de Na^+ est importante.

Le panneau à droite de la figure V.7.B montre l'évolution de la dépolarisation induite par l'ajout de Na^+ en fonction de la concentration externe de Na^+ . Chez le génotype sauvage, l'amplitude de la dépolarisation montre un début de saturation lorsque la concentration externe de Na^+ augmente jusqu'à 300 μM . Au contraire, comme indiqué plus haut, chez les mutants, l'amplitude de la dépolarisation sature déjà en ajoutant 15 μM de Na^+ . Afin de déterminer la dépolarisation liée à l'activité d'*OsHKT1*, j'ai soustrait les valeurs de dépolarisation enregistrées chez les mutants de celles enregistrées chez le génotype sauvage. L'ajustement par une fonction hyperbolique des amplitudes de dépolarisations *OsHKT1*-dépendantes en fonction de la concentration aboutit à une valeur de *Km* de 246 μM de Na^+ , ce qui est proche de la valeur de *Km* déterminée sur la conductance sodique d'*OsHKT1* dans les ovocytes de xénope (150 μM ; Chapitre III, figure 4.B).

La diminution de la dépolarisation chez les mutants par rapport aux plantes de génotype sauvage lors d'ajouts de 15 à 300 μM de Na^+ s'interprète le plus logiquement comme une diminution des influx de sodium à haute affinité dans la racine de riz. La différence de polarisation générale des racines, avec les mutants hyperpolarisés par rapport aux plantes de génotype sauvage quelque soit la concentration de sodium dans la solution (figure V.7.B), appuie également l'hypothèse de la perte chez les mutants d'un système d'influx de Na^+ .

L'ensemble de ces résultats indique qu'*OsHKT1* est directement impliqué dans l'absorption de sodium par les cellules corticales de la racine. Ceci est en accord avec les

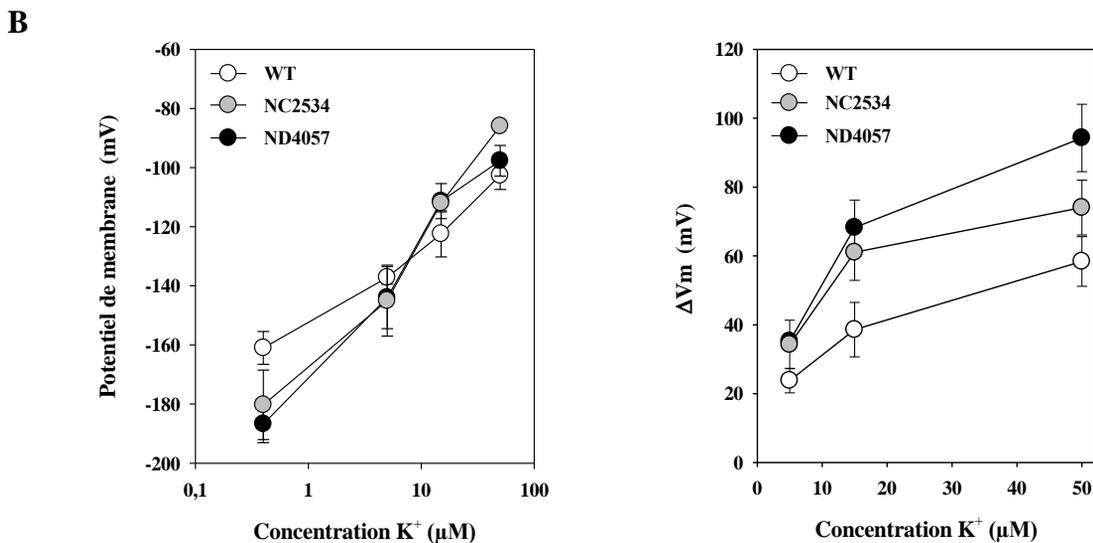
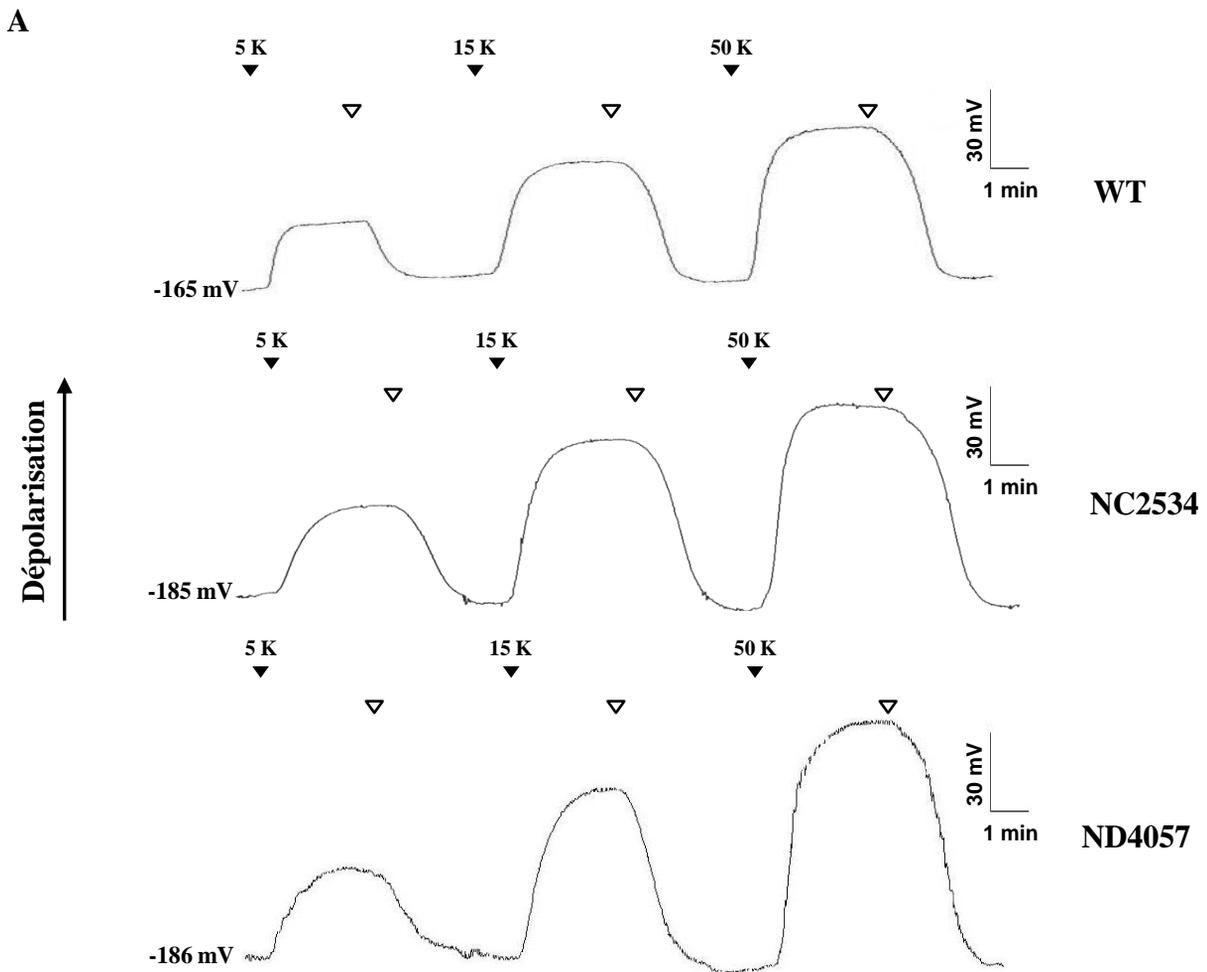


Figure V.8. Variation du potentiel de membrane des cellules corticales de la racine de riz en réponse à un changement de la concentration externe de K^+ chez des plantes de génotype sauvage ou perte de fonction pour le gène *OsHKT1*.

A. Enregistrements de potentiels de membrane dans des cellules corticales de la racine de riz chez une plante de génotype sauvage (WT) (trace du haut) ou chez des plantes de génotype mutant perte de fonction pour le gène *OsHKT1*: lignée NC2534, descendant de la plante 8-204-2 (trace du centre) et lignée ND4057, descendant de la plante 6-3-49-10 (trace du bas). Les traces montrent

des modifications de potentiel de l'électrode intracellulaire en réponse à des changements de concentration externe de K^+ dans le milieu baignant la racine. Les conditions de culture, de préparation des racines et d'enregistrement sont les mêmes que celles indiquées dans la figure (V.7). L'électrode intracellulaire est implantée à une profondeur de 75 μm (trace du haut) ou à 53 μm (trace du centre) ou à 81 μm (trace du bas). K^+ est ajouté sous forme de K_2SO_4 . **B.** Effet de la perte de fonction d'*OsHKT1* sur la polarisation des cellules corticales de la racine en présence de faibles concentrations externes de K^+ . A gauche: évolution du potentiel de membrane des cellules corticales en fonction de la concentration externe de K^+ chez des plantes sauvages ou mutantes. A droite: amplitudes de la dépolarisation induite par l'ajout de K^+ additionnée dans le bain (dans $CaSO_4$ 1 mM pH=6,0) en fonction de la concentration externe de K^+ additionnée dans le bain. Les plantes mutantes sont du même lot (descendance des mêmes plantes) que dans le panneau (A). Les plantes utilisées sont âgées 12 jours. Les données sont des moyennes \pm ES (n=5). Les contaminations en Na^+ et K^+ dans les solutions sont voisines de 0,4 μM .

observations faites par Horie *et al.*, (2007) à partir d'expériences de mesure d'influx unidirectionnel dans des racines de géotypes sauvage ou mutants utilisant $^{22}\text{Na}^+$, qui avaient indiqué que ce système de transport est le système majeur d'influx de sodium à haute affinité de la racine de riz dans des conditions de culture de carence en potassium .

De façon intéressante, une régression linéaire sur les valeurs de potentiel tracées en fonction du logarithmique de la concentration de Na^+ , de 15 à 300 μM , (figure V.7.B panneau à gauche) donne une pente égale à 22 mV/décade de concentration de Na^+ . Bien que les variations de potentiel de membrane soient difficiles à interpréter quantitativement, il est tentant de rapprocher cette valeur de celle de la pente théorique d'un système fonctionnant en symport avec une stœchiométrie 1:1 (29 mV /décade de $[\text{Na}^+]$). Il faut rappeler que dans les solutions, 0,2 μM de K^+ sont également présents en tant que contaminants. Ce résultat pourrait donc coïncider avec les observations faites en système hétérologue où *OsHKT1* se comporte comme un symport $\text{Na}^+\text{-K}^+$ dans cette gamme de concentrations (Chapitre III, figure 8.D).

V.2.4.2 Effet de la disruption d'*OsHKT1* sur le potentiel de membrane des cellules corticales de la racine en réponse à un changement de concentration externe de K^+ , présent "seul" dans la solution

Une expérience similaire à celle décrite dans le paragraphe précédent a été réalisée pour tester l'effet d'un changement de la concentration de K^+ externe sur le potentiel de membrane des cellules corticales de la racine de riz chez des plantes de géotype sauvages ou perte de fonction *oshkt1*. Les concentrations de potassium utilisées sont égales respectivement à 5, 15 et 50 μM , apportées sous forme de K_2SO_4 , la concentration externe de Na^+ (contamination) est égale à 0,4 μM . Les racines ont été cultivées et prétraitées comme précédemment.

Dans ces expériences, les enregistrements de potentiel débutent également dans la solution CaSO_4 1 mM (pH=6,0). Les polarisations des cellules corticales enregistrées dans cette solution sont proches de celles rapportées dans l'expérience précédente; l'hyperpolarisation des mutants par rapport au géotype sauvage est de nouveau observée (potentiel moyen chez le géotype sauvage, $-161 \pm 5,5$ mV; Chez les mutants, -180 ± 12 mV et -187 ± 6 mV).

L'augmentation de la concentration externe de K^+ de 0,2 μM à 5, 15 ou 50 μM entraîne, chez le géotype sauvage comme chez les mutants, des dépolarisations, croissantes avec l'augmentation de la concentration externe de K^+ (figure V.8.A). Ces dépolarisations sont plus importantes que celles enregistrées suite à l'ajout de Na^+ dans la solution (*e.g.*, $24 \pm 3,5$ mV chez le géotype sauvage lorsque la concentration de K^+ externe augmente de 0,2 à 5 μM ; 58 ± 7 mV lorsqu'elle augmente de 0,2 à 50 μM) (figure V.8.B, panneau de droite). Ces dépolarisations sont d'autre part plus importantes chez les mutants que chez le géotype sauvage (30 à 40% plus importantes; figure V.8.B, panneau de droite). Toutefois, l'analyse de la polarisation de la membrane à l'état stationnaire en fonction de la concentration externe de K^+ (figure V.8.B, panneau de gauche) indique qu'une différence significative de polarisation entre le géotype sauvage et les mutants n'existe qu'à très faible concentration externe de K^+ (0,2 μM) (confirmé par le test statistique de Wilcoxon "rank-sum" au seuil 5%).

Le panneau de droite de la figure V.8.B montre l'évolution des valeurs des dépolarisations de la membrane des cellules corticales en fonction de la concentration externe de K^+ (concentration de départ 0,2 μM). Chez le sauvage comme chez les mutants, l'évolution de la dépolarisation suit une cinétique hyperbolique. L'ajustement donne un *Km* de 11 ± 2 μM

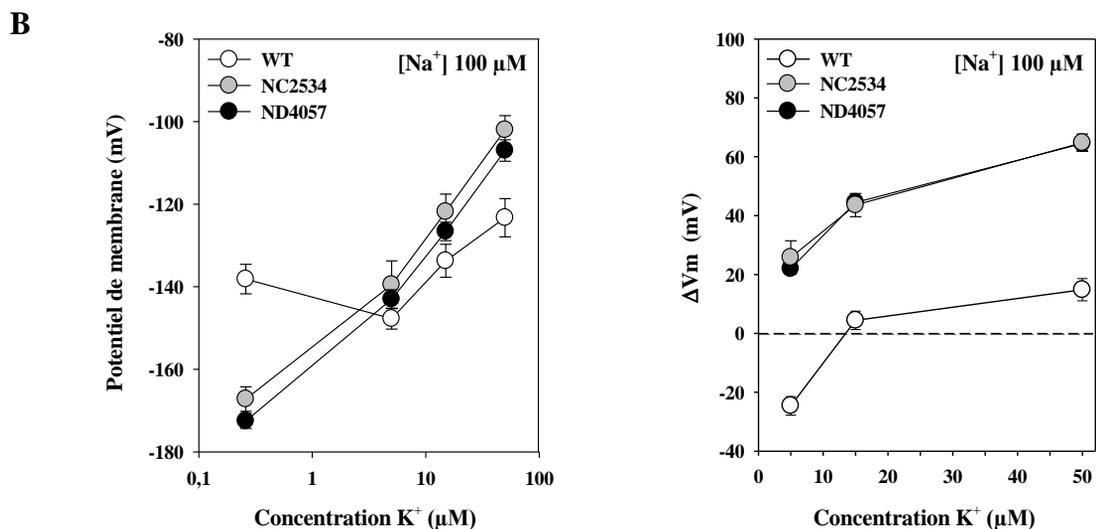
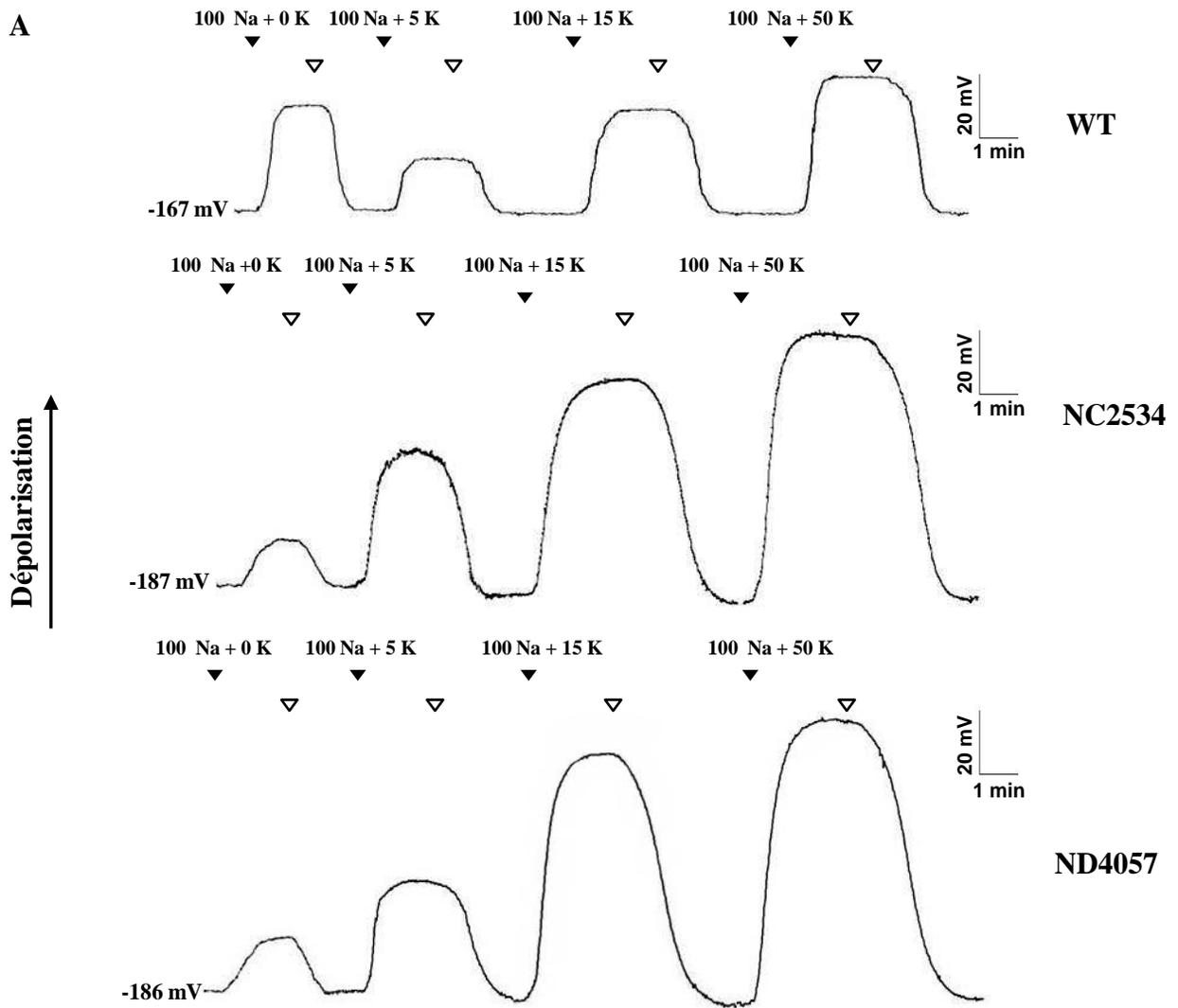


Figure V. 9. Variation du potentiel de membrane des cellules corticales de la racine de riz en réponse à un changement de concentration externe de K^+ en présence de Na^+ chez des plantes de génotype sauvage ou perte de fonction pour le gène *OsHKT1*.

A. Enregistrements de potentiels de membrane dans des cellules corticales de la racine de riz chez une plante de génotype sauvage (WT) (trace du haut) ou chez des plantes perte de fonction pour le

gène *OsHKT1*: lignée NC2534, descendant de la plante 8-204-2 (trace du centre) et lignée ND4057, descendant de la plante 6-3-49-10 (trace du bas). La solution initiale contient CaSO_4 1 mM, $\text{pH}=6,0$. Les autres solutions expérimentales contiennent (dans CaSO_4 1 mM $\text{pH}=6,0$) une concentration fixe de Na^+ (100 μM) et une concentration variable de K^+ (5 à 50 μM). Na^+ et K^+ sont ajoutés sous forme de Na_2SO_4 ou K_2SO_4 . Les traces montrent des modifications de potentiel de l'électrode intracellulaire en réponse à des changements de concentration externe de K^+ dans le milieu baignant la racine. Les conditions de culture, de préparation des racines et d'enregistrement sont les mêmes que celles indiquées dans la figure (V.7). L'électrode intracellulaire est implantée à une profondeur de 89 μm (trace du haut) ou de 53 μm (trace du centre) ou de 62 μm (trace du bas). **B.** Effet de la perte de fonction d'*OsHKT1* sur la polarisation des cellules corticales de la racine en présence de 100 μM Na^+ et des concentrations variables de K^+ externe. A gauche: évolution du potentiel de membrane des cellules corticales en fonction de la concentration externe de K^+ chez des plantes sauvages ou mutantes. A droite: amplitudes de la dépolarisation induite par l'ajout de K^+ en présence de Na_2SO_4 50 μM . Les plantes mutantes sont du même lot (descendance des mêmes plantes) que dans le panneau (A). Les plantes utilisées sont âgées de 10 à 12 jours. Les données sont des moyennes \pm ES (n=5 à 7). Les contaminations en K^+ dans les solutions sont voisines de 0,26 μM .

chez le génotype sauvage et $9 \pm 2 \mu\text{M}$ chez les mutants lorsque l'ajustement est effectué sur la moyenne des 2 lignées.

V.2.4.3 Variation du potentiel de membrane des cellules corticales racinaires de plantes de riz de génotype sauvage ou mutants invalidés *oshkt1* en présence de Na^+ et K^+ dans le milieu

J'ai décrit, dans les expériences précédentes, l'effet de Na^+ ou K^+ présents "seuls" dans la solution expérimentale sur la polarisation de la membrane des cellules corticales dans la racine de plantes de riz de génotype sauvage ou mutant invalidé *oshkt1* (figures V.7 et V.8). Dans les expériences qui suivent, j'ai examiné l'effet de la variation de l'un des deux ions Na^+ ou K^+ sur le potentiel de membrane en présence de l'autre ion (K^+ ou Na^+) à une concentration fixe non négligeable.

- Na^+ fixe et K^+ variable

La concentration de sodium, apporté sous forme de Na_2SO_4 , a été fixée à $100 \mu\text{M}$. J'ai effectué des enregistrements du potentiel de membrane en variant la concentration de K^+ , apporté sous forme de K_2SO_4 , de 5 à $50 \mu\text{M}$. Les racines ont été cultivées et prétraitées comme dans les expériences précédentes. La figure V.9.A montre des traces de potentiels de membrane enregistrés dans les cellules du cortex racinaire de riz chez le génotype sauvage ou chez des plantes mutantes *oshkt1*.

Comme dans les deux expériences précédentes, les enregistrements de potentiel de membrane débutent dans la solution de CaSO_4 1 mM ($\text{pH}=6,0$; Concentration de potassium et sodium contaminants, $0,26$ et $0,35 \mu\text{M}$, respectivement). L'hyperpolarisation dans cette solution des mutants (~ 15 à 20 mV) par rapport au génotype sauvage est comme précédemment observée.

L'analyse de l'évolution du potentiel de membrane chez le génotype sauvage (figure V.9.A, trace du haut) montre d'abord, lors de l'apport de $100 \mu\text{M}$ de Na^+ dans la solution expérimentale en "absence" de potassium ($0,26 \mu\text{M}$), une dépolarisation de $29 \pm 3 \text{ mV}$ ($28 \pm 3 \text{ mV}$ dans l'expérience de la figure V.7 dans les mêmes conditions). De façon intéressante, l'ajout supplémentaire de $5 \mu\text{M}$ de K^+ dans la solution expérimentale, entraîne une hyperpolarisation du potentiel de membrane d'une dizaine de millivolts (figure V.7.B). En revanche, l'addition de 15 ou $50 \mu\text{M}$ de K^+ en présence de $100 \mu\text{M}$ de sodium entraîne des dépolarisations du potentiel égales respectivement à $4 \pm 3 \text{ mV}$ et $15 \pm 4 \text{ mV}$. Finalement, si cette expérience est comparée à celle de la figure V.8 où les changements de concentration de K^+ sont effectués en présence d'une base de Na^+ très faible ($0,4 \mu\text{M}$), il est constaté que les dépolarisations (par rapport au potentiel dans le milieu "sans" K^+ , CaSO_4) enregistrées en présence d'une base de $100 \mu\text{M}$ de Na^+ ne sont pas plus importantes (*i.e.*, pas d'effet additif de Na^+ et K^+ sur l'amplitude des dépolarisations).

Chez les racines des mutants (figure V.9.A, traces au centre et en bas), l'apport de Na^+ $100 \mu\text{M}$ à la solution initiale de CaSO_4 entraîne seulement une faible dépolarisation des cellules corticales, comme dans les expériences de la figure V.7. L'apport supplémentaire de K^+ $5 \mu\text{M}$, contrairement à ce qui est observé chez le génotype sauvage, n'hyperpolarise pas mais dépolarise la membrane. L'ajout de 15 ou $50 \mu\text{M}$ de K^+ en présence de $100 \mu\text{M}$ de Na^+ entraîne des dépolarisations plus importantes. L'amplitude des dépolarisations induites par l'ajout de K^+ en présence d'une base de $100 \mu\text{M}$ de Na^+ , comme en présence d'une faible base de Na^+ ($0,4 \mu\text{M}$), est plus importante chez les mutants que chez le génotype sauvage (figure V.9.B, panneau de droite). Enfin, l'analyse de la variation du potentiel de membrane lors des

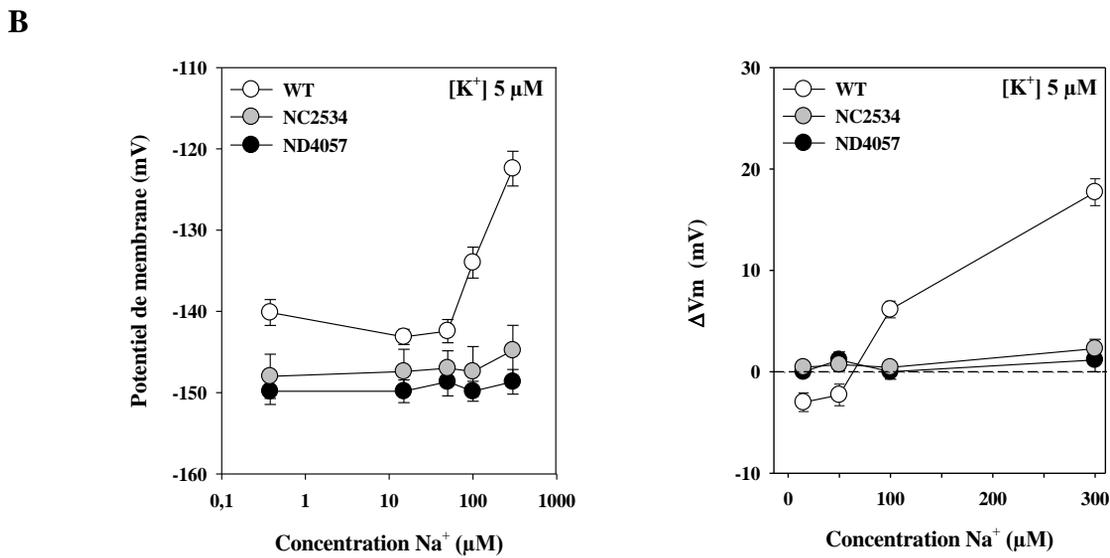
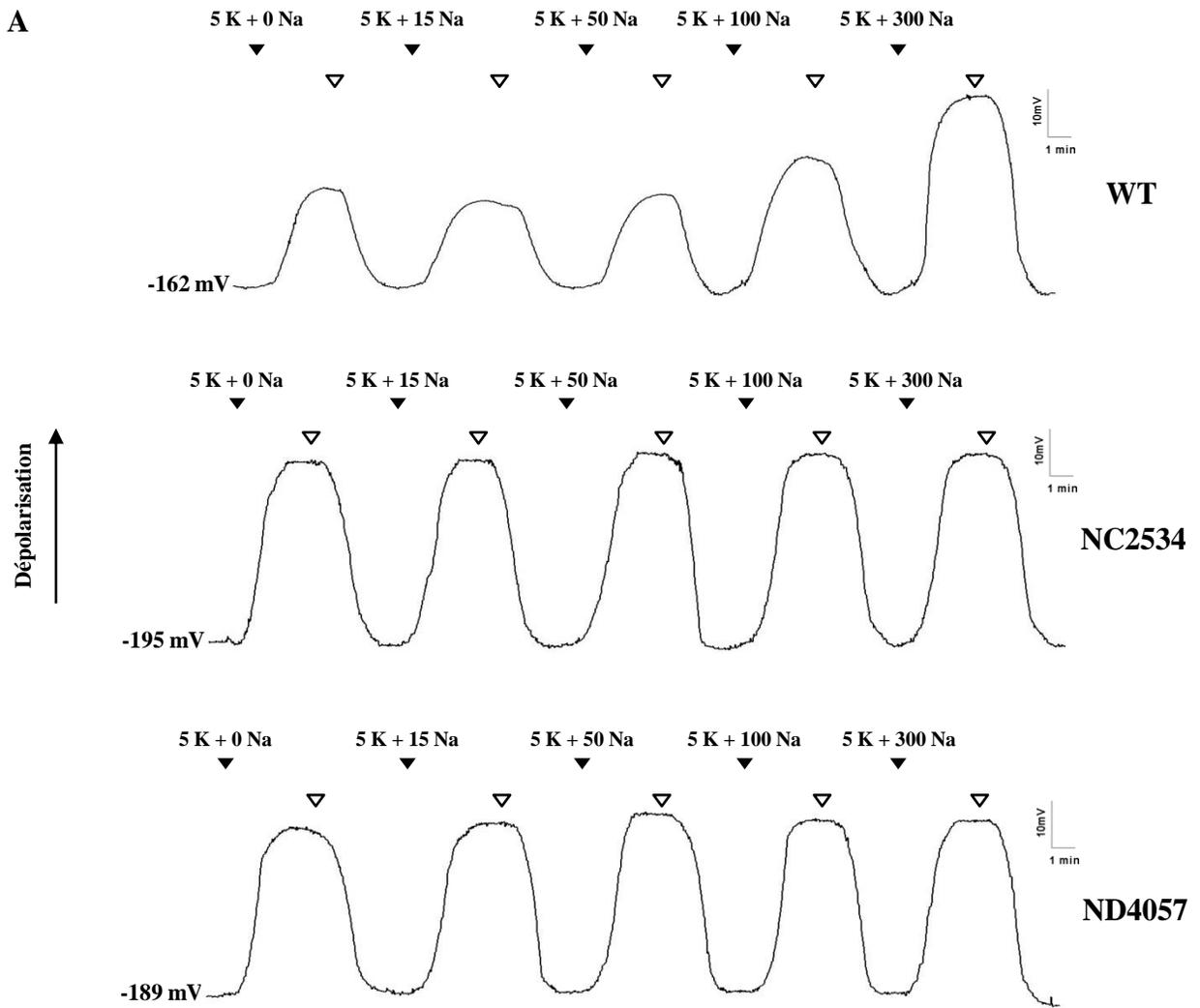


Figure V. 10. Variation du potentiel de membrane des cellules corticales de la racine de riz en réponse à un changement de cocentration externe de Na^+ en présence de K^+ chez des plantes sauvages ou perte de fonction pour le gène *OsHKT1*.

A. Enregistrements de potentiels de membrane dans des cellules corticales de la racine de riz chez

une plante sauvage (WT) (trace du haut) ou chez des plantes mutantes perte de fonction pour le gène *OsHKT1*: lignée NC2534, descendant de la plante 8-204-2 (trace du centre) et lignée ND4057, descendant de la plante 6-3-49-10 (trace du bas). La solution initiale contient CaSO_4 1 mM, pH 6. Les autres solutions expérimentales contiennent une concentration fixe de K^+ (5 μM) et une concentration variable de Na^+ (15 à 300 μM), Na^+ et K^+ étant ajoutés sous forme de Na_2SO_4 ou K_2SO_4 respectivement. Les traces montrent des modifications de potentiel de l'électrode intracellulaire en réponse à des changements de concentration externe de Na^+ dans le milieu baignant la racine. Les conditions de culture, de préparation des racines et d'enregistrement sont les mêmes que celles indiquées dans la figure (V.7). L'électrode intracellulaire est implantée à une profondeur de 66 μm (trace du haut) ou de 52 μm (trace du centre) ou de 31 μm (trace du bas). **B.** Effet de la perte de fonction d'*OsHKT1* sur la polarisation des cellules corticales de la racine en présence de 5 μM K^+ et des concentrations variables de K^+ externe. A gauche: évolution du potentiel de membrane des cellules corticales en fonction de la concentration externe de K^+ chez des plantes sauvages ou mutantes. A droite: amplitudes de la dépolarisation induite par l'ajout de Na^+ en présence de K_2SO_4 2,5 μM . Les plantes mutantes sont du même lot (descendance des mêmes plantes) que dans le panneau (A). Les plantes utilisées sont âgées de 10 à 12 jours. Les données sont des moyennes \pm erreur standard (n= 5 à 7). Les contaminations en Na^+ dans les solutions sont voisines de 0,4 μM .

changements de concentration de K^+ , en présence de $100 \mu M$ de Na^+ (figure V.9.B, panneau de gauche) montre une amplitude de variation bien plus faible chez le génotype sauvage que chez les mutants (amplitude maximale de variation ~ 25 mV et ~ 65 mV, respectivement). La racine du génotype sauvage est moins polarisée, d'une trentaine de millivolts, en présence d'une faible concentration de K^+ ($0,26 \mu M$), et plus polarisée d'une vingtaine de millivolts en présence de $50 \mu M$ de K^+ .

L'hyperpolarisation de la membrane chez le génotype sauvage lors d'une augmentation de la concentration externe de K^+ de $0,26$ à $5 \mu M$, en présence de $100 \mu M$ Na^+ , contrairement à la dépolarisation enregistrée chez les mutants dans les mêmes conditions, pourrait traduire une inhibition de l'influx de sodium par le potassium externe à travers *OsHKT1*. Il est intéressant de noter qu'en système hétérologue, l'ajout de K^+ , quoiqu'à une concentration légèrement supérieure ($>10 \mu M$), inhibe le courant à travers *OsHKT1* (figure V.1).

En résumé, les résultats des deux expériences où l'effet de K^+ sur la polarisation membranaire est examinée montrent qu'il y a une absorption du potassium à très haute affinité chez le génotype sauvage et chez le mutant, *in vivo*, au niveau des cellules corticales de la racine de riz. Cependant, la disruption d'*OsHKT1* affecte le potentiel de membrane des cellules corticales racinaires en augmentant sa sensibilité à la concentration externe de K^+ . L'écart entre génotype sauvage et mutants est d'autant plus marqué que la base de Na^+ dans le milieu est plus importante (Cf. panneaux de gauche des figures V.8.B et V.9.B). D'autre part, l'hyperpolarisation de la membrane lors de l'augmentation de la concentration externe de K^+ à $5 \mu M$ en présence de $100 \mu M$ de Na^+ , chez le génotype sauvage, suggère fortement l'existence d'une dépendance du transport de sodium à la concentration externe de potassium chez le génotype sauvage.

- K^+ fixe et Na^+ variable

Dans cette expérience, similaire à la précédente, j'ai testé l'effet de la variation de la concentration externe de Na^+ de 15 à $300 \mu M$, sur le potentiel de membrane en présence d'une concentration fixe de K^+ , $5 \mu M$, apporté dans la solution sous forme de K_2SO_4 . Le choix d'une concentration faible de K^+ est liée au rôle inhibiteur de K^+ à une concentration supérieure à $10 \mu M$ observé sur le courant à travers *OsHKT1* dans l'ovocyte (Figure V.1), ainsi que sur les flux de Na^+ enregistrés *in vivo* dans les racines (figures V.2 et V.3).

Comme dans les trois expériences précédentes, les enregistrements de potentiel de membrane des cellules corticales débutent dans la solution de $CaSO_4$ 1 mM, $0,1 \mu M$ K^+ , $0,4 \mu M$ Na^+) (figure V.10.A). Les potentiels dans cette solutions sont très proches de ceux rapportés dans les expériences précédentes (mutants au moins 25 mV plus hyperpolarisés que le génotype sauvage).

Chez le sauvage, l'ajout de potassium seul ($5 \mu M$ K^+) entraîne une dépolarisation de 24 ± 3 mV, comme déjà observé dans l'expérience de la figure V.8 ($24 \pm 3,5$ mV). Un ajout supplémentaire de Na^+ , à une concentration de 15 ou $50 \mu M$, entraîne une légère hyperpolarisation de la membrane. Comme déjà discuté à propos de l'expérience précédente, cette hyperpolarisation indique probablement une diminution de l'influx de K^+ . A nouveau donc, cette expérience suggère l'existence d'interactions entre le transport des deux cations Na^+ et K^+ dans la racine du génotype sauvage. Lors de l'ajout de plus fortes concentrations de Na^+ , 100 ou $300 \mu M$ au contraire, de fortes dépolarisations de la membrane sont observées (Figure V.10.A trace du haut, V.10.B panneau de gauche).

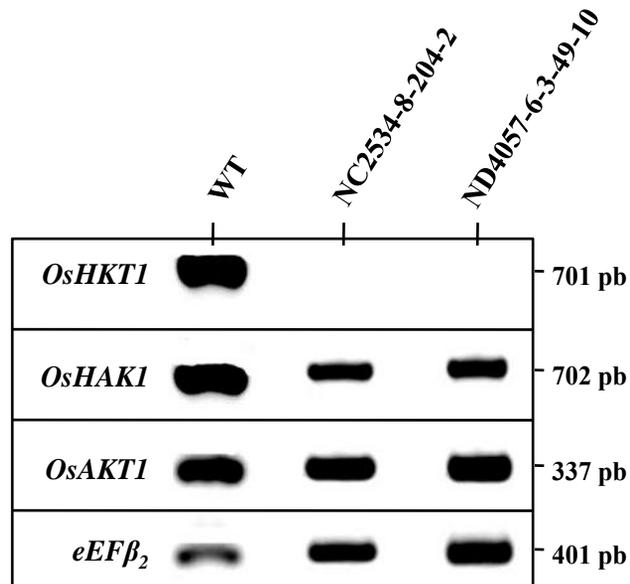


Figure V.11. Analyse de l'expression de systèmes d'absorption de potassium dans la racine de riz de génotype sauvage ou mutant perte de fonction pour le gène *OsHKT1* en conditions de carence potassique.

L'analyse de l'expression des gènes *OsHKT1*, *OsHAK1*, *OsAKT1* et du facteur d'élongation *eEFβ₂* a été réalisée sur des rétrotranscrits racinaires de plantes de riz de génotype sauvage ou mutants invalidées dans *OsHKT1* cultivées en boîtes de Petri pendant 10 jours sur un milieu carencé en K^+ contenant $CaSO_4$ 1 mM, MES 2 mM, pH 6,0 (BTP). Les transcrits ont été traités à la DNase et dosés par fluométrie avant rétrotranscription. L'amplification par PCR des ADNc a été effectuée à partir de 100 ng de matrice. Toutes les PCR ont été faites en parallèle. Les produits de PCR ont été prélevés après 35 cycles. Douze μ l de produits ont été déposés sur gel pour tous les échantillons. La taille des bandes attendues (ADNc) est indiquée à droite du panneau en pb. Les amorces utilisées sont:

OsHKT1, Pcs/ P3as; *OsHAK1*, *OsHAK1P1*: 5'-GAGGGGCAGGTGTACATCC-3'/*OsHAK1P2*: 5'-GGCATCGATCATCTCTTGATG-3'; *OsAKT1*, *OsAKT1P1F*: 5'-GAGACGGCGATCATCTTGT-3' *OsAKT1P1R*: 5'-CAGCAGATCAACTTGCCAAC-3', *eEFβ₂*, Pcsβ₂/Pcasβ₂.

Chez les mutants, l'ajout de K^+ seul dépolarise fortement la membrane (~ 40 mV), comme déjà observé dans les expériences de la figure V.8 (figure V.10.A, traces du centre et du bas). L'ajout supplémentaire de Na^+ , jusqu'à $300 \mu M$, ne dépolarise pas plus la membrane (figures V.10.A et V.10.B).

Enfin, la comparaison des potentiels de membrane enregistrés chez le génotype sauvage et chez les mutants montre que dans toutes les conditions de concentration de Na^+ , à base fixe de K^+ $5 \mu M$, les mutants sont plus hyperpolarisés que le génotype sauvage d'au moins 10 mV (figure V.10.B panneau de gauche). L'écart de polarisation entre les génotypes sauvage et mutants dépend toutefois de la concentration externe de Na^+ (plus important à forte concentration, 100 ou $300 \mu M$). Il est intéressant de noter qu'une hyperpolarisation des mutants par rapport au génotype sauvage pour toutes les concentrations de Na^+ avait déjà été observée en présence d'une base de K^+ plus faible ($0,2 \mu M$, figure V.7).

V.2.5 Analyse de l'expression de différents systèmes de transports de K^+ dans la racine de riz

Une étude de l'expression de systèmes de transports de K^+ dans la racine de riz a été réalisée par RT-PCR sur des rétrotranscrits provenant de plantes de génotypes sauvage ou mutant *oshkt1*. Les plantes sauvages ou mutantes ont été cultivées en conditions de carence en K^+ de la même manière que les plantes utilisées pour les expériences d'électrophysiologie endocellulaire. Cette étude d'expression a porté sur deux systèmes supposés fortement impliqués dans l'absorption potassique dans la racine de riz, *OsAKT1* et *OsHAK1*, en plus d'*OsHKT1*.

OsAKT1 est un homologue d'*AKT1* d'*Arabidopsis* (famille des canaux Shaker) (Fuchs *et al.*, 2005). *AKT1* représente la voie principale d'entrée de K^+ à faible affinité dans la racine d'*Arabidopsis*, et participe également à l'absorption de K^+ à haute affinité (Hirsch *et al.*, 1998). *OsHAK1* est le plus proche homologue chez le riz d'*AtHAK5* (Bañuelos *et al.*, 2002), identifié comme principal acteur chez *Arabidopsis* du transport de K^+ à haute affinité dans la racine (Gierth *et al.*, 2005). Les résultats de cette étude illustrés dans la figure (V.11) montrent que les trois systèmes, *OsHKT1*, *OsAKT1* et *OsHAK1* sont bien exprimés dans la racine de riz du génotype sauvage en condition de carence en potassium. Chez les mutants *oshkt1*, représentés par les plantes NC2534-8-204-2 et ND4057-6-3-49-10 aucune expression d'*OsHKT1* n'est bien sûr détectée alors qu'*OsAKT1* et *OsHAK1* semblent être, comme chez le génotype sauvage, bien exprimés.

V.3 Discussion

OsHKT1, système majeur d'entrée de sodium à haute affinité dans la racine de riz.

Chez le génotype sauvage, une absorption importante de sodium à haute affinité par les racines de riz et des dépolarisations de la membrane des cellules corticales en réponse à des variations de concentration de Na^+ dans la solution (logiquement liées à des influx de Na^+), ont été mises en évidence (figures V.2 et V.7). L'absence d'expression fonctionnelle d'*OsHKT1* dans les racines de riz carencées en potassium se traduit par une altération importante de l'absorption de sodium à haute affinité (figure V.2) et une réduction de l'amplitude des dépolarisations en présence de faibles concentrations de sodium (figure V.7). Les différences observées entre les génotypes sauvage et mutants s'expliquent le plus logiquement par un rôle direct d'*OsHKT1* dans l'absorption racinaire de Na^+ à haute affinité en condition de carence potassique. Finalement, mes résultats indiquent qu'*OsHKT1* serait le

système majeur d'entrée du sodium à haute affinité dans la racine de riz en condition de carence en potassium.

Malgré l'extinction du gène *OsHKT1*, une dépolarisation de 13 à 16 mV continue d'être observée chez les mutants lorsque la concentration externe de Na^+ est augmentée de 0,4 μM à 15 μM . Par contre, en augmentant la concentration externe de Na^+ jusqu'à 300 μM , pas de dépolarisation supplémentaire n'est observée (figure V.7.A, traces du milieu et du bas). Cette dépolarisation observée n'est probablement pas due à l'activité d'un système d'influx de Na^+ , étant insensible au gradient de concentrations de sodium. Ce(s) système(s) semble(nt) être activé(s) par de faibles concentrations externes de Na^+ . L'identité moléculaire de ce(ces) système(s) reste inconnue.

Une première étude de lignées mutantes de riz invalidées dans le gène *OsHKT1* consistant à comparer l'influx de $^{22}\text{Na}^+$ dans les racines dans des expériences de court terme, chez le génotype sauvage et chez les mutants, a révélé une réduction dramatique de l'influx de Na^+ dans les racines carencées en potassium (Horie et al., 2007). Les auteurs en ont conclu qu'*OsHKT1* est directement impliqué dans l'influx de sodium dans les racines de riz. L'analyse de cinétiques enzymatiques réalisées sur le produit de soustraction entre l'influx unidirectionnel de Na^+ chez le mutant et celui chez le sauvage a permis de dégager une affinité apparente comprise entre ~ 280 et 330 $\mu\text{M Na}^+$. Les résultats obtenus durant ma thèse à travers les expériences de mesures de flux nets racinaires et de potentiel de membrane chez les génotypes sauvage et mutants *oshkt1*, appuient les conclusions de Horie et ses collaborateurs quant à l'implication d'*OsHKT1* dans le transport racinaire de Na^+ , puisque mes expériences indiquent également que la mutation altère sévèrement la voie d'absorption de sodium à haute affinité par la racine et affecte le potentiel de membrane des cellules corticales. Par ailleurs, la valeur de *Km* déterminée par Horie et al., (2007) et proche de celle que j'ai déterminée par électrophysiologie en système hétérologue (figure 4B, chapitre III).

Il faut noter que notre étude sur *OsHKT1* donne, pour la première fois, des preuves directes du fonctionnement d'*OsHKT1* dans le cortex des racines de riz carencées en potassium à travers des mesures de potentiel de membranaire des cellules corticales.

OsHKT1, un symport $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ dans la racine de riz ?

La demande des plantes en potassium est importante vu qu'il représente un macroélément essentiel à leur croissance. Les plantes disposent de plusieurs systèmes de transport de potassium exprimés dans les racines, assurant un prélèvement efficace de cet ion au niveau de la solution du sol puis, dans une seconde étape, sa translocation vers les parties aériennes. Un grand nombre de gènes codant des canaux et des transporteurs de potassium ont été identifiés dans les génomes des plantes (Mäser et al. 2001, Véry et Sentenac, 2002, 2003). Certains de ces systèmes ont la capacité de prélever le potassium quand il est présent en très faibles concentrations dans le sol (transport à haute affinité). Ces systèmes de prélèvements sont principalement exprimés dans l'épiderme et les cellules corticales des racines.

Les mesures de l'appauvrissement du milieu en K^+ sur des racines de génotype sauvage ou mutants *oshkt1* indiquent que la disruption d'*OsHKT1* affecte la voie d'absorption du potassium (figure V.2). Une première question se pose sur l'implication effective d'*OsHKT1* dans le phénotype de prélèvement du potassium observé. La diminution de l'influx net de K^+ à haute affinité chez les mutants est-il bien dû à la disruption d'*OsHKT1* ou à la modification de l'expression d'autres systèmes de transport de K^+ chez les mutants? Les gènes candidats (en dehors des *HKTs*) à la fonction de transport de K^+ dans la racine ont été identifiés chez

Arabidopsis et révèlent deux familles majeures de transporteurs, les *KUPHAK*, et la famille d'antiports (cation/proton) *CPA* en plus des canaux (principalement la famille *Shaker*). Chez le riz, ces familles ont été également identifiées et certains de leurs membres ont été caractérisés (Bañuelos *et al.*, 2002; Rubio *et al.*, 2000; Obata *et al.*, 2007; Fukuda *et al.*, 2004). En se basant sur les données bibliographiques disponibles chez le riz sur ces systèmes, en termes d'affinité de transport de K^+ et de patrons d'expression, et du rôle dans la plante rapporté chez leurs homologues d'*Arabidopsis*, certains candidats se distinguent comme d'avantage susceptibles de jouer un rôle dans le transport de K^+ à haute affinité. Ces membres sont, comme déjà indiqué dans le paragraphe V.2.5, *OsHAK1* et *OsAKT1* (appartenant à la famille *Shaker* de riz). Bien que préliminaires, nos études d'expression de ces gènes dans la racine chez le génotype sauvage et les mutants ont montré que le niveau d'expression de ces gènes est peu différent chez les différents génotypes en condition de carence en K^+ (figure V.11). Ce résultat appuie l'hypothèse que le phénotype observé chez les mutants n'est pas lié à une variation de l'expression de ces systèmes mais plutôt à la perte d'expression d'*OsHKT1*.

OsHKT1 est donc certainement impliqué dans l'absorption de potassium à haute affinité dans la racine de riz. Cependant, participe-t'il directement au prélèvement de potassium à partir de la solution du sol? Ou bien a-t'il plutôt un rôle dans le contrôle de la polarisation générale de la racine, l'impliquant seulement indirectement dans le transport de K^+ ? Les enregistrements de potentiel de membrane des cellules corticales de racines ont été effectués entre autre pour tenter de répondre à cette question.

Une limitation technique de la méthode de mesure de potentiel de membrane sur les cellules végétales se traduit par la quasi impossibilité de positionner la pointe de l'électrode de mesure dans le cytoplasme des cellules car celui-ci ne représente dans la plupart des types cellulaires qu'un espace infime par rapport à l'espace occupé par la vacuole (~ 1% du volume cellulaire)(Goldsmith *et al.*, 1972). Par conséquent, la microélectrode pénètre presque toujours dans la vacuole et mesure un potentiel représentant le potentiel en série à travers le tonoplaste et la membrane plasmique (figure II.10). Les mesures de potentiel de membrane réalisées sur les cellules du cortex de la racine n'échappent pas à ce problème.

La concentration de potassium est fortement régulée dans le cytoplasme pour garantir les fonctions vitales de la cellule. Par contre, il est très probable que la concentration de K^+ dans la vacuole soit d'avantage variable et dépende du statut de nutrition potassique de la plante. Mes résultats de dosages de teneurs ioniques de racines excisées de plantes de riz de génotypes sauvage ou mutants *oshkt1* (figure V.4), indiquent qu'il n'y a pas de variation significative des teneurs moyennes de K^+ et Na^+ entre les génotypes sauvage et mutants. Sachant que la vacuole représente 99% du volume de la cellule, ce résultat indique que le contenu vacuolaire n'est pas affecté par la mutation, ce qui suggère que les différences de potentiel de membrane entre génotypes sauvage et mutants données par l'électrode intracellulaire ne reflètent pas des différences de polarisation du tonoplaste liées à des différences de teneur vacuolaire en K^+ et Na^+ . Ainsi, les variations de potentiel de membrane enregistrées dans mes expériences s'interprètent très probablement comme des variations d'activité de systèmes de transports électrogènes sur la membrane plasmique tels que *OsHKT1*.

L'examen du potentiel de membrane enregistré chez le génotype sauvage et les mutants en présence de 0,2 ou 5 μM de K^+ et des concentrations variables de Na^+ (0,4 à 300 μM) montre que les mutants sont hyperpolarisés par rapport au génotype sauvage dans toutes les conditions de concentration de Na^+ (figures V.7.B et V.10.B, panneaux de gauche). Dans mes expériences de flux nets racinaire (figures V.2 et V.3), j'ai observé que les flux nets de K^+

chez le génotype sauvage sont dans toutes les conditions de concentration (K^+ 0,2 à 30 μM) supérieurs à ceux chez les mutants. Ainsi, au moins dans le domaine de concentration de K^+ 0,2 à 5 μM , la combinaison chez le génotype sauvage d'un influx net de K^+ plus important et d'une polarisation de la membrane des cellules plus faible (par rapport à ceux des mutants) implique qu'OsHKT1 participe de façon directe au transport de K^+ .

D'un point de vue thermodynamique, OsHKT1 peut-il fonctionner en symport Na^+-K^+ dans la racine de riz? Il n'est pas très facile, en absence de données précises sur les gradients de potentiels électrochimiques de Na^+ et K^+ à travers la membrane plasmique et de données exactes sur la polarisation de la membrane plasmique des cellules racinaires, de répondre à cette question. Toutefois, des estimations de ces derniers paramètres peuvent être effectuées (figure V.12). L'activité de K^+ dans le cytoplasme de cellules corticales de racines d'orge carencées en K^+ a été mesurée à 65 mM par Walker et ses collaborateurs (1996a). J'ai pris cette valeur d'activité de K^+ cytosolique pour mes estimations de potentiel d'équilibre de K^+ à travers la membrane plasmique des cellules corticales de la racine de riz carencée en K^+ . En ce qui concerne l'activité de Na^+ dans le cytoplasme, elle est probablement faible, les plantes ayant poussé sur un milieu contenant très peu de Na^+ (Na^+ apporté sous forme de contaminant dans la gélose <100 μM). En absence d'informations plus précises provenant de la littérature, j'ai choisi comme estimation de l'activité de Na^+ cytosolique, 1 mM. En ce qui concerne les potentiels électriques de part et d'autre du tonoplaste, des mesures ont été effectuées dans le cortex de racines d'orge carencées en K^+ (Walker et al., 1996a). J'ai utilisé ces valeurs pour extraire le potentiel à travers la membrane plasmique des valeurs données par mes électrodes intracellulaires. Enfin, les erreurs sur la mesure de potentiels de membrane par électrode intracellulaire, liées en particulier aux fuites entre l'électrode et la membrane au niveau de la piqûre, ont été estimées par Gassmann et ses collaborateurs (1994). J'ai utilisé ces données pour affiner l'estimation du potentiel effectif à travers la membrane plasmique des cellules corticales de riz. La valeur estimée de potentiel de membrane "effectif" est comparée sur la figure V.12 au potentiel d'inversion du courant à travers un symport Na^+-K^+ , déterminé à partir des estimations des potentiels d'équilibre de K^+ et Na^+ . Deux situations expérimentales sont traitées dans la figure V.12. Elles correspondent toutes les deux à des conditions dans lesquelles des influx nets de K^+ (supérieurs chez le génotype sauvage) ont été enregistrés et pour lesquelles j'ai également obtenu des données de potentiel de membrane. La première situation correspond à un milieu contenant les deux cations, K^+ 5 μM et Na^+ 15 μM (figure V.12.A). Dans ce cas, le potentiel de membrane "effectif" estimé se situe à une valeur clairement plus négative (-15 mV) de celle du potentiel d'inversion d'un symport Na^+-K^+ . Il est donc probable que dans ces conditions de concentration, l'absorption de K^+ à travers un symport Na^+-K^+ soit possible dans les cellules corticales de la racine de riz. La deuxième situation correspond à un milieu contenant d'avantage de K^+ , 15 μM , et très peu de Na^+ , 1 μM (situation rencontrée dans les expériences de détermination de flux nets racinaires avec le milieu " K^+ seul") (figure V.12.B). Dans ce cas, le potentiel de membrane "effectif" estimé se situe à une valeur moins négative (+20 mV) de celle estimée pour le potentiel d'inversion d'un symport Na^+-K^+ . Même si des incertitudes dans nos estimations empêchent d'exclure que l'absorption de K^+ à haute affinité puisse également se faire dans ces conditions à travers un symport Na^+-K^+ , cette hypothèse est ici moins probable que dans la première situation présentée. Les influx de K^+ dans cette deuxième situation pourraient avoir lieu à travers des symports H^+-K^+ (figure V.12.B) comme peut-être OsHAK1. Il est intéressant de noter que dans cette condition de milieu (" K^+ seul"), l'écart au niveau des flux nets de K^+ entre génotypes sauvage et mutant est beaucoup plus faible que dans les milieux contenant d'avantage de Na^+ (figures V.2 et V.3). D'autre part, en présence de K^+ "seul" 15 μM , le

potentiel de membrane enregistré chez le génotype sauvage était légèrement plus négatif que chez les mutants (figure V.8B panneau de gauche), ce qui suggère que dans ces conditions, OsHKT1 pourrait, en fonctionnant en efflux, hyperpolariser la membrane et favoriser ainsi indirectement l'absorption de K^+ à travers des symports H^+-K^+ .

Rôle d'OsHKT1 dans la racine

-Rôle nutritionnel du sodium

Contrairement au potassium qui est un macroélément essentiel et le cation le plus abondant dans les tissus végétaux, le sodium n'est pas requis par les plantes en tant que tel, bien que la disponibilité des deux cations dans le sol soit généralement similaire. Pourtant, le prélèvement de Na^+ à haute affinité à partir de la solution du sol a été décrit il y a plusieurs années sur des racines d'orge carencées en potassium (Rains et Epstein, 1967). Le potassium inhibant l'influx de Na^+ , Epstein et ses collaborateurs (Epstein *et al.*, 1963) ont conclu que le même système, baptisé "Mécanisme I à haute affinité d'Epstein", permet le transport de Na^+ et de K^+ . Ce "mécanisme I" transporte sélectivement K^+ à haute affinité lorsque Na^+ et K^+ sont présents dans le milieu à faibles concentrations. Il peut transporter Na^+ quand K^+ n'est pas présent dans le milieu.

Les systèmes de transport de Na^+ à haute affinité ont reçu un regain d'intérêt après l'identification du premier transporteur HKT, TaHKT1, un système de transport du cortex racinaire caractérisé en système hétérologue comme symport Na^+-K^+ (Rubio *et al.*, 1995). Toutefois, alors que de nombreuses études ont porté sur le rôle toxique de Na^+ dans la plante lors d'un stress salin et l'élucidation des mécanismes de tolérance à ce stress, le rôle de Na^+ à plus faibles concentrations reste beaucoup moins documenté.

Les résultats obtenus dans le cadre de ma thèse, montrent qu'OsHKT1 fonctionne dans l'ovocyte comme un système de transport de Na^+ à haute affinité (Chapitre III, figure 4B). Lorsque les concentrations externes de Na^+ et K^+ sont faibles (submillimolaires), il fonctionne majoritairement comme symport Na^+-K^+ (Chapitre III, figure 9). De plus, les analyses effectuées sur racine (rapportées dans ce chapitre), montrent que ce transporteur, joue un rôle majeur dans l'absorption de Na^+ à haute affinité par les cellules corticales des racines de riz lorsque le potassium est limitant dans le milieu. Une étude effectuée par Horie et ses collaborateurs (Horie *et al.*, 2007) basée sur une comparaison des influx unidirectionnels de Na^+ sur des racines de riz de génotypes sauvage ou mutantes *oshkt1* avait déjà permis de montrer qu'OsHKT1 joue un rôle majeur dans l'absorption racinaire de Na^+ à haute affinité en condition de carence potassique. Mes analyses montrent, pour la première fois, qu'OsHKT1 est actif *in vivo* dans les cellules corticales de la racine de riz.

Des études de physiologie classique avaient montré que le sodium, dans certaines conditions peut stimuler la croissance de plusieurs espèces de plantes (Mengel and Kirkby, 1982; Flowers and Läuchi, 1983). Horie et ses collaborateurs ont testé l'hypothèse qu'OsHKT1 puisse médier ce rôle de Na^+ , en effectuant des analyses comparatives de croissance entre le génotype sauvage et les mutants perte de fonction dans des conditions de carence en K^+ avec une disponibilité modérée en Na^+ (500 μM de Na^+ apportés sous forme de $NaNO_3$) (Horie *et al.*, 2007). Ils ont montré que la croissance du génotype sauvage est effectivement favorisée dans ces conditions et que les mutants ont accumulé moins de Na^+ dans leurs tissus. Ils en ont conclu qu'OsHKT1 peut médier un rôle bénéfique nutritif de Na^+ dans la plante lorsque le potassium se trouve limitant dans le milieu.

Les systèmes de transport de Na^+ à haute affinité ont certainement joué un rôle crucial pour la conquête de milieux oligotrophiques pendant l'ère primaire. L'existence de systèmes de transport de Na^+ à haute affinité chez les champignons (de type ATPase) (Benito *et al.*, 2004), qui ont colonisés l'environnement terrestre témoigne de l'importance de l'absorption de sodium à haute affinité pour la physiologie et le développement des organismes évoluant dans des milieux pauvres en potassium. Chez les champignons, pour lesquels l'absorption du sodium a été largement étudiée et pour lesquels plusieurs génomes sont actuellement complètement séquencés, il a été montré que l'absorption du sodium à haute affinité n'existait pas chez les espèces adaptées aux milieux riches en potassium (Benito *et al.*, 2004). Chez les plantes, cette voie d'absorption a été examinée chez plusieurs céréales et le tournesol chez lesquels un transport du sodium à haute affinité a été effectivement identifié dans les racines (Garcia-deblás *et al.*, 2003). L'existence de tels systèmes chez les plantes pourrait être la règle générale. Chez *Arabidopsis*, en tout cas, aucun transporteur HKT n'est exprimé dans les couches périphériques de la racine, le seul membre de cette famille chez cette espèce étant exprimé dans les tissus conducteurs (Berthomieu *et al.*, 2003; Sunarpi *et al.*, 2005). Si une absorption de Na^+ à haute affinité par les racines a lieu chez cette espèce, elle devra être médiée par d'autres systèmes de transport, vraisemblablement des canaux cationiques (Tyerman and Skerrett, 1999; Davenport and Tester, 2000; Maathuis and Sanders, 2001; Demidchik *et al.*, 2002; Essah *et al.*, 2003).

-Absorption du potassium à haute affinité

La question du rôle des HKT dans l'absorption du potassium à haute affinité à partir des racines a été largement débattue. En effet, plusieurs arguments sont en faveur de cette hypothèse. Par exemple, les transcrits de certains de ces systèmes ont été localisés au niveau des cellules corticales des racines, leur abondance est fortement augmentée en situation de carence en K^+ (Schachtman et Schroeder, 1994; Garcia-deblás *et al.*, 2003). De plus, certains membres ne sont pas exclusivement perméables à Na^+ mais présentent aussi une perméabilité au potassium. Cependant, le rôle de ces systèmes dans le transport de K^+ dans la plante reste inconnu.

OsHKT1 est exprimé au niveau des couches périphériques de la racine et ses transcrits sont fortement accumulés en conditions de carence en K^+ (Chapitre III, Figure 1; Gollack *et al.*, 2002; Horie *et al.*, 2007). Mes résultats de caractérisation fonctionnelle dans l'ovocyte de xénope (Chapitre III), montrent qu'*OsHKT1* fonctionne en symport Na^+ - K^+ à faibles concentrations externes de Na^+ et K^+ .

A partir d'expériences de mesure d'influx unidirectionnel de $^{86}\text{Rb}^+$ sur des racines de riz de géotypes sauvage ou mutants *oshkt1*, Horie et ses collaborateurs Horie *et al.*, (2007) ont estimé qu'*OsHKT1* ne joue pas de rôle majeur dans l'absorption de K^+ à haute affinité. En effet, ils ont observé que la mutation n'introduit que des différences mineures entre les flux chez le géotype sauvage et chez les mutants, liées d'après ces auteurs aux effets indirects de la mutation (différences de potentiel de membrane). Sur ce point, mes résultats se trouvent en désaccord avec ceux de Horie et ses collaborateurs. Mes expériences de détermination d'influx nets dans les racines de riz carencées de géotypes sauvage ou mutants *oshkt1* ont clairement montré dans différentes conditions ioniques une diminution importante des influx nets de K^+ chez les mutants (figure V.3). La différence entre les phénotypes d'influx de K^+ observés dans mes expériences et les expériences de Horie et ses collaborateurs reste non expliquée. L'emploi d'un traceur radioactif du potassium, le rubidium ($^{86}\text{Rb}^+$) par Horie et ses collaborateurs pourrait peut-être être à l'origine de cette différence. La faiblesse des influx de

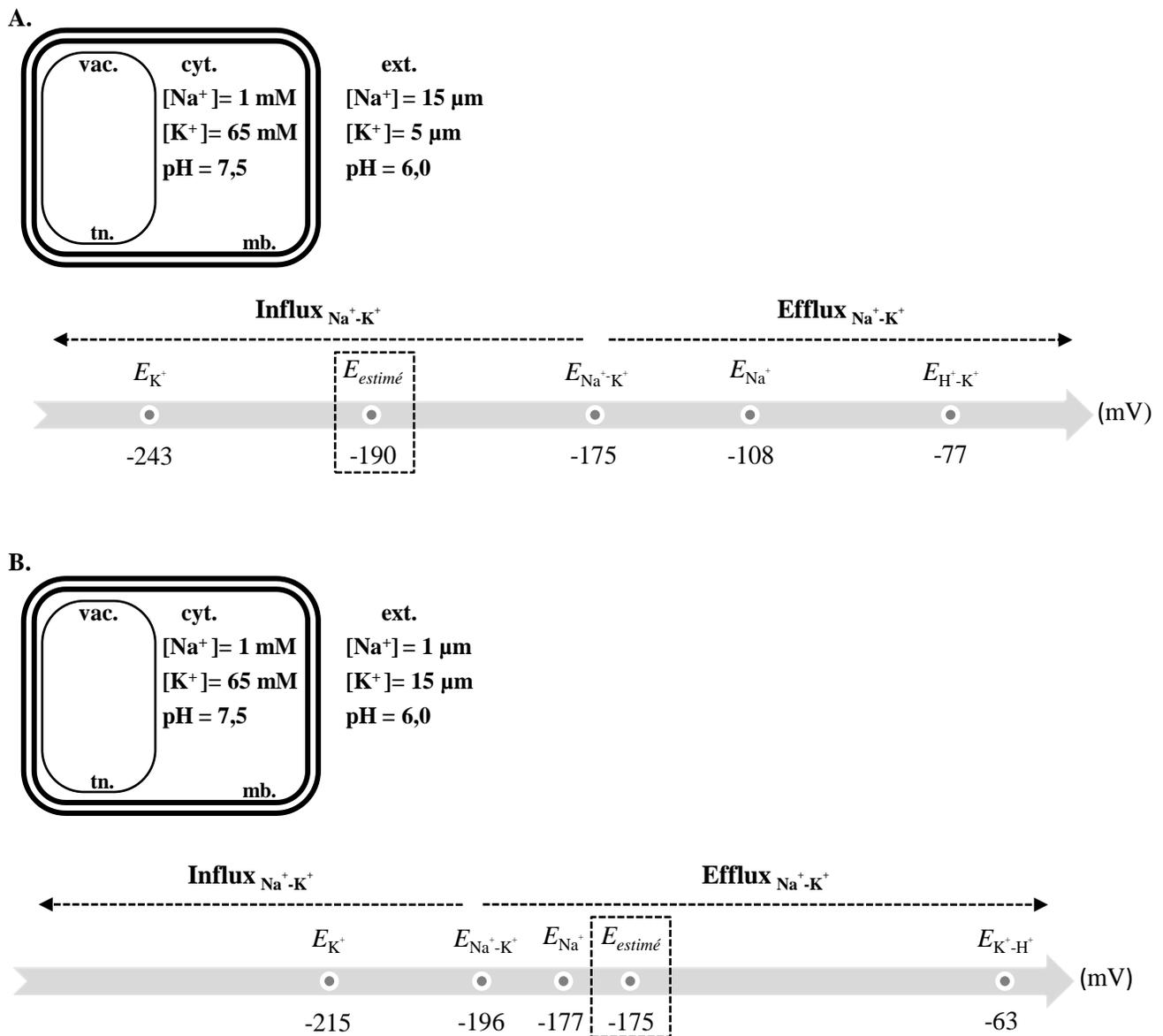


Figure V.12. Estimation de la possibilité d'absorption couplée de Na⁺ et K⁺ dans le cortex racinaire de riz, compte tenu du potentiel de membrane mesuré.

Les plantes ont été cultivées dans les mêmes conditions que dans les Figures V.2 à V.10. Les activités cytosoliques de K⁺ et Na⁺ sont estimées à 65 mM et 1 mM respectivement. **A.** Les activités externes de Na⁺ et K⁺ sont respectivement 15 μM et 5 μM. Les potentiels d'équilibre de K⁺ ($E_{K^+} = RT/zF * \ln ([K^+]_{ext} / [K^+]_{cyt})$) et Na⁺ (E_{Na^+}) sont indiqués, ainsi que les potentiels d'inversion du courant à travers des symports H⁺-K⁺ ($E_{H^+-K^+}$) ou Na⁺-K⁺ ($E_{Na^+-K^+} = 1/2 * (E_{Na^+} + E_{K^+})$). Le potentiel de membrane estimé a été déterminé en ajoutant au potentiel moyen enregistré par l'électrode intracellulaire (implantée dans la vacuole) -50 mV pour tenir compte du potentiel transvacuolaire et des chutes de potentiels liées aux fuites au niveau de la jonction membrane-électrode (Gassmann et al., 1994; Walker et al., 1996). **B.** Même type de calcul avec les activités externes de Na⁺ et K⁺ respectivement 1 μM et 15 μM. Abréviations: cyt., cytosol; ext., milieu externe; mb., membrane plasmique; tn., tonoplaste; vac., vacuole.

rubidium en comparaison avec ceux du sodium, dans les expériences de Horie et ses collaborateurs est intrigante. Mes résultats de caractérisation fonctionnelle dans l'ovocyte de xénope (Chapitre III) montrent qu'OsHKT1 est un transporteur cationique qui ne discrimine pas entre K^+ et Rb^+ (Chapitre III, figure 7B). D'autre part, il faut noter que Horie et ses collaborateurs ont mesuré les influx de Rb^+ en absence de Na^+ dans le milieu. Mes expériences ont montré qu'en présence de K^+ "seul" dans le milieu, les différences d'influx de K^+ entre génotype sauvage et mutants sont plus faibles qu'en présence de Na^+ (figures V.2 et V.3).

Finalement, mes expériences ont montré pour la première fois, *in vivo*, l'implication directe d'un HKT dans la voie d'absorption de potassium à haute affinité par la racine. Dans les conditions de très faibles concentrations de K^+ ($\leq 30 \mu M$) où j'ai effectué mes expériences, une contribution importante de canaux K^+ à l'absorption de K^+ à haute affinité est peu probable (figure V.12). Sur la base d'analyses thermodynamiques, les symports H^+-K^+ (famille KUP/HAK?) sont les meilleurs candidats pour effectuer l'absorption de K^+ à haute affinité dans la plupart des conditions de milieu. Toutefois, mes expériences montrent, en combinant des mesures de flux nets et de polarisation membranaire, qu'un couplage Na^+-K^+ pour l'absorption de K^+ est thermodynamiquement possible, au moins dans les milieux contenant des concentrations non négligeables ($>10 \mu M$) de Na^+ .

*

* *

CHAPITRE VI
Discussion générale

Dans toute cellule, animale ou végétale, le plasmalemmes maintient un double gradient de concentration de K^+ et Na^+ entre le cytoplasme et le milieu extérieur, le premier cation étant accumulé et le second étant exclu du cytoplasme. Il est probable que l'entretien de ce double gradient constitue une caractéristique essentielle de l'état vivant, en relation avec le fait que la vie est apparue dans les océans. En appui à cette proposition, la première manifestation de la mort "clinique", bien antérieure à l'altération des macromolécules et structures cellulaires, est l'effondrement des gradients ioniques transmembranaires.

Chez les animaux, le double gradient de K^+ et Na^+ à travers le plasmalemmes est mis en place et entretenu directement par une enzyme, l'ATPase Na^+/K^+ . Les végétaux ont développé une stratégie différente, qui apparaît plus complexe: la membrane cellulaire est énergisée par une ATPase- H^+ , et ce sont les gradients transmembranaires de potentiel électrique et de pH résultant de l'activité de cette pompe qui entraînent le fonctionnement de divers systèmes de transport de K^+ et/ou Na^+ , canaux et transporteurs, symports ou antiports, dont l'activité intégrée aboutit à l'entretien des gradients transmembranaires de ces deux ions. Le monde végétal se distingue donc fondamentalement du monde animal dans le mode d'énergisation de la membrane cellulaire et le maintien des gradients de K^+ et Na^+ . Clairement, cette originalité mérite d'être explorée et comprise par le biologiste. Au delà de cet aspect fondamental, l'analyse des transports membranaires de Na^+ et K^+ chez les plantes présente aussi l'intérêt de concerner directement un domaine important de la physiologie végétale et de l'agronomie, celui de l'étude des mécanismes d'adaptation aux sols salés et de réponse au stress salin.

Dans le cadre de ces considérations, le choix de la famille des transporteurs HKT du riz comme modèle d'étude est intéressant sur plusieurs plans. Premièrement, la présence d'une famille HKT constitue une caractéristique spécifique des plantes, non possédée par les animaux. D'autre part, cette famille présente l'originalité d'intégrer des propriétés fonctionnelles très distinctes entre monocotylédones et dicotylédones. De plus, la grande diversité dans les caractéristiques fonctionnelles des transporteurs HKT (révélée chez le riz au cours de ce travail de thèse) suggère des rôles majeurs dans l'intégration des transports de K^+ et Na^+ à l'échelle de la plante entière. Enfin, des données existent d'ores et déjà indiquant que des transporteurs HKT peuvent être des acteurs majeurs dans l'adaptation de la plante au stress salin.

J'ai engagé deux programmes de recherche en parallèle au cours de ma thèse, visant d'une part à explorer la diversité au sein de la famille HKT du riz, en termes de caractéristiques fonctionnelles et de patrons d'expression, et d'autre part à développer une analyse de la fonction *in planta* de ces transporteurs par génétique inverse et obtention de lignées mutantes de type perte de fonction.

La diversité fonctionnelle au sein de la famille OsHKT a été explorée en caractérisant, par expression hétérologue dans l'ovocyte de xénope, 3 membres de cette famille, OsHKT1, OsHKT4 et OsHKT6. Les analyses électrophysiologiques ont révélé en particulier que ces 3 transporteurs se distinguent en termes de perméabilité pour K^+ et Na^+ , sens du transport (rectification) et affinité. En résumé, OsHKT1 est perméable à la fois à Na^+ et K^+ alors que les deux autres systèmes ne le sont qu'à Na^+ . OsHKT4 est fortement rectifiant entrant alors qu'OsHKT1 n'est pas du tout rectifiant et qu'OsHKT6 l'est peu. Enfin, l'affinité pour Na^+ est forte chez OsHKT1, faible chez OsHKT6 et encore beaucoup plus faible chez OsHKT4 (plus d'un ordre de grandeur séparant les constantes d'affinité apparente pour Na^+ de chacun de ces systèmes). Dans une seconde étape de l'analyse de l'activité moléculaire, le fait d'avoir observé qu'OsHKT1 est perméable à la fois à K^+ et Na^+ , contrairement à ce qui était parfois rapporté dans la bibliographie, m'a conduit à analyser les interactions éventuelles entre ces 2

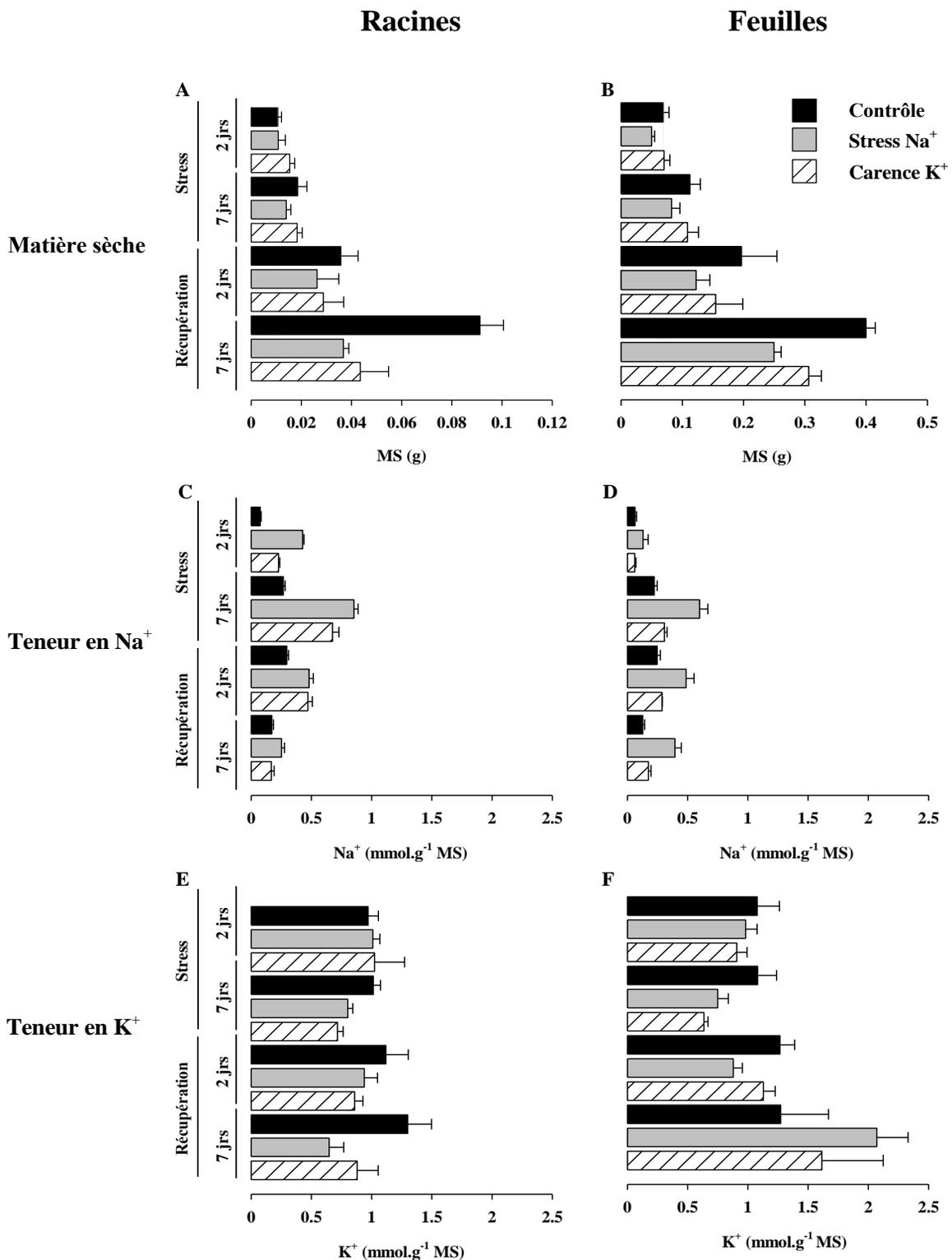


Figure VI.1. Réponse physiologique de plantes de riz de génotype sauvage cv. Nipponbare au stress salin et à la carence en potassium.

Le protocole expérimental (culture des plantes, application des traitements) est décrit dans la figure II.2. Les plantes sont âgées de 3 semaines au début des traitements: contrôle (K⁺ 1,1 mM, Na⁺ 200 µM), carence K⁺ modérée (K⁺ 100 µM, Na⁺ 600 µM), stress salin modéré (K⁺ 1,1 mM, NaCl 40 mM). **A** et **B**. Effet des traitements sur la croissance racinaire (A) et foliaire (B). **C** et **D**. Effet des traitements sur la teneur foliaire (C) et racinaire (D) en Na⁺. **E** et **F**. Effet des traitements sur la teneur foliaire (E) et racinaire (F) en K⁺.

cations au cours du processus de perméation. De façon intéressante, l'ensemble des données obtenues démontre d'une part qu'OsHKT1 peut fonctionner selon des modes très distincts, en fonction de la concentration de Na^+ et K^+ dans le milieu, et d'autre part que ce système est très probablement doté d'une activité de symport $\text{K}^+\text{-Na}^+$ dans le domaine des faibles concentrations en Na^+ . Concernant ce dernier résultat, il s'agit de la seconde fois, après les travaux conduits sur le transporteur TaHKT1 du blé (Gassmann *et al.*, 1996; Rubio *et al.*, 1995 ; Schachtman et Schröder, 1994) qu'une analyse électrophysiologique détaillée, grâce à l'utilisation de l'ovocyte de xénope comme système d'expression, conduit à conclure que les plantes sont susceptibles de disposer de systèmes de transport de K^+ utilisant Na^+ dans un processus de co-transport. Ayant choisi de travailler sur une espèce modèle, le riz, pour laquelle des collections de mutants d'insertion sont disponibles, j'ai pu prolonger cette analyse conduite en système hétérologue par une étude *in planta*, en utilisant des plantes *oshkt1* de génotype mutant perte de fonction. Ce travail m'a permis de fournir ce qui constitue très probablement la première démonstration de l'activité d'un symport $\text{Na}^+\text{-K}^+$ chez les plantes.

Le patron d'expression des 3 transporteurs caractérisés sur le plan fonctionnel a été analysé par hybridation *in situ*. Les données révèlent, de façon générale, des patrons d'expression relativement larges, incluant en particulier les tissus périphériques de la racine, les tissus conducteurs des racines et des feuilles et certains types cellulaires comme les cellules bulliformes. Un résultat inattendu mais important, dont la signification physiologique n'est pas claire, est que les 3 transporteurs étudiés peuvent s'exprimer simultanément dans le même type cellulaire (*e.g.*, cellules du cortex racinaire ou cellules bulliformes). Dans leur ensemble, ces données contredisent la représentation consensuelle qui prévalait de façon implicite à ce jour, conduisant à s'intéresser à la fonction des transporteurs HKT perméables à K^+ et Na^+ essentiellement dans le cortex racinaire, et à celle des transporteurs perméables à Na^+ uniquement dans les tissus conducteurs. Clairement par exemple, les résultats obtenus posent la question de la fonction des HKT dans l'activité osmo-contractile des cellules bulliformes et les variations de la surface foliaire déployée en réponse aux conditions environnementales (humidité, température, lumière). Il s'agit là d'un exemple de perspective inattendue et originale ouverte par nos résultats, particulièrement intéressante eu égard à l'importance du contrôle du "déploiement" foliaire dans l'adaptation de la plante aux fluctuations de son environnement abiotique.

De façon plus générale, une première série de perspectives ouvertes par ce travail se situe directement dans le prolongement des travaux présentés dans ce mémoire. L'intérêt des résultats obtenus valide en effet l'efficacité de la stratégie développée, couplant analyses fonctionnelles détaillées en système hétérologue (ovocyte de xénope), analyse des patrons d'expression et obtention et caractérisation phénotypique de lignées mutantes perte de fonction. Un premier objectif serait donc de poursuivre le travail à l'instar de ce qui a déjà été réalisé afin de disposer du même niveau d'information pour tous les membres de la famille HKT du riz. Il est en effet raisonnable d'imaginer qu'une analyse systématique et globale de la famille se traduira par de la valeur ajoutée permettant d'accéder à un niveau d'information supérieur, en termes d'intégration dans la physiologie de la plante entière et de régulation.

Cependant, il est raisonnable de penser qu'il serait aussi très intéressant d'enrichir la stratégie de recherche développée jusqu'ici en mettant en place de nouvelles approches.

Pour commencer, dans le domaine de la caractérisation électrophysiologique des HKT, il serait très utile d'explorer les propriétés de perméation de ces systèmes en tentant de développer une analyse par patch-clamp en mode « canal unitaire ». A ce jour, en effet, toutes

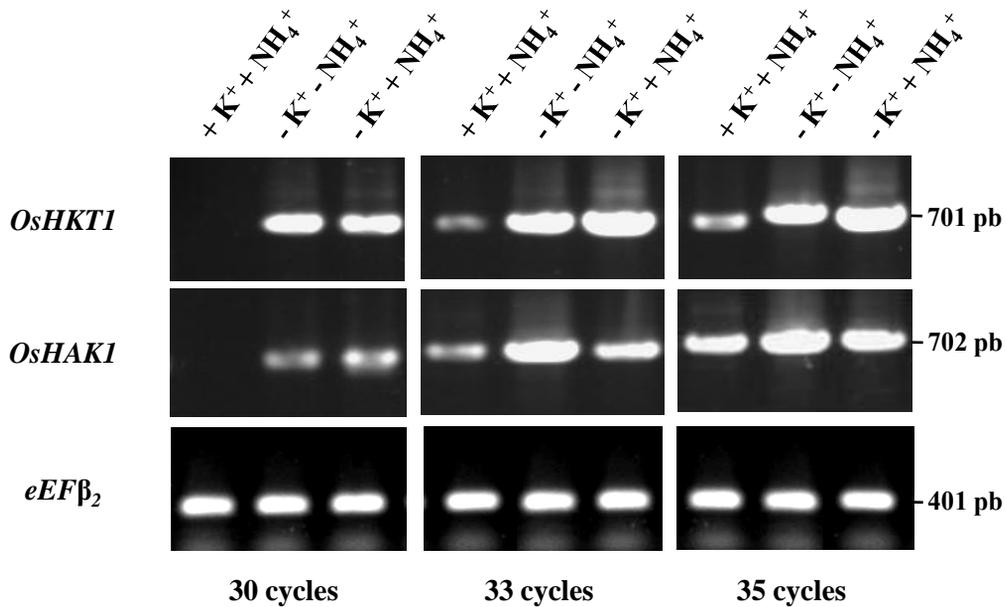


Figure VI.2. Effets de K^+ et NH_4^+ dans le milieu de culture du riz sur le niveau d'expression d'*OsHKT1* et d'*OsHAK1* dans les racines.

L'analyse de l'expression d'*OsHKT1*, d'*OsHAK1* et du facteur d'élongation *eEFβ₂* a été réalisée sur des rétrotranscrits obtenus à partir de racines de plantes de génotype sauvage cv Nipponbare cultivées en hydroponie dans différents milieux. Après germination en boîtes de Pétri sur papier filtre humecté avec H_2O , les plantules sont transférées en hydroponie, d'abord pendant 7 jours sur le milieu nutritif de Yoshida (K^+ 1,5 mM, NH_4^+ 1 mM, Na^+ 120 μ M), puis 15 jours dans différentes conditions: traitement contrôle (Yoshida) [K^+ + NH_4^+], traitement faible K^+ (KNO_3 0,7 mM remplacé par $Ca(NO_3)_2$ 0,35 mM et KH_2PO_4 0,8 mM remplacé par NaH_2PO_4 0,8 mM; K^+ résiduel dans le milieu \sim 100 μ M) et absence de NH_4^+ ($(NH_4)_2SO_4$ 0,5 mM remplacé par $MgSO_4$ 0,5 mM) [$-K^+$ - NH_4^+] et traitement faible K^+ en présence de NH_4^+ [$-K^+$ + NH_4^+]. Les transcrits ont été traités à la DNase et dosés par fluométrie avant rétrotranscription. L'amplification par PCR des ADNc a été effectuée à partir de 100 ng de matrice. Les produits de PCR ont été prélevés après 30, 33 et 35 cycles. Dix μ l de produits ont été déposés sur gel pour chacun des échantillons. La taille des bandes attendues (ADNc) est indiquée à droite des gels. Les amorces utilisées sont, pour l'amplification des rétrotranscrits *OsHKT1*, Pcs et P3as (Cf. figure IV.12); pour celle des rétrotranscrits *OsHAK1*, *OsHAKIP1* (5'-GAGGGGCAGGTGTACATCC-3') et *OsHAKIP2* (5'-GGCATCGATCATCTCTTGATG-3') et pour celle des rétrotranscrits *eEFβ₂*, Pcsβ₂ et Pcasβ₂ (Cf. figure IV.12).

les analyses électrophysiologiques de l'activité des transporteurs HKT, présentées dans ce mémoire ou disponibles dans la bibliographie, ont porté sur le courant macroscopique enregistré en mode cellule entière, *i.e.*, le courant total à travers l'ensemble des transporteurs présents sur la membrane de la cellule (ovocyte). A priori, la technique du patch-clamp en mode canal unique ne peut être utilisée que pour caractériser des systèmes de transports suffisamment conducteurs, c'est-à-dire des canaux. Proposer de l'utiliser pour caractériser un transporteur revient donc, de façon implicite, à avancer l'hypothèse de travail que le « transporteur » en question serait en fait doté d'une activité de type canal. Dans le cas des HKT, plusieurs considérations justifient l'intérêt d'une telle hypothèse. Premièrement, au niveau structural, les systèmes HKT dérivent très probablement d'un canal potassique ancestral à 2 segments transmembranaires et un pore, suite à une double duplication au sein d'un même cadre de lecture de la séquence codante du canal ancestral (*Cf.* Chapitre I, Introduction bibliographique). Deuxièmement, il apparaît aujourd'hui de plus en plus clair que la classification dichotomique des systèmes de transport secondaires en deux classes, « canaux » et « transporteurs », est trop schématique et ne rend pas compte de la diversité des structures protéiques, modes de perméation et couplage énergétique (Ren *et al.*, 2001; LeMasurier *et al.*, 2001). Enfin, le fait que les courants macroscopiques enregistrés dans des ovocytes exprimant un transporteur HKT puissent présenter une intensité relativement forte (ce qui a facilité nos analyses; *Cf.* chapitre III), pourrait indiquer que la conductance unitaire de ces systèmes est peut-être du même ordre de grandeur que celle de certains canaux, et donc mesurable et analysable. Si tel était le cas, il serait alors raisonnable de se représenter les systèmes HKT comme des transporteurs présentant une voie de perméation analogue à celle de canaux (tels KcsA), constituée d'un long pore étroit, présentant plusieurs sites d'interaction avec les cations (Na^+ et éventuellement K^+). A l'intérieur de ce pore, plusieurs ions devraient être simultanément présents et migrer en file indienne, « sautant » d'un site d'interaction à un autre. L'entrée d'un ion dans le tunnel, ou la sortie d'un ion à l'autre extrémité du tunnel, ou le « saut » d'un ion passant d'un site d'interaction avec les parois du tunnel au site d'interaction suivant, provoquerait, du fait de réactions de répulsion électrostatique au sein du tunnel, l'avancée de la totalité de la file indienne des ions dans le tunnel. Ce modèle, inspiré de celui proposé pour décrire le processus de perméation dans le canal potassique bactérien KcsA (DeFelice *et al.*, 2001; Doyle *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2001), pourrait facilement rendre compte de l'activité d'uniport à Na^+ (éventuellement sensible à K^+) des transporteurs HKT. Il est possible qu'il puisse aussi expliquer la capacité de certains HKT à fonctionner comme des symports Na^+-K^+ , puisque des modèles de ce type (long pore étroit) ont été déjà utilisés pour décrire divers systèmes de symport (Su *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 2001; Bush 1993).

En relation directe avec les points discutés ci-dessus, il serait aussi très intéressant d'engager un programme ambitieux d'analyse de la relation structure-fonction des transporteurs HKT. Les résultats présentés dans ce mémoire montrent déjà que la nature d'un résidu, sérine ou glycine, présent dans le premier domaine P des transporteurs HKT n'est pas le seul déterminant de l'éventuelle perméabilité à K^+ . Dans une première étape, l'étude de la relation structure-fonction des HKT pourrait intégrer une analyse par mutagenèse dirigée, basée sur l'alignement et la comparaison des séquences des transporteurs déjà caractérisés sur le plan fonctionnel. Les transporteurs mutants seraient ensuite caractérisés sur le plan fonctionnel par électrophysiologie en système hétérologue (ovocyte de Xénope si possible). Une analyse par mutagenèse aléatoire et criblage de la banque de transporteurs mutés par complément fonctionnelle de mutants de levure déficients pour le transport de K^+ (Uozumi *et al.*, 2001; Ichida *et al.*, 1999) permettrait aussi très probablement de progresser efficacement dans la compréhension de la relation structure-fonction des HKT, en découvrant

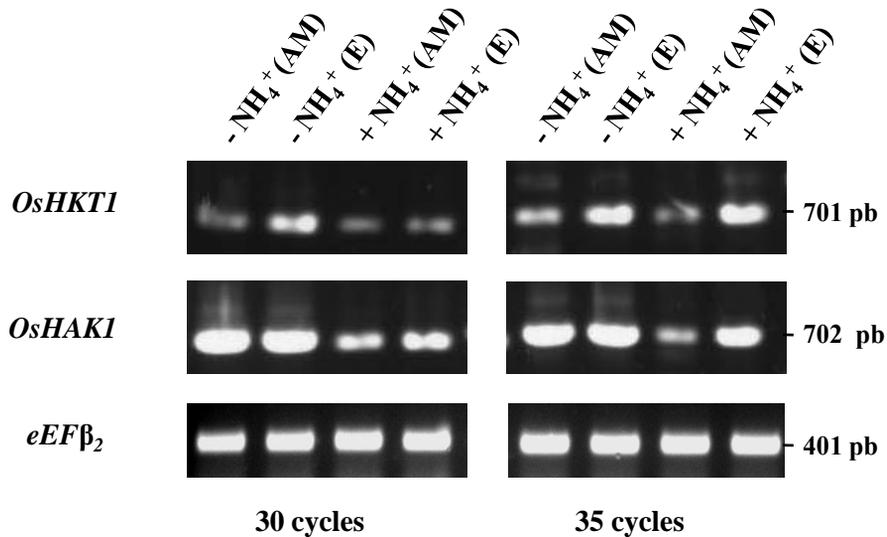


Figure VI.3. Effet de NH_4^+ dans le milieu de croissance du riz en condition de carence en potassium sur le niveau d'expression d'*OsHKT1* et d'*OsHAK1* dans différentes zones de la racine.

L'analyse de l'expression d'*OsHKT1*, d'*OsHAK1* et du facteur d'élongation *eEFβ₂* a été réalisée sur des rétrotranscrits obtenus à partir de racines de plantes de génotype sauvage cultivées en boîtes de Petri pendant 10 jours sur un milieu carencé en K^+ ($CaSO_4$ 1 mM, MES 2 mM, pH=6,0 (BTP)), contenant ou non de l'ammonium (sous forme $(NH_4)_2SO_4$ 0,5 mM). "E": transcrits extraits d'un segment de ~2,5 cm de longueur au niveau de la zone d'élongation cellulaire. "AM": transcrits extraits du reste de la racine (zone apicale + zone mature). Les transcrits ont été traités à la DNase et dosés par fluorimétrie avant rétrotranscription. L'amplification par PCR des ADNc a été effectuée à partir de 100 ng de matrice. Les produits de PCR ont été prélevés après 30 et 35 cycles. Dix μ l de produits ont été déposés sur gel pour chacun des échantillons. La taille des bandes attendues (ADNc) est indiquée à droite des gels. Les amorces utilisées pour l'amplification des rétrotranscrits sont les mêmes que dans la figure VI.2.

de nouvelles caractéristiques et en générant sans a priori de nouvelles hypothèses. Enfin, à terme, il serait évidemment particulièrement utile et intéressant de disposer d'un modèle structural, après cristallisation d'un transporteur HKT.

Concernant l'analyse des patrons d'expression, il est à prévoir que les données d'hybridation *in situ* devront être complétées par des approches basées sur l'utilisation de gènes rapporteurs GUS ou GFP. Il est en effet très vraisemblable que les niveaux d'expression de certains gènes *HKT* soient trop faibles pour permettre une détection des transcrits par hybridation *in situ*. Il est aussi raisonnable d'imaginer que l'utilisation de fusions transporteur::GFP constituera, dans certains cas, le seul moyen d'étudier l'adressage des HKT et d'apporter la démonstration définitive de leur présence sur la membrane plasmique.

Enfin, concernant l'analyse des fonctions *in planta* par génétique inverse, après obtention systématique de lignées mutantes pour chacun des HKT de riz, il serait très opportun de développer une gamme de procédures de phénotypage bien plus large que celle développée au cours de mon travail de thèse. Par exemple, il serait intéressant de tenter de comparer les données électrophysiologiques obtenues en système hétérologue par des analyses *in situ*, en comparant par patch-clamp des protoplastes préparés à partir de plantes de génotype sauvage ou mutant. Cela pourrait fournir en particulier un angle d'attaque pour analyser des voies de régulation (*e.g.*, par (dé)phosphorylation) qui ne seraient pas présentes dans les systèmes hétérologues. Il faudra aussi inclure des approches de phénotypage prenant en compte les résultats des analyses de patrons d'expression. A ce sujet, on peut d'ores et déjà penser à des mesures de concentration de K^+ et Na^+ dans différents tissus ou organes de la plante (à l'instar des résultats préliminaires présentés dans ce chapitre pour des plantes de génotype sauvage par la figure VI.1). De telles analyses devront aussi porter sur la composition des sèves xylémiennes et phloémiennes. On peut aussi penser que l'interprétation des données phénotypiques serait facilitée par l'obtention de lignées présentant des mutations multiples. Par exemple, l'analyse de l'activité de symport Na^+-K^+ dans les racines (catalysée par OsHKT1) serait probablement plus facile dans un contexte génétique se traduisant par l'absence d'expression de canaux potassiques Shaker et de symports H^+-K^+ HAK (*Cf.* Introduction) dans les tissus périphériques racinaires (pour illustration, les résultats présentés par les figures VI.2 & 3 révèlent une expression de *OsHAK1* dans les racines). L'objectif final, dans le prolongement de ces études, sera de préciser la fonction de chacun des HKT *in planta* et sa contribution à la croissance et à la compétitivité (« fitness ») de la plante dans des conditions environnementales diverses et fluctuantes. Les expériences dans ce domaine intégreront de toute évidence l'utilisation de solutions nutritives présentant des concentrations variables de Na^+ et K^+ , allant pour Na^+ jusqu'au stress salin. Cependant, on peut aussi prévoir qu'il sera important d'intégrer à ce type de protocole l'utilisation de concentrations variables en NH_4^+ . Il est en effet connu que la présence d'ammonium dans le sol peut exercer un effet inhibiteur sur le fonctionnement de certains mécanismes d'absorption de K^+ par la racine. Un tel effet a été mis en évidence en particulier chez *Arabidopsis* lors de la caractérisation du mutant *akt1* (perte de fonction pour le canal potassique Shaker AKT1 impliqué dans le prélèvement de K^+ du sol par la racine) (Hirsch *et al.*, 1998). Chez ce mutant, l'inactivation d'AKT1 ne se traduit par un retard de croissance sur un milieu pauvre en K^+ que si de l'ammonium est présent dans le milieu, suggérant que les autres systèmes de transport de K^+ (appartenant probablement à la famille HAK) sont inhibés par NH_4^+ . Le fait que l'environnement édaphique naturel du riz puisse présenter de forts niveaux d'azote ammoniacal (dans les rizières) renforce l'intérêt d'intégrer ce type d'analyse dans les protocoles de phénotypage des mutants *hkt* perte de fonction. Dans cette perspective, un

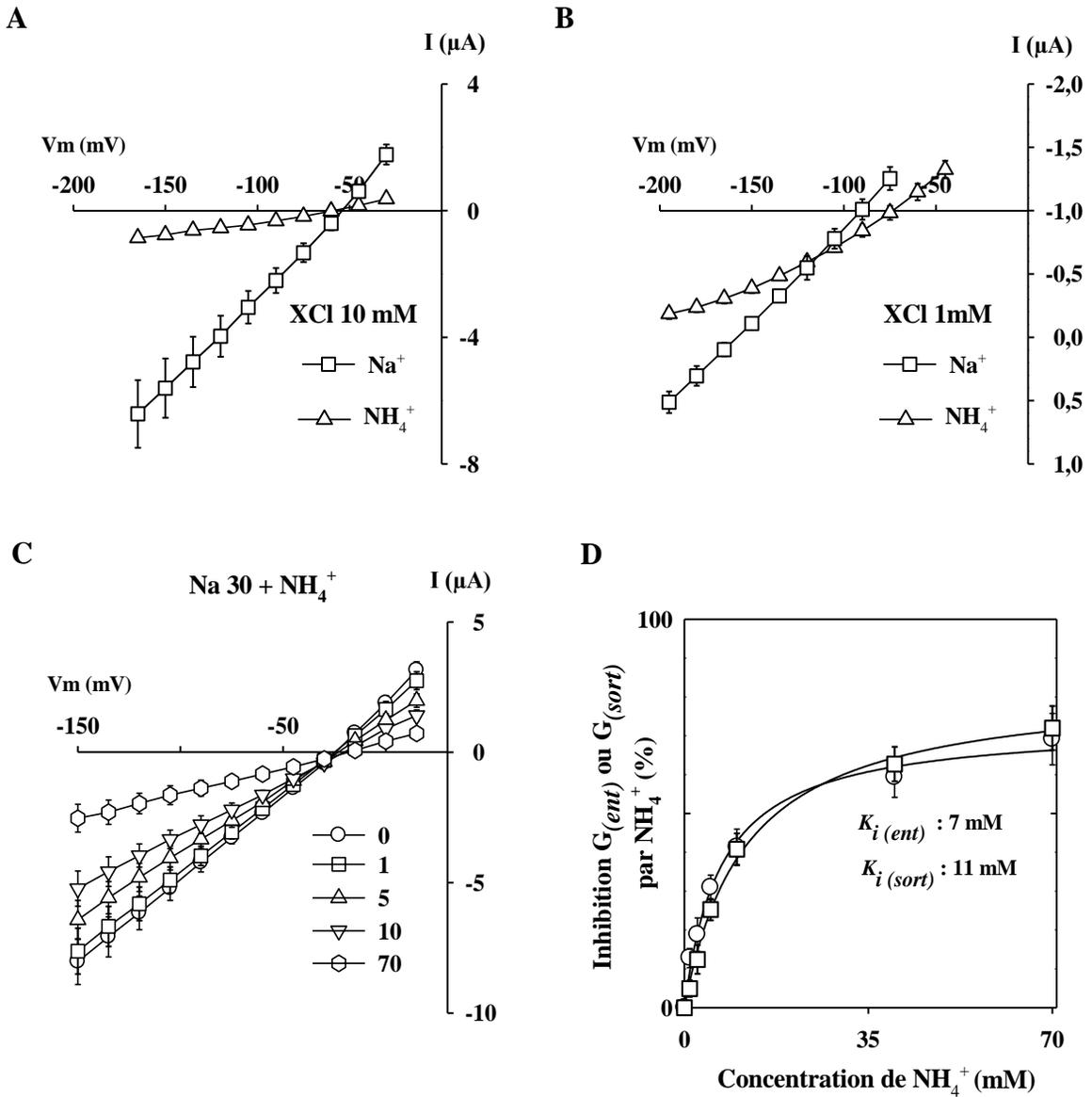


Figure VI.4. Effet de l'ammonium sur les propriétés de transport d'OsHKT1, exprimé dans l'ovocyte de Xénope .

A et B. Perméabilité d'OsHKT1 à l'ammonium. Na^+ et NH_4^+ sont apportés dans la solution de bain sous forme de sels de chlorure. La concentration externe de cations alcalins est 10 mM (A) ou 1 mM (B). **C.** Effet inhibiteur de NH_4^+ sur le transport de Na^+ par OsHKT1. Na^+ et NH_4^+ sont apportés dans la solution de bain sous forme de sels de chlorure (concentrations indiquées sur le panneau en mM). Les concentrations en Cl^- sont maintenues constantes dans toutes les solutions par ajout, quand nécessaire, d'HCl titré par la N-méthyl-D-glucamine (NMDG-Cl). **D.** Affinité de l'inhibition par NH_4^+ externe des conductances entrante (G_{ent}) et sortante G_{sort} d'OsHKT1. Les conductances ont été calculées à partir des courbes I-V montrées en (C) entre les potentiels -150 et 105 mV (G_{ent}) ou entre 0 et 15 mV (G_{sort}). La valeur de K_i a été déterminée à partir d'une équation hyperbolique d'ordre 1. Les données sont des moyennes \pm ES (n=4) en (A), (n=7) en (B) et (n=6) en (C) et (D).

premier travail exploratoire, que j'ai conduit dans l'ovocyte de xénope, révèle qu'*OsHKT1* est perméable à NH_4^+ mais que son activité (conductance macroscopique) est réduite en présence de ce cation (figure VI.4). Il serait aussi très intéressant d'analyser l'effet de la présence de NH_4^+ dans le milieu sur le niveau d'expression d'*OsHKT1* et des autres HKT du riz. A titre d'illustration par des travaux exploratoires, les figures VI.3 et VI.4 présentent les résultats d'une étude comparative de l'expression d'*OsHKT1* et *OsHAK1* dans la racine, réalisées par PCR semi-quantitative, révélant que la présence d'ammonium a peu ou pas d'effet sur le niveau d'expression d'*OsHKT1*, mais semble réprimer l'expression d'*OsHAK1*.

*

* *

Clairement, en conclusion, le programme de recherche sur les HKT évoqué ci-dessus, dans ses aspects le plus divers et ambitieux, ne pourrait être réalisé sans un investissement important de la communauté scientifique. L'importance de ce domaine de la physiologie végétale sur le plan fondamental, les perspectives de valorisation des connaissances correspondantes en agronomie, dans l'objectif par exemple d'augmenter la tolérance des plantes cultivées au stress salin, et l'intérêt des résultats déjà obtenus me semblent cependant complètement mériter un tel niveau d'investissement.

Références bibliographiques

- Abdelly C., Öztürk M., Ashraf M. et Grignon C. (2008). Biosaline Agriculture and High Salinity Tolerance. (Eds) Birkhäuser Verlag /L Swizerland, 367 p. 102 illus.
- Amtmann, A. et Sanders, D. (1999). Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. *Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology*. **29**: 75-112.
- Anderson J.A., Huprikar S.S., Kochian L.V., Lucas W.J. et Gaber R.F. (1992). Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**: 3736–3740.
- Apse M.P., Aharon G.S., Snedden W.A. et Blumwald E. (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter in *Arabidopsis*. *Science*. **285**: 1256-1258.
- Arazi T., Sunkar R., Kaplan B. et Fromm, H. (1999). A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni²⁺ tolerance and Pb²⁺ hypersensitivity in transgenic plants. *Plant J.* **20**: 171-182.
- Asch F., Dingkuhn M. et Dörffling K. (1997). Effects of transpiration on sodium and potassium distribution in salt-stressed irrigated rice. *J. Exp. Bot.* **48**: 39.
- Asch F., Dingkuhn M., Wittstock C. et Dörffling K. (1999). Sodium and potassium uptake of rice panicles as affected by salinity and season in relation to yield and yield components. *Plant Soil*. **207**: 133-145
- Ballesteros E., Blumwald E., Donaire J.P. et Belver A. (1997). Na⁺/H⁺ antiporter activity in tonoplast vesicles isolated from sunflower roots induced by NaCl stress. *Physiol. Plantarum*. **99**: 328–334.
- Bañuelos M.A., Klein R.D., Alexander-Bowman S.J. et Rodríguez-Navarro, A. (1995). A potassium transporter of the yeast *Schwanniomyces occidentalis* homologous to the KUP system of *Escherichia coli* has a high concentrative capacity. *EMBO J.* **14**: 3021-3027.
- Bañuelos M.A., Garcíadeblás B., Cubero B. et Rodríguez-Navarro A. (2002). Inventory and functional characterization of the HAK potassium transporters of rice. *Plant Physiol.* **130**: 784–795.
- Barhoumi Z., Djebali W., Abdelly C., Chaïbi W. et Smaoui A. (2007). Ultrastructure of *Aeluropus litoralis* leaf salt glands under NaCl stress. *J Plant Physiol.* **164**: 842-850.
- Barkla B.J. et Blumwald E. (1991). Identification of a 170-kDa protein associated with the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter of *Beta vulgaris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**: 11177-11181.
- Barkla B.J., Vera-Estrella R., Maldonado-Gama M. et Pantoja O. (1999). Abscisic acid induction of vacuolar H⁺-ATPase activity in *Mesembryanthemum crystallinum* is developmentally regulated. *Plant Physiol.* **120**: 811-819.
- Bartels D. et Nelson D. (1994). Approaches to improve stress tolerance using molecular genetics. *Plant Cell Envir.* **17**: 659-667.
- Benito B., Garcíadeblás B., Schreier P. et Rodríguez-Navarro A. (2004). Novel P-type ATPases mediate high-affinity potassium or sodium uptake in fungi. *Eukaryotic Cell.* **3**: 359–368.
- Benlloch M., Moreno I. et Rodríguez-Navarro A. (1989). Two modes of rubidium uptake in sunflower plants. *Plant Physiol.* **90**: 939-942.
- Berthomieu P., Conéjero G., Nublat A., Brackenbury W.J., Lambert C., Savio C., Uozumi N., Oiki S., Yamada K., Cellier F., Gosti F., Simonneau T., Essah P.A., Tester M., Véry A.-A., Sentenac H. et Casse, F. (2003). Functional analysis of AtHKT1 in *Arabidopsis* shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance, *EMBO J.* **22**: 2004-2014.
- Besford R.T. (1978). Effect of replacing nutrient potassium by sodium in uptake and distribution of sodium in tomato plants. *Plant Soil.* **50**: 399–409.

- Bhandal I.S. et Malik C.P. (1988). Potassium estimation, uptake, and its role in the physiology and metabolism of flowering plants. *International Rev. Cytol.* **110**: 205-254.
- Blaha G., Stelzl U., Spahn C.M.T., Agrawal R.K., Frank J. et Nierhaus K.H. (2000). Preparation of functional ribosomal complexes and effect of buffer conditions on tRNA positions observed by cryoelectron microscopy. *Methods Enzymol.* **317**: 292-309.
- Blom-Zandstra M., Vogelzang S.A. et Veen B.W. (1998). Sodium fluxes in sweet pepper exposed to varying sodium concentrations. *J. Exp. Bot.* **49**: 1863-1868.
- Blumwald. E. et Poole. R.J. (1985). Na⁺/H⁺ antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **78**: 163-167.
- Blumwald E., Aharon G.S., Apse M.P. (2000). Sodium transport in plant cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1465**: 140-151.
- Blumwald, E. (2000). Salt transport and salt resistance in plants and other organisms. *Curr Opin. Cell Biol.* **12**: 431-434.
- Blumwald, E., Aharon, G.S. et Apse, P. (2000). Na⁺ transport in plant cells. *Bioch. Bioph. Acta.* **1465**: 140-151.
- Bowling, D.J.F. (1973). A pH gradient across the root. *J. Exp. Bot.* **24**: 1041-1045.
- Boyer J.S. (1982). Plant productivity and environment. *Science* **218**: 443-448.
- Brini F., Hanin M., Mezghanni I., Berkowitz G. et Masmoudi K. (2007). Overexpression of wheat Na⁺/H⁺ antiporter TNH1 and H⁺-pyrophosphatase TVP1 improve salt and drought stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants. *J. Exp. Bot.* **58**: 301-308
- Bush D.R. (1993). Proton-Coupled Sugar and Amino Acid Transporters in Plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**: 513-542.
- Callaway A.S., Abranches R., Scroggs J., Allen G.C. et Thompson W.F. (2002). High throughput transgene copy number estimation by competitive PCR. *Plant Mol. Bio. Rep.* **20**: 265-277.
- Cellier F., Conéjero G., Ricaud L., Luu D.T., Lepetit M., Gosti F. et Casse F. (2004). Characterization of *AtCHX17*, a member of the cation/H⁺ exchangers, CHX family, from *Arabidopsis thaliana* suggests a role in K⁺ homeostasis. *Plant J.* **39**: 834-846.
- Cheeseman J.M. (1982). Pump-leak sodium fluxes in low salt corn roots. *J. Memb. Biol.* **70**: 157-164.
- Cheeseman J.M. (1988). Mechanism of salinity tolerance in plants. *Plant Physiol.* **87**: 547-550.
- Chiang P.-W., Song W.-J., Wu K.-Y., Korenberg J.R., Fogel E.J., Van Keuren M.L., Lashkari D. et Kurnit D.M. (1996). Use of a fluorescent-PCR reaction to detect genomic sequence copy number and transcriptional abundance. *Genome Res.* **6**: 1013-1026.
- Chiu J.C., Brenner E.D., DeSalle R., Nitabach M.N., Holmes T.C. et Coruzzi G.M. (2002). Phylogenetic and Expression Analysis of the Glutamate-Receptor-Like Gene Family in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Biol. Evol.* **19**: 1066-1082.
- Chomczynski P. et Mackey K. (1995). Short technical report. Modification of the TRIZOL reagent procedure for isolation of RNA from Polysaccharide-and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques* **19**: 942-5.
- Clarkson D.T. et Hanson J.B. (1980). The mineral nutrition of higher plants. *Annu Rev. Plant Physiol.* **31**: 239-298.
- Clarkson D.T. (1993). Roots and the delivery of solutes to the xylem. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **341**: 5-17.
- Crafts A.S. et Boyer T.C. (1938). Migration of salts and water into the xylem of the roots of higher plants. *Am. J. Bot.* **25**: 529-535.

- Czempinski K., Gaedeke N., Zimmermann S. et Müller-Röber B. (1999). Molecular mechanisms and regulation of plant ion channels. *J. Exp. Bot.* **50**: 955-966.
- Czempinski, K., Zimmermann, S., Ehrhardt, T. et Müller-Röber, B. (1997). New structure and function in plant K⁺ channels: KCO1, an outward rectifier with a steep Ca²⁺ dependency. *EMBO J.* **16**: 2565-2775.
- Darnell J.E. Lodish H.F. et Baltimore D. (1990). Molecular cell biology. Scientific American Books: distributed by WH Freeman, New York.
- Davenport R.J. et Tester M. 2000. A weakly voltage-dependent, nonselective cation channel mediates toxic sodium influx in wheat. *Plant Physiol.* **122**: 823-834.
- Deeken R., Sanders C., Ache P. et Hedrich R. (2000). Developmental and light-dependent regulation of a phloem-localised K⁺ channel of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **23**: 285-290.
- Deeken R., Geiger D., Fromm J., Koroleva O., Ache P., Hangenfeld-eyser, R., Sauer, N., May, S.T. et Hedrich, R. (2002). Loss of the AKT2/3 potassium channel affects sugar loading into the phloem of *Arabidopsis*. *Planta.* **216**: 334-344.
- DeFelice L.J., Adams S.V. et Ypey D.L. (2001). Single-file diffusion and neurotransmitter transporters: Hodgkin and Keynes model revisited. *BioSys.* **62**: 57-66.
- Demidchik V., Davenport R.J. et Tester M. (2002). Non-selective cation channels in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **53**: 67-107.
- Doyle D. A., Cabral M. J., Pfuetzner R. A., Kuo A., Gulbis J. M., Cohen, S. L., Chait B. T. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science.* **280**: 69-77.
- Durell S.R. et Guy H.R., (1999). Structural models of the KtrB, TrkH, and Trk1,2 symporters based on the structure of the KcsA K⁺ channel. *Biophys. J.* **77**: 789-807.
- Durell S.R., Hao Y., Nakamura T., Bakker E.P. et Guy H.R. (1999). Evolutionary relationship between K⁺ channels and symporters. *Biophys J.* **77**: 775-788.
- Eismann, E., Müller, F., Heinemann, S.H. et Kaupp, B. (1994). A single negative charge within the pore region of a cGMP-gated channel controls rectification, Ca²⁺ blockage, and ionic selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 1109-1113.
- Epstein E., Rains D. W. et Elzam O. E. (1963). Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **49**: 684-692.
- Epstein E. (1966). Dual pattern of ion absorption by plant cells and by plants. *Nature* **212**: 1324-1327.
- Epstein E., Norlyn J.D., Rush D.W., Kingsbury R.W., Kelly D.B., Cunningham G.A. et Wrona A.F. (1980). Saline culture of crops: a genetic approach. *Science* **210**: 399-404.
- Essah P.A., Davenport R. et Tester M. (2003). Sodium influx and accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **133**: 307-318.
- Fairbairn, D.J., Liu W.H., Schachtman D.P., Gomez-Gallego S., Day S.R. et Teasdale R.D. (2000) Characterisation of two distinct HKT1-like potassium transporters from *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Mol.Biol.* **43**: 515-525
- Fernando M., Kulpa J., Siddiqi M.Y. et Glass A.D.M. (1990). Potassium-dependant changes in the expression of membrane-associated proteins in barley roots. *Plant Physiol.* **92**: 1128-1132.
- Flowers T.J. et Läuchli A. (1983). Sodium versus potassium: substitution and compartmentation. *Inorg. Plant Nut.* **15**: 651-681.
- Fricke W., Leigh R.A. et Tomos A.D. (1996). The intercellular distribution of vacuolar solutes in the epidermis and mesophyll of barley leaves changes in response to NaCl. *J. Exp. Bot.* **47**: 1413-1426.

- Fu H.-H. et Luan S. (1998). AtKUP1 : a dual-affinity K⁺ transporter from *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 63-73.
- Fuchs I., Stölzle S., Ivashikina N. et Hedrich R. (2005). Rice K⁺ uptake channel OsAKT1 is sensitive to salt stress. *Planta*. **221**: 212-221.
- Fukuda A., Nakamura A., Tagiri A., Tanaka H., Miyao A., Hirochika H. et Tanaka Y. (2004). Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter from rice. *Plant Cell Physiol.* **45**: 146-59.
- Gabarino J. et DuPont F.M. (1988). NaCl induces a Na⁺/H⁺ antiport in tonoplast vesicles from barley roots. *Plant Physiol.* **86**: 231-236.
- Gabarino J. et DuPont F.M. (1989). Rapid induction of Na⁺/H⁺ exchange activity in barley root tonoplast. *Plant Physiol.* **89**: 1-4.
- Gamel K. et Torre V. (2000). The Interaction of Na⁺ and K⁺ in the Pore of Cyclic Nucleotide-Gated Channels. *Bioph. J.* **79**: 2475-2493.
- Garcia A., Rizzo C.A., UD-DIN J., Bartos S.L., Senadhira D., Flowers T.J. et Yeo A.R. (1997). Sodium and potassium transport to the xylem are inherited independently in rice and the mechanism of sodium : potassium selectivity differs from rice and wheat. *Plant Cell Environ.* **20**:1167-1174.
- Garciadeblás B., Senn M.E., Banuelos M.A. et Rodríguez-Navarro A. (2003). Sodium transport and HKT transporters: the rice model. *Plant J.* **34**: 788-801.
- Gassmann W, Schroeder JI (1994). Inward-rectifying K⁺ channels in root hairs of wheat: a mechanism for aluminum-sensitive low-affinity K⁺ uptake and membrane potential control. *Plant Physiol.* **105**: 1399-1408.
- Gassmann W., Rubio F. et Schroeder, J.I. (1996). Alkali cation selectivity of the wheat root high-affinity potassium transporter HKT1. *Plant J.* **10**: 869-882.
- Gawel N.J. et Jarret R.L. (1991). A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomoea*. *Plant Mol. Biol. Rep.* **9**: 262-266.
- Gaxiola R.A., Rao R., Sherman A., Grisafi P., Alper S.L. et Fink G.R. (1999). The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNHX1 and AVP1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 1480-1485.
- Gaxiola R.A., Li J., Undurraga S., Dang V., Allen G.J., Alper S.L. et Fink G.R. (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 11444-11449.
- Gaymard, F., Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J., Michaux-Ferrière, N., Thibaud, J-B et Sentenac, H. (1998). Identification and disruption of a plant Shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. *Cell.* **94**: 647-655.
- Gentle A., Anastasopoulos F. et McBrien N.A. (2001). High resolution semi-quantitative real-time PCR without the use of a standard curve. *Biotechniques.* **31**: 502-508.
- Ghars M.A., Parre E., Debez A., Bordenave M., Richard L., Leport L., Bouchereau A., Savoure A. et Abdelly C. (2008). Comparative salt tolerance analysis between *Arabidopsis thaliana* and *Theillungiella halophila*, with special emphasis on K⁺/Na⁺ selectivity and proline accumulation. *J. Plant Physiol.* **165**: 588-599.
- Gierth M., Mäser P. et Schroeder J.I. (2005) The potassium transporter AtHAK5 functions in K⁺ deprivation-induced high-affinity K⁺ uptake and AKT1 K⁺ channel contribution to K⁺ uptake kinetics in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* **137**: 1105-1114

- Glass A.D.M. (1977). Regulation of K⁺ influx in barley roots: evidence for direct control by internal K⁺. *Aust. J. Plant Physiol.* **4**: 313-138.
- Glass A.D.M. et Dunlop J. (1978). The influence of potassium content on the kinetics of potassium influx into excised ryegrass and barley roots. *Planta*. **141**: 117-119.
- Glass A.D.M. et Fernando M. (1992). Homeostatic processes for the maintenance of the K⁺ content of plant cells: a model. *Israël J. Bot.* **41**: 145-166.
- Glenn E., Brown J.J. et Blumwald E. (1999). Salt-tolerant mechanisms and crop potential of halophytes. *Crit. Rev. Plant Sci.* **18**: 227-255.
- Goldsmith M.H.M., Fernández H.R., Goldsmith, T.H. (1972). Electrical properties of parenchymal cell membranes in the oat coleoptile. *Planta*. **102**: 302-323.
- Gollmack D., Su H., Quigley F., Kamasani U.R., Munoz-Garay C., Balderas E., Popova O.V., Bennett J., Bohnert H.J. et Pantoja O. (2002). Characterization of a HKT-type transporter in rice as a general alkali cation transporter. *Plant J.* **31**: 529-42.
- Greenway H. et Munns R. (1980). Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **31**: 149-190.
- Hajibagheri M.A., Harvey d. M.R. et Flowers T.J. (1987). Quantitative ion distribution within root cells of salt-sensitive and salt-tolerant maize varieties. *New phytol.* **105**: 367-379.
- Halfter U., Ishitani M. et Zhu J.-K. 2000. (2000). The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 3735-3740.
- Hanson P.J., Wyn Jones R.G. et Markhart A.H. (1985). Quantifying apoplastic flux through red pine root systems using trisodium, 3-hydroxy-5,8,10-pyrenetrisulfate. *Plant Physiol.* **77**: 21-24.
- Hare P.D. et Cress W.A. (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Reg.* **21**: 79-102.
- Haro R. et Bañuelos M.A, Senn M.E., Barrero-Gil J. et Rodríguez-Navarro A. (2005). HKT1 mediates sodium uniport in roots. Pitfalls in the expression of HKT1 in yeast. *Plant Physiol.* **139**: 1495-1506.
- Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.K. et Bohnert H.J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **51**: 463-499.
- Hedrich R. et Dietrich P. (1996). Plant K⁺ channels: similarity and diversity. *Bot. Acta.* **109**: 94-101.
- Hirochika H., Fukuchi A. et Kikuchi F. (1992). Retrotransposon families in rice. *Mol. Gen. Genet.* **233**: 209-216.
- Hirochika H., Sugimoto K., Otsuki Y., Tsugawa H. et Kanda M. (1996). Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 7783-7788.
- Hirochika H. (2001). Contribution of the Tos17 retrotransposon to rice functional genomics. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 118-122.
- Hirsch, R.E., Lewis, B.D., Spalding, E.P., et Sussman, M.R. (1998). A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science.* **280**: 918-921.
- Horie T. Yoshida K., Nakayama H., Yamada K., Oiki S. et Shinmyo A. (2001). Two types of HKT transporters with different properties of Na⁺ and K⁺ transport in *Oryza sativa*. *Plant J.* **27**: 115-128.
- Horie T., Costa A., Kim T.H., Han M.J. et Horie, R. (2007). Rice OsHKT1 transporter mediates large Na⁺ influx component into K⁺-starved roots for growth. *EMBO J.* **26**: 1-14.

- Hsing Y.-I.; Chern C.-G., Fan M.-J., Lu P.-C., Chen K.-T., Lo S.-F., Sun P.-K., Ho S.-L., Lee K.-W., Wang Y.-C., Huang W.-L., Ko S.-S., Chen S., Chen J.-L., Chung C.-I., Lin Y.-C., Hour A.-L., Wang Y.-W., Chang Y.-C., Tsai M.-W., Lin Y.-S., Chen Y.-C., Yen H.-M., Li C.-P., Wey C.-K., Tseng C.-S., Lai M.-H., Huang S.-C., Chen L.-J. et Yu S.-M. (2007). A rice gene activation/knockout mutant resource for high throughput functional genomics. *Plant Mol Biol.* **63**: 351-364.
- Ichida A.M., Baizabal-Aguirre V.M. et Schroeder J.I.(1999). Genetic selection of inward-rectifying K⁺ channel mutants with reduced Cs1 sensitivity by random recombination DNA shuffling mutagenesis and mutant selection in yeast. *J. Exp. Bot.* **50**: 967-978.
- Ingham D.J., Beer S., Money S. et Hansen G. (2001). Quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants. *Biotech.* **31**: 132-134, 136-140.
- Ivashikina N. Deeken R., Ache P., Kranz E., Pommerrenig B., Sauer N. et Hedrich R., 2003. Isolation of AtSUC2 promoter-GFP-marked companion cells for patch-clamp studies and expression profiling. *Plant J.* **36**: 931-945.
- Jellouli N., Ben Jouira H., Skouri H., Ghorbel A., Gourgouri A. et Mliki A. (2008). Proteomic analysis of Tunisian grapevine cultivar Razegui under salt stress. *J. Plant Physiol.* **165**: 471-481.
- Jeon J.-S., Lee S., Jung K.-H., Jun S.-H., Jeong D.-H., Lee J., Kim C., Jang S., Yang K., Nam J., An K., Han M.-J., Han M.-J., Sung R.-J., Choi H.-S., Yu J.-H., Choi J.-H., Cho S.-Y., Cha S.-S., Kim S.-I. et An G. (2000). T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *Plant J.* **22**: 561-70.
- Karley A.J., Leigh R.A. et Sanders D. (2000). Differential ion accumulation and ion fluxes in the mesophyll and epidermis of barley. *Plant Physiol.* **122**: 835–844.
- Kato Y., Sakaguchi M., Mori Y., Saito K., Nakamura T., Bakker E.P., Sato Y., Goshima S. et Uozumi N. (2001). Evidence in support of a four transmembrane-pore-transmembrane topology model for the *Arabidopsis thaliana* Na⁺/K⁺ translocating AtHKT1 protein, a member of the superfamily of K⁺ transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 6488-6493.
- Kim C.-M., Piao H.-L., Park S.-J., Chon N.-S., Je B.-I, Sun B., Park S.-H., Park J.-Y., Lee E.-J., Kim M.-J., Chung W.-S., Lee K.-H., Lee Y.-S., Lee J.-J., Won Y.-J., Yi G.-H., Nam M.-H., Cha Y.-S. , Yun D.-Y., Eun M.-Y. et Han C.-D. (2004). Rapid, large-scale generation of *Ds* transposant lines and analysis of the *Ds* insertion sites in rice. *Plant J.* **39**: 252-263
- Kim E.J., Kwak J.M., Uozumi N. et Schröder J.I. (1998). *AtKUP1* : an *Arabidopsis* gene encoding high-affinity potassium transport activity. *Plant Cell*, **10**: 51-62.
- Kochian L.V. et Lucas, W.J. (1982). Potassium transport in corn roots. *Plant Physiol.* **70**: 1723-1731.
- Kochian L.V. et Lucas W.J. (1988). Potassium transport in roots. *Adv. Bot. Res.* **15**: 136-151.
- Köhler C., Merkle T. et Neuhaus G. (1999). Characterization of a novel gene family of putative cyclic nucleotide- and calmodulin-regulated ion channels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **18**, 97-104.
- Kramer D. (1983). The possible role of transfer cells in the adaptation of plants to salinity. *Physiol. Plant.* **58**: 549-555.
- Kumar A. et Bennetzen J.L. 1999. Plant retrotransposons. *Annu. Rev. Genet.* **33**: 479-532.
- Kumar C.S., Wing R.A. et Sundaesan V. (2005). Efficient insertional mutagenesis in rice using the maize *En/Spm* elements. *Plant J.* **44**: 879–892.
- Lacan D. (1991). Transport de Na⁺ entre les cellules de la racine et la sève du xylème. Thèse de doctorat Montpellier II. p94.

- Lacan D. et Durand M. (1995). Na⁺ and K⁺ transport in excised soybean roots. *Physiol. Plant.* **93**: 132-138.
- Lacan D. et Durand M. (1996). Na⁺-K⁺ exchange at the xylem/symplast boundary. *Plant Physiol.* **110**: 705-711.
- Lacombe B., Pilot G., Michard E., Gaymard F., Sentenac H. et Thibaud J.-B. (2000). A shaker-like K⁺ channel with weak rectification is expressed in both source and sink phloem tissues of *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **12**: 837-851
- Larher F., Leport L., Petrivalsky M. et Chappart M. (1993). Effectors for the osmoinduced proline response in higher plants. *Plant Physiol. Bioch.* **31**: 911-922.
- Latorre R., Olcese R., Basso C., Gonzalez C., Munoz F., Cosmelli D. et Alvarez O. (2003). Molecular coupling between voltage sensor and pore opening in the *Arabidopsis* inward rectifier K⁺ channel *KAT1*. *J. Gen. Physiol.* **122**: 459-469.
- Läuchli A. (1976). Symplasmic transport and ion release to the xylem. In Transport and Transfer Processes in Plants, I.F. Wardlaw and J.B. Passioura, eds (New York: Academic Press), pp. 101-112.
- Laurie S. Feeney K.A., Maathuis F.J.M., Heard P.J., Brown S.J. et Leigh R.A. (2002). A role for HKT1 in sodium uptake by wheat roots. *Plant J.* **32**: 139-149.
- Lebaudy A., Véry A.-A. et Sentenac H. (2007). K⁺ channel activity in plants: genes, regulations and functions. *FEBS Lett.* **581**: 2357-2366.
- Lefebvre D.D. (1989). Increased potassium absorption confers resistance to group IA cations in rubidium-selected suspension cells of *Brassica napus*. *Plant physiol.* **91**: 1460-1466 .
- Lehninger, A.L. (1975) the molecular basis of cell structure and function. *Biochemistry*. pp. 824-827, Worth Pub. Inc., New York.
- LeMasurier M., Heginbotham L. et Miller C. (2001). KcsA: it's a potassium channel. *J. Gen. Physiol.* **118**: 303-14.
- Leng Q., Mercier R.W., Yao W. et Berkowitz G.A. (1999). Cloning and first functional characterization of a plant cyclic nucleotide-gated cation channel. *Plant Physiol.* **121**, 753-761.
- Levigneron A., Lopez F., Vansuyt G., Berthomieu P., Fourcroy P. et Casse-Delbart F. (1995). Les plantes face au stress salin. *Cahiers d'études et de recherches Francophones/Agricultures.* **4**:263-273.
- Liman E.R., Tytgat J. et Hess P. (1992). Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs, *Neuron* **9**: 861-871.
- Liu J., Ishitani M., Halfter U., Kim C.-S. et Zhu J.-K. (2000). The *Arabidopsis thaliana* *SOS2* gene encodes protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 3730-3734.
- Liu, W. et al. (2001) Characterization of two HKT1 homologues from *Eucalyptus camaldulensis* that display intrinsic osmosensing capability. *Plant Physiol.* **127**: 283-294
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods* **25**: 402-408.
- Loew R., Rockel B., Kirsch M., Ratajczak R., Hortensteiner S., Martinoia E., Lüttge U. et Rausch T. (1996). Early salt stress effects on the differential expression of vacuolar H⁺-ATPase genes in roots and leaves of *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol.* **110**: 259-265.
- Lohaus G., Hussmann M., Pennewiss K., Schneider H., Zhu J.-J. et Sattelmacher B. (2000). Solute balance of a maize (*Zea mays* L.) source leaf as affected by salt treatment with special emphasis on phloem retranslocation and ion leaching. *J. Exp. Bot.* **51**: 1721-1732.

- Lu Z., Klem A.M et Ramu Y. (2001). Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature*. **413**: 809-813.
- Maathuis, F.J.M. et Sanders, D. (1993). Energization of potassium uptake in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. **191**: 302-307.
- Maathuis, F.J.M. et Sanders, D. (1995) Contrasting roles in ion transport of two K⁺-channel types in root cells of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **197**: 456-464.
- Maathuis F.J.M et Sanders D. (1996). Mechanisms of potassium absorption by higher plant roots. *Physiol. Plant*. **96**: 158-168.
- Maathuis F.J.M. Verlin D., Smith F.A., Sanders D., Fernández J.A. et Walker N.A. (1996). The physiological relevance of Na⁺-coupled K⁺-transport. *Plant Physiol*. **112**: 1609-1616.
- Maathuis F.J.M. et Sanders D. (2001). Sodium uptake in *Arabidopsis* roots is regulated by cyclic nucleotides. *Plant Physiol*. **127**: 1617-1625.
- Maeshima M. (2000). Vacuolar H⁺-pyrophosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*. **1465**: 37-51.
- Maresova L. et Sychrova H. (2006). *Arabidopsis thaliana* CHX17 gene complements the *kha1* deletion phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**: 1167-1671.
- Marschner H. (1971). Why can sodium replace potassium in plants?. *Proceedings of the 8th Colloquium of the International Potash Institute, Uppsala, Sweden*. Int. Potash Institute: Berne.
- Marschner H., Kirkby E.A. et Cakmak I. (1996). Effect of mineral nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. *J. Exp. Bot*. **47**: 1255-1263.
- Marschner H., Kuiper P.J.C. et Kylin A. (1981). Genotypic differences in the response of sugar-beet plants to replacement of potassium by sodium. *Physiol. Plant*. **51**: 239-244.
- Marten I. et Hoshi T. (1998). The N-terminus of the K channel KAT1 controls its voltage-dependent gating by altering the membrane electric field. *Biophys. J*. **74**: 2953-2962.
- Mäser P Thomine S., Schröder J.I., Ward J.M, Hirschi K., Sze H., Talke I.N., Amtmann A., Maathuis F.J.M., Sanders D., Harper J.F., Tchieu J., Gribskov M. et Persans M.W., Salt D.E., Kim S.A. et Guerinot M.L. (2001). Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. **126**: 1646-1667.
- McCulloch S.R., Beilby M.J., Walker N.A. (1990). Transport of potassium in *Chara australis* : II. Kinetics of symport with sodium. *J. Memb. Biol*. **115**: 129-143.
- Mengel K. et Kirkby E.A. (1982). Principles of Plant Nutrition, 3rd edn. Worblaufen-Bern, Switzerland: International Potash Institute pp. 425-426.
- Mennen H., Jacoby B. et Marschner H. (1990). Is sodium proton antiport ubiquitous in plant cells? *J. Plant Physiol*. **137**: 180-183.
- Miller A.G. et Aldrich R.W. (1996). Conversion of a delayed rectifier K⁺ channel to a voltage-gated inward rectifier K⁺channel by three amino acid substitutions. *Neuron*. **16**: 853-858.
- Miyao A., Tanaka K., Murata K., Sawaki H., Takeda S., Abe K., Shinozuka Y., Onosato K. et Hirochika H. (2003). Target site specificity of the *tos17* retrotransposon shows a preference for insertion within genes and against insertion in retrotransposon-rich regions of the genome. *Plant Cell*. **15**: 1771-1780.
- Munns R., Tonnet L., Shennan C. et Gardner P.A. (1988). Effect of high external NaCl concentration on ion transport within the shoot of *Lupinus albus*. II. Ions in phloem sap. *Plant Cell Environ*. **11**: 291-300.
- Munns R. (1993). Physiological process limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant Cell. Environ*. **16**: 15-24.

- Munns R. et Tester M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Ann. Rev. Plant Biol.* **59**: 651-681
- Murray M. et Thompson W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids. Res.* **8**: 4321-4325.
- Nakanishi N., Shneider N. et Axel R. (1990). A family of glutamate receptor genes: evidence for the formation of heteromultimeric receptors with distinct channel properties. *Neuron* **5**: 569-581.
- Nolan T., Hands R.E. et Bustin S.E. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature prot.* **3**: 1559-1582
- Obata T., Kitamoto H.K., Nakamura A., Fukuda A., Tanaka Y. (2007). Rice Shaker potassium channel OsKAT1 confers tolerance to salinity stress on yeast and rice cells. *Plant Physiol.* **144**: 1978-1985
- Pardo J.M. et Quintero F.J.(2002). Plants and sodium ions: keeping company with the enemy. *Gen. Biol.* **3**: 1017.1-1017.4.
- Perez-Alfocea F., Balibrea M.E., Alarcon J.J. et Bolarin M.C. (2000). Composition of xylem and phloem exudates in relation to the salt-tolerance of domestic and wild tomato species. *J. Plant Physiol.* **156**: 367-374.
- Périn C., Rebouillat J., Brasileiro A.M.C., Dievart A., Gantet P., Breitler J.C., Johnson A.A.T., Courtois B., Ahmadi N., De Raïssac M., Luquet D., Conte M., This D., Pati P.K., Le Q.-H., Meynard D., Verdeil J.L. et Guiderdoni E. (2007). In : Brar Darshan S. (ed.), Mackill David J. (ed.), Hardy Bill (ed.). *Rice genetics V : Proceedings of the fifth international rice genetics symposium, Manila, Philippines, 19-23 November 2005*. Londres : World Scientific, p. 117-141. International Rice Genetics Symposium. 5, 2005-11-19/2005-11-23, Manille, Philippines.
- Peterson C.A. et Enstone D.E.(1996). Functions of passage cells in the endodermis and exodermis of roots. *Physiol. Planta.* **97**: 592-598.
- Piffanelli P, Droc G., Mieulet D., Lanau N., Bès M., Bourgeois E., Rouvière C. , Gavory F., Cruaud C., Ghesquière A. et Guiderdoni E. (2007). Large-scale characterization of Tos17 insertion sites in a rice T-DNA mutant library. *Plant Mol. Biol.* **65**: 587-601.
- Pilot G. Réjane P., Frédéric G., Meyer Y. et Sentenac H. (2003). Five-group distribution of the Shaker-like K⁺ channel family in higher plants. *J. Mol. Evol.* **56**: 418-434.
- Pitman M.G. (1972). Uptake and transport of ion in barley seedling. II Evidence for two active stages in transport to the shoot. *Aust. J. Biol. Sc.* **25**: 243-257.
- Pitman M.G. (1977). Ion transport into the xylem. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **28**: 71-88.
- Pitman M.G. (1988). Whole Plants. In *Solute Transport in Plant Cells and Tissues* (eds D.A. Baker & J.L. Hall), pp. 346-391. Longman Scientific & Technical, Harlow.
- Qi Z., Hampton C.R., Shin S., Barkla B.J., White P.J. et Schachtman D.P.(2008).The high affinity K⁺ transporter AtHAK5 plays a physiological role *in planta* at very low K⁺ concentrations and provides a caesium uptake pathway in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **59**: 595-607.
- Quintero F.J. et Blatt M.R. (1997). A new family of K⁺ transporters from *Arabidopsis* that are conserved across phyla. *FEBS Lett.* **415**: 206-211.
- Raeymaekers L. (2000). Basic principles of quantitative PCR. *Mol Biotechnol.* **15**: 115-122.
- Rains D.W. et Epstein E. (1967) Sodium absorption by barley roots : role of the dual mechanisms of alkali cation transport. *Plant Physiol.* **42**: 314-318.
- Raychaudhuri A. et Majumder A.L. (1996). Salinity-induced enhancement of l-*myo*-inositol 1-phosphate synthase in rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Cell Envir.* **19**: 1437-1442.
- Reinhardt D.H. et Rost T.L. (1995). Salinity accelerates endodermal development and induces an exodermis in cotton seedlings in cotton seedling roots. *Environ. Exp. Bot.* **35**: 563-574.

- Ren D., Navarro B., Xu H., Yue L., Shi Q., Clapham D.E. (2001). A prokaryotic voltage-gated sodium channel. *Science*. **294**: 2306-2308.
- Ren Z.H., Gao J.P., Li L.G., Cai X.L., Huang W., Chao D.Y., Zhu M.Z., Wang Z.Y., Luan S. et Lin H.X. (2005). A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter, *Nat. Genet.* **37**: 1141-1146.
- Rigas S., Debrosses G., Haralampidis K., Vicente-Agullo F., Feldmann K.A., Grabov A., Dolan L. et Hatzopoulos P. (2001). *TRHI* encodes a potassium transporter required for tip growth in *Arabidopsis* root hairs. *Plant Cell* **13**: 139-151.
- Rubio F., Gassmann W. et Schröder J.I. (1995). Sodium driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science* **270**: 1660-1663.
- Rubio F., Santa-Maria G.E. et Rodriguez-Navarro A. (2000). Cloning of *Arabidopsis* and barley cDNAs encoding HAK potassium transporters in root and shoot cells. *Physiol. Plant.* **109**: 34-43.
- Rus A., Yokoi S., Sharkhuu A., Reddy M., Lee B.H., Matsumoto T.K., Koiwa H., Zhu J.K., Bressan R.A. et Hasegawa P.M. (2001). AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**:14150-14155.
- Salisbury F.B. et Ross C.W.(1992). *Plant Physiology*. Wadsworth Publ. Company, Belmont.
- Sallaud C., Gay C., Larmande P., Bes M., Piffanelli P., Piegu B., Droc G., Regad F., Bourgeois E., Meynard D., Périn C., Sabau X., Ghesquière A., Glaszmann J.C., Delseny M. et Guiderdoni E. (2004). High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: a first step towards *in silico* reverse genetics. *Plant J.* **39**: 450-464
- Sanada Y., Ueda H., Kuribayashi K., Andoh T., Hayashi F., Tamai N. & Wada K. (1995). Novel light-dark change of proline levels in halophyte (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) and glycophytes (*Hordeum vulgare* L. & *Triticum aestivum* L.) leaves and roots under salt stress. *Plant Cell Physiol.* **36**: 965-970.
- Santa-María G.E., Rubio F., Dubcovsky J. et Rodríguez-Navarro A. (1997). The *HAK1* gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. *Plant Cell* **9**: 2281-2289.
- Schachtman D. et Liu W.H. (1999). Molecular pieces to the puzzle of the interaction between potassium and sodium uptake in plants. *Trends Plant Sci.* **4**: 281-287.
- Schachtman D.P. et Schröder J.I. (1994). Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature*. **370**: 655-658.
- Schachtman D.P. (2000). Molecular insights into the structure and function of plant K⁺ transport mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **1465**: 127-139.
- Schleyer M. et Bakker E.P. (1993). Nucleotide sequence and 3'-end deletion studies indicate that the K⁺-uptake protein Kup from *Escherichia coli* is composed of a hydrophobic core linked to a large and partially essential hydrophilic C-terminus. *J. Bacteriol.* **175**: 6925-6931.
- Schönknecht G., Spoormaker P., Steinmeyer R, Bruggeman L, Ache P., Dutta R., Reintanz B., Godde M., Hedrich R. et Palme K. (2002). *KCO1* is a component of the low-vacuolar (SV) ion channel. *FEBS Lett.* **511**: 28-32.
- Schreiber L., Hartmann K., Skrabs M. et Zeier J. (1999). Apoplastic barriers in roots: Chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *J. Exp. Bot.* **50**: 1267-1280.
- Schuurink R.C., Shartz S., Fath A. et Jones R.L. (1998). Characterization of a calmodulin-binding transporter from the plasma membrane of barley aleurone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 1944-1949.

- Senn M.E., Rubio F., Bañuelos M.A. et Rodríguez-Navarro A. (2001). Comparative functional features of plant potassium HvHAK1 and HvHAK2 transporters. *J. Biol. Chem.* **276**: 44563-44569.
- Sentenac H., Bonneaud N., Minet M., Lacroute F., Salmon J. M., Gaymard F. et Grignon C. (1992). Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science*. **256**: 663-665.
- Shi H., Quintero F.J., Pardo J.M. et Zhu J.-K. (2002). The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long-distance Na⁺ transport in plants. *Plant Cell* **14**: 465-477.
- Smith J.A.C. (1991). Ion transport and the transpiration stream. *Botanical Acta*, **104**: 416-421.
- Song C.-P., Guo Y., Qiu Q., Lambert G., Galbraith D.W., Jagendorf A. et Zhu J.-K. (2004). A probable Na⁺(K⁺)/H⁺ exchanger on the chloroplast envelope functions in pH homeostasis and chloroplast development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 10211-10216.
- Song P., Cai C.-Q., Skokut M, Kosegi B.-D. et Petolino J.F. (2002). Quantitative real-time PCR as a screening tool for estimating transgene copy number in WHISKERSTM derived transgenic maize. *Plant Cell. Rep.* **20**: 948-954.
- Staal M., Maathuis F.J.M, Elzenga J.T.M., Overbeek J.H.M. et Prins H.B.A. (1991). Na⁺/H⁺ antiport activity in tonoplast vesicles from roots of the salt-tolerant *Plantago maritima* and the salt-sensitive *Plantago media*. *Physiologia Plantarum* **82**: 179-184.
- Su A., Mager S., Mayo S.L., et Lester H.A (1996). A Multi-Substrate Single-File Model for Ion-Coupled Transporters. *Biophys. J.* **70**: 762-777.
- Su H., Balderas E., Vera-Estrella R., Golldack D., Quigley F., Zhao C., Pantoja O. et Bohnert H.J. (2003). Expression of the cation transporter McHKT1 in a halophyte. *Plant Mol. Biol.* **52**: 967-980.
- Subbarao G.V., Ito O., Berry W.L. et Wheeler R.M. (2003). Sodium : a functional plant nutrient. *Critical Rev. Plant Sciences.* **22**: 391-416.
- Subbarao G.V., Wheeler R.M., Stutte G.W., Levine L.H. (1999). How far can sodium substitute for potassium in red beet? *J. Plant Nutr.* **22**: 1745-1761
- Sunarpi, Horie T., Motoda J., Kubo M., Yang H., Yoda K., Horie R., Chan W.Y., Leung H.Y., Hattori K., Konomi M., Osumi M., Yamagami M., Schröder J.I. et Uozumi N. (2005). Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na⁺ unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Plant J.* **44**: 928-938.
- Sze H., Padmanaban S., Cellier F., Honys D., Cheng N.-H., Bock K.W., Conejero G., Li X., Twell D., Ward J.M. et Hirschi K.D. (2004). Expression patterns of a novel *AtCHX* gene family highlight potential roles in osmotic adjustment and K⁺ homeostasis in pollen development. *Plant Physiol.* **136**: 2532-2547.
- Tanji K.K. (1990). Nature and extent of agricultural salinity. In: Tanji KK (ed) *Agricultural salinity assessment and management*. American Society of Civil Engineers, New York, pp 1-17.
- Tanner W. et Beevers H. (1998). Transpiration, a prerequisite for long-distance transport of minerals in plants? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**: 9443-9447.
- Tester M. (1990). Plant ion channels: whole-cell and single channel studies. *New Phytol.* **114**: 305-340.
- Tester M. et Davenport R. (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Bot.* **91**: 503-527
- Tyerman S.D. et Skerrett I.M. (1999). Root ion channels and salinity. *Scientia Horticulturae.* **78**: 175-235.

- Uozumi N. (2001). Escherichia coli as an expression system for K⁺ transport systems from plants. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **281**: 733-739.
- Uozumi N., Kim E.J., Rubio F., Yamaguchi T., Muto S., Tsuboi A., Bakker E.P., Nakamura T. et Schröder J.I. (2000). The *Arabidopsis HKT1* gene homolog mediates inward Na⁺ currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol.* **122**: 1249-1259.
- Van Enckevort J.G., Droc G., Piffanelli P., Greco R., Gagneur C., Weber C., Gonzalez V.M., Cabot P., Fornara F., Berri S., Miro B., Lan P., Rafel, Capell T., Puigdomenech P., Ouwerkerk P.B.F., Meijer A.H., Pè E., Colombo L., Christou P., Guiderdoni E., Pereira A.. (2005). EU-OSTID, a collection of transposon insertional mutants for functional genomics in rice *Plant mol. Biol.* **59**: 99-110.
- Véry, A-A., Gaymard G, Bosseux C., Sentenac H. et Thibaud J-B. (1995). Expression of a cloned plant K⁺ channel in *Xenopus* oocytes: analysis of macroscopic currents. *Plant J.* **7**: 321-332.
- Véry, A-A. et Sentenac, H. (2002). Cation channels in *Arabidopsis* plasma membrane. *Trends Plant Sci.* **7**: 168-175.
- Véry A-A. et Sentenac H. (2003). Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**: 575-603.
- Vorobiev L.N. (1967). Potassium ion activities in the cytoplasm and vacuole of cells of *Chara australis*. *Nature* **216**: 1325-1327.
- Walker D.J., Leigh R.A. et Miller A.J. (1996a). Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 10510-10514.
- Walker N.A., Maathuis F.J.M., Rubio F., Gassmann W. et Schröder J.I. (1996b). High-affinity potassium uptake in plants. *Science* **273**: 977-979.
- Wang S., Zhang Q., Maughan P.J., Saghai Maroof M.A. (1997). *Copia*-like retrotransposons in rice: sequence heterogeneity, species distribution and chromosomal locations. *Plant Mol. Biol.* **33**:1051-1058.
- Wang T.B., Gassmann W., Rubio F., Schröder J.I. et Glass A.D.M. (1998). Rapid up-regulation of HKT1, a high-affinity potassium transporter gene, in roots of barley and wheat following withdrawal of potassium. *Plant Physiol.* **118**: 651-659.
- Wilson C. et Shannon M.C. (1995). Salt-induced Na⁺/H⁺ antiport in root plasma membrane of a glycophytic and halophytic species of tomato. *Plant Sci.* **107**: 147-157.
- Wolf O., Munns R., Tonnet M.L. et Jeschke W.D. (1990). Concentrations and transport of solutes in xylem and phloem along the leaf axis of sodium chloride treated *Hordeum vulgare*. *J. Exp. Bot.* **230**: 1133-1142.
- Wolf O., Munns R., Tonnet M.L. et Jeschke W.D. (1991). The role of the stem in the partitioning of Na⁺ and K⁺ in salt-treated barley. *J. Exp. Bot.* **42**: 697-704.
- Woolley T.J.(1957). Sodium and silicon as nutrient for the tomato plant. *Plant Physiol.* **32**: 317-321.
- Wrona A.F. et Epstein E. (1985). Potassium transport in two tomato species: *Lycopersicon esculentum* and *Lycopersicon cheesmanii*. *Plant physiol.* **79**: 1068-1071
- Yadav R., Flowers T.J. et Yeo A.R. (1996). The involvement of the transpirational bypass flow in sodium uptake by high- and low-sodium-transporting lines of rice developed through intravarietal selection. *Plant Cell Environ.* **22**: 329-336.
- Yeo A.R. et Flowers T.J. (1982). Accumulation and localisation of sodium ions within the shoots of rice (*Oryza sativa*) varieties differing in salinity resistance. *Physiol Plant.* **56**: 343-348.

- Yeo A.R. et Flowers T.J. (1986). Salinity resistance in Rice (*Oryza sativa* L.) and a pyramiding approach to breeding varieties for saline soils. *Aust. J. Plant Physiol.* **13**: 161-173.
- Yeo A.R., Yeo M.E. et Flowers T.J. (1987). The contribution of an apoplastic pathway to sodium uptake by rice roots in saline conditions. *J. Exp. Bot.* **38**: 1141-1153.
- Yeo A.R., Flowers S.A., Rao G., Welfare K., Senanayake N. et Flowers T.J. (1999). Silicon reduces sodium uptake in rice (*Oryza sativa* L.) in saline conditions and this is accounted for by a reduction in the transpirational bypass flow. *Plant Cell Environ.* **22**: 559-565.
- Yokoi S., Quintero F.J., Cubero B., Ruiz M.T., Bressan R.A., Hasegawa P.M. et Prado J.M. (2002). Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. *Plant. J.* **30**: 529-539.
- Yu I.-C., Parker J. et Bent A.F. (1998). Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis dnd1* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 7819-7824.
- Zei P.C. et Aldrich R.W. (1998). Voltage-dependent gating of single wild-type and S4 mutant KAT1 inward rectifier potassium channels. *J. Gen. Physiol.* **112**: 679-713.
- Zhang H.-X. et Blumwald E., (2001). Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat. Biotech.* **19**: 765-768.
- Zhiwu L., Hansen J.L., Liu Y., Zemetra R.S. et Berger P.H. (2004). Using real-time PCR to determine transgene copy number in wheat. *Plant Mol. Biol. Rep.* **22**: 179-188.
- Zhou Y., Morais-Cabral J.H., Kaufman A. et MacKinnon R. (2001). Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature*. **414**: 43-48.
- Zhu J. (2000). New approaches of genetic analysis for quantitative traits and their applications in breeding. *J. Zhejiang Univ. (Agric. And Life Sci.)* **26**: 1-6.
- Zhu, Y., J. H. Morais-Cabral, A. Kaufman, and R. Mackinnon. (2001). Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature*. **414**: 43-48.
- Zimmermann K., Schogl D., Plaimauer B. et Mannhalter J.W. (1996). Quantitative multiple competitive PCR of HIV-1 DNA in a single reaction tube. *Biotechniques* **21**: 480-484.
- Zimmermann U., Meinzer F.C., Benkert R., Zhu J.-J., Schneider H., Goldstein G., Kuchenbrod E. et Haase A. (1994). Xylem water transport : is the available evidence consistent with the cohesion theory? *Plant Cell Env.* **17**: 1169-1181.

Adaptation des plantes au stress salin: caractérisation de transporteurs de sodium et de potassium de la famille HKT chez le riz

Le transport et la compartimentation de K^+ et Na^+ sont des fonctions essentielles chez tous les organismes vivants, animaux et végétaux, même si les mécanismes mis en place pour les réaliser sont différents dans les 2 règnes. Chez les plantes, au niveau agronomique, ces fonctions conditionnent par exemple la capacité de croissance sur un sol pauvre en K^+ ou la tolérance à un sol salé. Dans l'objectif de mieux comprendre les mécanismes responsables du transport de K^+ et Na^+ chez les plantes, nous nous sommes intéressés à la famille de transporteurs HKT en choisissant le riz comme plante modèle. Alors que la famille HKT compte 1 seul membre (perméable à Na^+ uniquement et impliqué dans le transport phloémien de cet ion) chez *Arabidopsis*, elle en compte 7 à 9 chez le riz, selon le cultivar. Notre stratégie associe des approches (1) de biologie cellulaire (hybridation *in situ*) pour préciser les patrons d'expression *in planta* de ces transporteurs, (2) d'électrophysiologie (voltage-clamp après expression en ovocyte de xénope) pour analyser leurs caractéristiques fonctionnelles, et (3) de génétique inverse (caractérisation phénotypique de lignées mutantes perte de fonction) pour étudier leurs rôles dans la plante entière. L'étude a concerné plus spécifiquement 3 transporteurs, OsHKT1, OsHKT4 et OsHKT6. Les patrons d'expression de ces 3 systèmes sont relativement larges, intégrant les tissus conducteurs, et se chevauchent souvent, par exemple dans les tissus périphériques de la racine ou les cellules bulliformes de l'épiderme foliaire. Au niveau fonctionnel, les 3 systèmes se distinguent en termes de perméabilité (OsHKT1 est perméable à la fois à K^+ et Na^+ alors que les 2 autres transporteurs ne le sont qu'à Na^+), d'affinité pour Na^+ et de rectification. Nous montrons qu'OsHKT1 présente la caractéristique de pouvoir fonctionner comme un symport Na^+-K^+ dans le domaine des faibles concentrations. L'analyse de 2 lignées mutantes *oshkt1* perte de fonction suggère que cette capacité de symport s'exprime également *in planta*, dans la racine en présence de milieux dilués. Ces données fournissent les premiers indices de l'intervention de Na^+ dans une activité de symport à haute affinité de K^+ chez les plantes.

Mots clés: *Oryza sativa*, sodium, potassium, transporteurs HKT, uniport, symport, électrophysiologie, ovocyte de Xénope, hybridation *in situ*

Plants adaptation to salt stress: characterization of sodium and potassium transporters of the HKT family in rice

Transport and compartmentalization of K^+ and Na^+ are essential functions in every organism, animal or vegetal, but the underlying mechanisms are different in the 2 reigns. In plants, at the agronomic level, these functions affect, for example, the capacity of growing on low K^+ soils or salt tolerance in saline soils. Aiming at better understanding the mechanisms responsible for K^+ and Na^+ transport in plants, we focused on the so-called HKT transporter family, using rice as a plant model. Interestingly, while a single *HKT* gene is present in the *Arabidopsis* genome, encoding a transporter permeable to Na^+ only and involved in Na^+ loading into the phloem sap, 7 to 9 *HKT* genes are present in rice, depending on cultivars. Our strategy was aimed at developing integrated analyses associating different kinds of approaches: (1) cell biology (*in situ* hybridization) to investigate HKT expression patterns *in planta*, (2) electrophysiology (voltage-clamp after expression in *Xenopus* oocytes) to analyze HKT transporter functional properties, and (3) reverse genetics (characterization of loss of function mutant lines) to study the roles of these transporters at the whole plant level. The work mainly concerned 3 HKT transporters, OsHKT1, OsHKT4 and OsHKT6. The expression patterns of these systems were found to be relatively broad and to include, in particular, vascular tissues. They were overlapping in several tissues and cell types, for example in root peripheral tissues or in bulliform cells in the leaf epidermis. At the functional level, the 3 systems were found to differ in terms of permeability (OsHKT1 is permeable to both K^+ and Na^+ while OsHKT4 and OsHKT6 are permeable to Na^+ only), of affinity for Na^+ and of rectification. Interestingly, OsHKT1 was shown to be able to mediate Na^+-K^+ symport activity in presence of low concentrations in the external medium. Characterization of two *knock-out* mutant lines "*oshkt1*" suggested that the capacity to behave as a Na^+-K^+ symport in presence of low external concentrations is found *in planta* also, in the root. These results are likely to provide the first evidence of Na^+ -driven high affinity K^+ uptake in plants.

Key words: *Oryza sativa*, sodium, potassium, HKT transporters, uniport, symport, electrophysiology, *Xenopus* oocytes, *in situ* hybridization
