UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

UPRES EA 1207 LABORATOIRE DE BIOLOGIE DES LIGNEUX ET DES GRANDES CULTURES
INRA USC 1328 ARBRES ET RÉPONSES AUX CONTRAINTES HYDRIQUES ET ENVIRONNEMENTALES

THÈSE présentée par :

Lucie BERTHEAU

Soutenue le : **19 Décembre 2013**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline : Biologie Moléculaire et Cellulaire Végétale

CARACTÉRISATION D'UN PHOSPHORELAIS MULTIPLE DE TYPE HISTIDINE–ASPARTATE DANS LA TRANSDUCTION DU SIGNAL DE LA CONTRAINTE OSMOTIQUE CHEZ LE PEUPLIER

Mécanismes de régulation du fonctionnement d'un régulateur de réponse de type-B à l'échelle moléculaire

THÈSE dirigée par :

Sabine CARPIN	Maître de conférences (HDR), Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Azeddine DRIOUICH	Professeur, Université de Rouen
Florian FRUGIER	Directeur de recherche, CNRS Gif-sur-Yvette

JURY :

Franck BRIGNOLAS	Professeur, Université d'Orléans
Sabine CARPIN	Maître de conférences (HDR), Université d'Orléans
Joel CRECHE	Professeur, Université de Tours
Azeddine DRIOUICH	Professeur, Université de Rouen
Florian FRUGIER	Directeur de recherche, CNRS Gif-sur-Yvette
Farid REGAD	Maître de conférences, Université de Toulouse, INP-ENSA Toulouse

UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

UPRES EA 1207 LABORATOIRE DE BIOLOGIE DES LIGNEUX ET DES GRANDES CULTURES
INRA USC 1328 ARBRES ET RÉPONSES AUX CONTRAINTES HYDRIQUES ET ENVIRONNEMENTALES

THÈSE présentée par :

Lucie BERTHEAU

Soutenue le : **19 Décembre 2013**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline : Biologie Moléculaire et Cellulaire Végétale

CARACTÉRISATION D'UN PHOSPHORELAIS MULTIPLE DE TYPE HISTIDINE–ASPARTATE DANS LA TRANSDUCTION DU SIGNAL DE LA CONTRAINTE OSMOTIQUE CHEZ LE PEUPLIER

Mécanismes de régulation du fonctionnement d'un régulateur de réponse de type-B à l'échelle moléculaire

THÈSE dirigée par :

Sabine CARPIN	Maître de conférences (HDR), Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Azeddine DRIOUICH	Professeur, Université de Rouen
Florian FRUGIER	Directeur de recherche, CNRS Gif-sur-Yvette

JURY :

Franck BRIGNOLAS	Professeur, Université d'Orléans
Sabine CARPIN	Maître de conférences (HDR), Université d'Orléans
Joel CRECHE	Professeur, Université de Tours
Azeddine DRIOUICH	Professeur, Université de Rouen
Florian FRUGIER	Directeur de recherche, CNRS Gif-sur-Yvette
Farid REGAD	Maître de conférences, Université de Toulouse, INP-ENSA Toulouse

Remerciements

Après plusieurs années d'aventures mémorables et intenses, de rencontres en tous genres, de moments de doutes comme de joies me voilà en train de rédiger les remerciements de ma thèse. Chose qui n'est pas aussi simple qu'il n'y parait. Il est difficile de laisser une trace de toutes les anecdotes et moments vécus au cours de ces quatre années, mais j'aimerais remercier sincèrement toutes les personnes ayant contribué à ce travail à leur façon.

Ce projet de thèse a bénéficié d'un financement de la Région Centre.

Merci aux membres du jury

Je remercie tous les membres du jury d'avoir accepté de lire et de juger ce travail de thèse. Merci à **Azeddine Driouich** et **Florian Frugier** pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Merci à **Franck Brignolas**, **Joel Creche** et **Farid Regad** d'être examinateurs de ce travail.

Merci à ceux qui ont directement contribué à ce projet

Je tiens tout d'abord à remercier **Franck Brignolas** de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir permis de mener à bien ce projet. Tu as toujours gardé un œil sur mon travail, prêt à me donner des conseils en statistique ou autre. Nos petites discussions du matin vont me manquer, je te redonne les clés de la conciergerie…

Je remercie sincèrement **Sabine Carpin**, ma directrice de thèse. Merci de m'avoir ouvert les portes du monde de la recherche et plus particulièrement celui de la transduction des signaux. Tu m'as prise sous ton aile depuis que "je suis toute petite", tu m'as formée et révélée tous les secrets de la biologie moléculaire de l'essentiel jusqu'aux choses les plus futiles mais ô combien importantes, notamment comment enfiler mes gants en salle BET !!! Merci de m'avoir accordée cette confiance au cours de ces quatre années de thèse… Notre duo de choc dure depuis 7 années au cours desquelles je me suis enrichie aussi bien professionnellement que personnellement. Je n'oublie pas que tu m'as donné l'opportunité de voyager dans le monde entier au cours de nombreux congrès scientifiques ou séminaires. Parmi ces voyages, la découverte de l'Inde reste mon plus beau souvenir et aussi le plus marquant…

Merci à **François Hericourt** de m'avoir initiée aux joies de la technique du double-hybride. Je te remercie d'avoir eu un "œil de lynx" pour repérer les fautes et autres coquilles lors de mes différentes

présentations, posters et manuscrits. Je n'oublie pas non plus les fameuses nonettes lors des petits coups de mou…

Un grand merci à **DANIEL AUGUIN** pour son implication dans ce travail. Ton optimisme sans faille (voir trop) m'a permis de me remotiver durant les moments difficiles. Merci d'avoir toujours répondu présent dès que j'en avais besoin et d'avoir cru en moi (des fois plus que moi-même !). Nos nombreuses discussions scientifiques ou autres autour d'un café (de nombreux cafés !) dans ton bureau ont fait partie intégrante de ma thèse. Le problème est que, comme tout le monde le sait au labo, on sait quand on arrive mais on ne sait pas quand on repart… Merci également pour toutes les choses essentielles que tu m'as apprises comme le plan D de comment obtenir de l'électricité sous un pylône électrique (ne pas oublier de mettre le néon dans le placard)…

Merci à **FRANÇOISE CHEFDOR** (ma voisine de paillasse) de m'avoir aidée en manip lorsque c'était le "rush". Merci d'avoir partagé ma passion pour les boîtes, « oh : elle est belle cette petite boîte ! », on ne sait jamais ce que l'on va en faire mais au final on la garde toujours !

Merci aux tourangeaux, **VINCENT COURDAVAULT**, merci pour tes multiples conseils et ton implication dans mon travail. Ta grande disponibilité et tes nombreux messages d'encouragement m'ont beaucoup touchée. **AUDREY OUDIN**, merci de ton aide précieuse et l'intérêt que tu as porté à mon travail. **GAËLLE GLEVAREC**, merci pour ta bonne humeur et ton optimisme notamment concernant les Q-PCR qui nous ont donné du fil à retordre. **EMILIEN FOUREAU** et **GREGORY GUIRIMAND**, merci de votre investissement dans ce travail, Emilien merci de ta patience notamment lors de mes nombreuses questions concernant le BiFC…

Merci à **MATHIAS BRAULT**, pour sa contribution dans ce travail et pour les nombreux conseils apportés.

Merci à **CHRISTIANE DEPIERREUX** de m'avoir initiée à la culture *in vitro*. Tu m'as toujours facilitée la tâche en enseignement notamment au cours de mon monitorat et tu as su rendre les choses simples lorsqu'elles étaient compliquées. Merci de m'avoir donnée l'opportunité d'assister durant quatre années de suite au Stage Algue de Luc sur Mer : expérience enrichissante et aussi intéressante que lorsque j'étais étudiante (à quelques détails près !). Ta tactique pour chauffer la première "ta gamelle" au four micro-ondes et nos petites conversations du midi au cours desquelles on parlait de tout et de rien me manqueront.

Merci à **DOMENICO MORABITO**, mon Papa (bon ok mon oncle si tu préfères… bon ok mon cousin), tu as toujours été là et tu as su me dépatouiller de situations critiques à des périodes stratégiques de la thèse. Certains moments vont me manquer comme notre petit café du matin, l'horoscope du midi et tous tes fameux « Hé oh, hé oh » nous rappelant à l'ordre quand nous étions dissipés… La découverte de l'Italie avec un italien (un vrai !) n'était que plus belle. Je vais peut-être commettre l'irréparable mais oui tu as raison, je l'avoue la gastronomie italienne est la meilleure du monde ! C'est écrit donc peut-être que tu t'en souviendras… (Bref, je n'ai aucune mémoire !)

Un grand merci à tous mes stagiaires d'avoir fait avancer ce travail de thèse qui était le nôtre. Vous avez participé à ma formation bien plus que vous ne le pensez, ponctuée de nombreux moments de complicité. Vous occupez donc une place particulière dans ma thèse. **MAXIME CORRAL** et **EMILIE CHANCLUD**, mes premiers étudiants qui ont marqué mes débuts en enseignement. Maxime, mon premier stagiaire, tu m'as donné l'envie de réitérer cette expérience. **MARSIA MIRANDA** et **FLAVIA MASCAGNI** avec qui j'ai passé de très bons moments. Grâce à vous, j'ai pu améliorer mon anglais au quotidien. **INES DJEGHDIR**, ma dernière stagiaire à qui je "redonne le bébé". J'espère que tu t'occuperas bien de nos RR. N'oublie pas que, même si je ne suis plus au labo, lors des broyages le port des lunettes est obligatoire, ainsi que la petite danse à la "Beyoncé".

Merci à **MELANIE LARCHER**, toujours partante pour me donner un coup de main en manip. Nos petites discussions étaient fort sympathiques !

Merci à **ALAIN GUICHARD** de nous avoir fourni le matériel végétal pour nos fameuses cultures de peupliers en hydroponie.

Merci à **VANINA GUERIN**, **MARIE-CLAUDE LESAGE DESCAUSES** et **EMMANUELLE MAGNOUX** d'avoir été patientes et à l'écoute pour passer en catastrophe quelques séquences urgentes.

Merci à **SYLVAIN CHAMAILLARD** et **REGIS FICHOT**, le duo de choc. Régis, même si je ne te connais pas beaucoup, tu as répondu présent pour m'aider et me conseiller pour l'écriture de certaines parties du manuscrit. Sylvain merci à toi aussi pour tes conseils en stat et pour m'avoir appris à dompter SPSS ! Merci pour toutes tes anecdotes dont seul toi a le secret pour les raconter. Je n'oublie pas non plus le coup de main final…

Merci à l'ensemble des personnes qui ont contribué malgré eux à cette thèse

Merci à **AURELIEN SALLE** d'avoir suivi ma thèse de loin (comme quoi finalement tu aimes bien la biologie moléculaire), de m'avoir coachée avec des petites phrases quotidiennes comme « alors la rédaction ça en est où ? ». Merci de t'être toujours intéressé à ce que je faisais et notamment à mes western-blot (dommage que ta proposition brillante de les réaliser déguisé en cowboy n'ait pas marché !). Merci d'avoir partagé avec moi des moments uniques que seul toi peux comprendre comme ce fameux midi où les "Raides Nattes" sont nées… !

Merci à **RICHARD BOUCEFFA** (mon copain de fief) pour m'avoir fait rire même dans les moments où je n'en avais pas envie. Merci d'avoir été là pour tout et n'importe quoi (surtout n'importe quoi !). Je n'oublierai pas nos nombreuses discussions et fous rires où seul un regard suffisait à les déclencher. Merci également de t'être toujours intéressé à ce que je faisais (« tu fais quoi ? ») et d'avoir écouté par la suite mes explications concernant la biologie moléculaire (merci à la série Les Experts de m'avoir facilité la tâche). Le pRT restera gravé et tu sais bien où… Les thésards doivent un jour quitter le labo, mais saches qu'eux aussi sont tristes de quitter les gens qu'ils apprécient… !

Merci à **LAURENT JEAN-ALPHONSE** dit "l'homme qui sent bon" pour les nombreuses discussions autour d'un café et de m'avoir apporté ton aide administrative (frais de missions et autres paperasseries…).

Merci à tous les doctorants et post-doctorants et les nombreux stagiaires qui ont contribué à faire de cette thèse un moment agréable. **FRANCE DARDEAU**, la personne la plus dévouée envers les autres, merci d'avoir milité pour créer un lien entre les doctorants et bon courage pour la dernière ligne droite ! **JUSTINE GUET**, merci pour ton sens de l'humour. Et merci à tous les anciens, **SOPHIE POINTEAU**, **JULIEN TOILLON**, **CLAIRE HEBRARD** et **CLEMENT LAFON-PLACETTE**, merci pour votre soutien durant ces années de thèse, **CECILE MONTGIRAUD**, cette année passée au labo en ta compagnie était bien sympa. Merci à **JULIEN CLEMOT**, d'avoir travaillé dans toutes les équipes mais de ne jamais avoir intégré la nôtre ! En tout cas, tes péripéties nous aurons bien fait rire !

Merci à **VALERIE ALTEMAYER** et **ERIC DUVERGER**, mes responsables d'enseignement durant mon année d'ATER, de m'avoir accompagnée et encadrée au cours de cette année. Merci également à **CARINE MARTIN** et **ISABELLE LE JAN** pour leur aide dans la préparation des salles de TP, Carine merci d'avoir papoté ensemble au labo entre deux gels.

Merci à **JEAN-CLAUDE VALA**, pour toutes ses histoires plus extravagantes les unes que les autres.

Merci à **XAVIER PINEAU**, tu as toujours eu un petit mot sympathique et merci pour ces pauses café.
Merci à **FRANÇOIS LIEUTIER** d'avoir pris la peine d'écouter mes multiples présentations sur la voie de signalisation depuis mon M1. Et surtout un grand merci, pour avoir dit cette terrible phrase « il y a 24h dans une journée » qui prend tout son sens en fin de thèse…
Merci à **MURIEL FEINARD-DURANCEAU** et à **CECILE BARBAROUX-VINCENT** d'avoir pris le temps de m'expliquer le fonctionnement du fameux LICOR, à **ALAIN DELAUNAY** de ne pas avoir hésité à me dépanner quand j'en avais besoin, à **MATHILDE BAUDE**, **STEPHANIE BANKHEAD-DRONNET**, **SYLVAIN BOURGERIE** d'avoir contribué à la bonne humeur du midi, à **STEPHANE MAURY** pour les nombreuses viennoiseries du matin, et à **DANIEL HAGEGE** pour avoir facilité l'obtention d'une bourse ERASMUS me permettant d'effectuer un séminaire en Italie.

Merci à **FRANCK ROGEON** pour sa gentillesse, sa disponibilité et les coups de main de dernière (toute dernière!) minute.

Merci à **ANDRE LASFARGUES** (dit "Dédé") pour le prêt d'un ordinateur lorsque le mien commençait à peiner et pouvait lâcher à tout moment.

Merci à ma famille et à mes proches

Merci à **JEAN-PIERRE**, **DENISE**, **SEB** et **DELPH** de votre soutien et de votre contribution à votre manière dans cette thèse… Merci pour toutes ces petites attentions et les nombreux paniers garnis. Et non désolée Jean-Pierre je ne sais toujours pas combien de litres par jour un peuplier peut puiser…

Merci à **mon père**, **ma mère**, **ma grande sœur** et **PF** d'avoir suivi toute cette aventure et donc d'avoir partagé avec moi les bons comme les mauvais moments. Merci papa et maman de vous être toujours intéressés à mon travail même si pour vous la biologie moléculaire reste encore un mystère… Merci d'avoir été compréhensifs et indulgents, et d'avoir été aux petits soins surtout pendant la phase de rédaction. Désolée de vous avoir fait subir les désagréments d'une thèse une deuxième fois, mais heureusement vous n'avez que deux filles… Merci à ma sœur pour ses nombreux conseils et son écoute attentive… Bref, merci d'avoir été tout simplement là.

Et pour finir, le plus grand des mercis à **VINCENT** pour ton soutien sans faille. Sans toi, je n'en serai pas arrivée là, mais ça tu le sais déjà…

Sommaire

LISTE DES PRINCIPALES ABRÉVIATIONS 15

LISTE DES FIGURES 17

LISTE DES TABLEAUX 21

INTRODUCTION GÉNÉRALE 25

I. Impact de la contrainte hydrique sur le fonctionnement des plantes 27

I.1 Réponses physiologiques mises en place par la plante face à un déficit hydrique 28

I.2 L'ABA, chef d'orchestre de réponses moléculaires générées par la plante lors d'un stress hydrique 30

II. Implication des relais de phosphorylation de type histidine/aspartate dans la perception et la transduction de signaux 41

II.1 Les relais de phosphorylation chez les procaryotes 41

II.2 Les relais de phosphorylation chez les eucaryotes 47

III. Le peuplier : Plante ligneuse modèle 90

II.1 Caractéristiques botaniques et préférences écologiques 90

II.2 Une plante ligneuse d'intérêt agronomique 92

II.3 Une plante ligneuse d'intérêt scientifique 92

IV. Problématiques et objectifs du travail de thèse 94

MATÉRIELS ET MÉTHODES 99

I. Matériels 101

I.1 Matériels biologiques 101

I.2 Milieux de culture 102

II. Méthodes 103

II.1 Conditions de culture et des traitements appliqués 103

II.2 Méthodes de transformation du matériel biologique 106

II.3 Extraction, purification et analyse des acides nucléiques 108

II.4 Réactions de polymérisation en chaîne (PCR) et ses méthodes dérivées 111

II.5 Clonages dans les vecteurs plasmidiques 116
II.6 Double-hybride 123
II.7 Mesure d'interaction Protéine-Protéine par reconstitution de fluorophore (BiFC) 126
II.8 Localisation subcellulaire des protéines 127
II.9 Expériences d'expression transitoire dans les cellules de *C. roseus* 128
II.10 Production et purification de protéines recombinantes 129
II.11 Expériences de retard sur gel ou EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assays) 131
II.12 Expériences de "GST ou 6xHis pull-down" 132
II.13 Dichroïsme circulaire 133
II.14 Analyse phylogénétique 134
II.15 Analyses statistiques 134

PARTIE I : IDENTIFICATION DES PARTENAIRES DE HK1 DANS LA TRANSDUCTION DU SIGNAL DE LA CONTRAINTE OSMOTIQUE 137

Chapitre I
Caractérisation fonctionnelle de HK1 et Recherche d'interacteurs spécifiques parmi les membres de la famille HPt 139

I. Présentation de l'article 141
II. Principaux résultats 141

Article I 143
Characterisation of histidine-aspartate kinase HK1 and identification of histidine phosphotransfer proteins as potential partners in a Populus multistep phosphorelay

III. Etudes complémentaires 158

Chapitre II
Validation des interactions des HPt partenaires avec le récepteur HK1 in planta 161

I. Présentation de l'article 163
II. Principaux résultats 163

Article II 164
In planta validation of HK1 homodimerization and recruitment of preferential HPt downstream partners involved in poplar multistep phosphorelay systems

III. Etudes complémentaires 169

Chapitre III
Identification des RR-B partenaires des HPt interacteurs de HK1 173

I. Présentation de l'article 175
II. Principaux résultats 175

Article III 177
Identification of five B-type response regulators as members of the multistep phosphorelay system interacting with histidine-containing phosphotransfer partners of Populus osmosensor

III. Etudes complémentaires 193
III.1 Résultats 193
III.2 Discussion 203

Discussion 207

I. Caractérisation fonctionnelle de HK1 209
II. Partenariat d'interactions préférentielles en aval de HK1 211

PARTIE II : CARACTÉRISATION DU MODE DE FONCTIONNEMENT DES RÉGULATEURS DE RÉPONSE DE TYPE-B 215

Chapitre I
Mécanismes de régulation du fonctionnement du RR13 217

I. Introduction 219
I.1 Les RR-B, des facteurs de transcription uniques retrouvés chez les plantes, à l'architecture conservée 219
I.2 La dimérisation des domaines DDK : un mécanisme envisagé pour une régulation des RR 225
I.3 Interactions spécifiques inter- ou intra-moléculaire dans l'obtention de conformations active ou inactive : le niveau de régulation supplémentaire 228

II. Objectifs et stratégies 230

III. Résultats 231
III.1 Le RR13 est un facteur de transcription 231
III.2 Le RR13 dimérise *via* une interface d'interaction α4-ß5-α5 conservée 234
III.3 La fonction de facteur de transcription du RR13 serait régulée par interaction du domaine GARP sur le domaine DDK 246

IV. Discussion 261

Chapitre II
Caractérisation de l'implication de RR-B dans la voie "osmosensing" 269

I. Introduction 271

II. Objectifs et stratégies 273

III. Résultats 274
III.1 Interaction *in vitro* entre le domaine GARP du RR13 et des sondes ADN comportant les séquences *cis* de reconnaissance des RR-B 274
III.2 Analyse des régulations transcriptionnelles de deux gènes potentiellement régulés par la contrainte osmotique 275
III.3 Analyses bio-informatiques des promoteurs des deux gènes régulés par la contrainte osmotique 279

IV. Discussion 282

Discussion 287

I. Quels avantages apporte la forme dimere constitutif aux RR-B de plantes ? 289
II. Comment interviennent les RR-B de peuplier dans la voie de signalisation de la contrainte osmotique ? 292
III. Quel est le mécanisme de fonctionnement d'un RR-B de la récéption de son phosphate à sa fixation sur l'ADN ? 293

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 297

I. Détection du signal provoqué par un manque d'eau cellulaire par les HK 300
I.1 Quels sont les éléments structuraux des HK qui pourraient être impliqués dans la perception de la contrainte osmotique ? 300
I.2 La contrainte osmotique provoquerait-elle une phosphorylation de HK1 ? 302
I.3 Sous quel état, dimérique ou monomérique, le récepteur percevrait-il le signal ? 302

II. Spécificité des relais de phosphate entre partenaires dans la mise une place d'une réponse appropriée 304

II.1 Existe-t-il des différences d'affinité entre ces différents partenaires ? 304
II.2 Comment la spécificité de réponse est modulée par les RR de type-B ? 305

III. Lien entre la voie du phosphorelais multiple orchestrée par un osmosenseur et la voie dépendante de l'ABA 306

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 309

ANNEXES 349

Liste des principales abréviations

2,4-D	acide 2,4-dichlorophénoxy-acétique
3AT	3 amino-1,2,4-triazole
aa	acides aminés
ABA	acide abscissique
ABRE	abscisic acid responsive element
AD	activation domain
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AHP	*Arabidopsis* histidine phosphotransfer
Aj	acide jasmonique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ARR	*Arabidopsis* response regulator
APS	ammonium persulfate
IPTG	isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
Asp	aspartate
ATP	adénosine tri-phosphate
BSA	bovine serum albumin
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
BD	binding domain
BiFC	bimolecular fluorescence complementation
bZIP	basic domain leucine zipper
CA	catalytic ATP binding domain
CD	circular dichroism
CDPK	calcium dependent protein kinase
CFP	cyanfluorescent protein
C.I	chloroforme:alcool isoamylique
CK	cytokinine
CP	cytoplasmic part
CRM	cytokinin response motif
DBD	DNA binding domain
DE	domaine effecteur
DEPC	diéthyl pyrocarbonate
DIC	differential interference contrast
dNTP	désoxyribonucléide
DS	domaine senseur
DHp	dimerization histidine containing phosphotransfer domain
DO	densité optique
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylene diamine tetra-acetic acid
FT	facteur de transcription
GFP	green fluorescent protein
GST	glutathion S-transférase
GUS	β-glucuronidase
His	histidine
HK	histidine-aspartate kinase
HPt	histidine containing phosphotransfer
IPTG	isopropyl-1-thio-ß-D-galactopyranoside
kDa	kiloDalton
LB	luria bertani
MAPK	mitogen activated protein kinase
NLS	nuclear localisation signal
ONPG	orthonitrophenyl-β-D-galactopyranoside
pb	paire de bases
PCR	polymerase chain reaction
PDB	protein Data Bank
PEG	polyéthylène glycol
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
RD	Receiver Domain
ROS	reactive oxygen species
rpm	round per minute
RR	response regulator
RT-PCR	reverse transcription PCR
SDS	dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
TCS	two Component System
TD	transmitter Domain
TM	transmembrane
TEMED	N,N,N',N'-tétra-méthyl-éthylènediamine
YFP	yellow fluorescent protein
YPD	yeast peptone dextrose
λEm	longueur d'onde d'émission
λEx	longueur d'onde d'excitation
Ψosm	potentiel osmotique
Ψp	potentiel de turgescence
Ψtot	potentiel hydrique

Liste des figures

FIGURE 1 28
Circulation de l'eau dans la plante depuis le sol selon le gradient de potentiel hydrique

FIGURE 2 32
Modèle de la voie de signalisation ABA chez *Arabidopsis thaliana*

FIGURE 3 35
Schéma récapitulatif de la transduction du signal ABA dans les cellules de garde

FIGURE 4 40
Schéma récapitulatif des voies dépendante et indépendante de l'ABA

FIGURE 5 42
Organisation du système à deux composants chez les procaryotes

FIGURE 6 46
Exemples de différents systèmes de transduction des signaux chez les bactéries

FIGURE 7 48
Evolution du nombre de membres des molécules impliquées dans les phosphorelais de type histidine/aspartate

FIGURE 8 53
Schéma de l'organisation des voies SLN1 et SHO1 chez *S. cerevisiae*

FIGURE 9 56
Famille des Histidine aspartate Kinase chez *Arabidopsis thaliana*

FIGURE 10 71
Famille des Régulateurs de Réponse chez *Arabidopsis thaliana*

FIGURE 11 83
Modèle de la voie de transduction Ethylène

FIGURE 12 85
Modèle de la voie de transduction Cytokinine

FIGURE 13 91
Classification des espèces du genre *Populus* regroupées en six sections botaniques

FIGURE 14 93
Répartition mondiale des peuplements naturels et artificiels de peupliers

FIGURE 15 104
Photographies des boutures de peuplier durant la croissance en hydroponie

FIGURE 16 115
Schéma du principe de la mutagénèse dirigée par PCR

FIGURE 17 158
Alignement des séquences protéiques de l'ensemble des HPt de peuplier

FIGURE 18 194
Alignement des séquences protéiques de l'ensemble des RR-B de peuplier

FIGURE 19 195
Arbre phylogénétique des membres de la famille des RR de type-B

FIGURE 20 196
RR18 interagit avec les HPt2, 7 et 9 en système double-hydride dans la levure

FIGURE 21 196
Mesure des activités ß-Galactosidase des interactions HPt/RR de type-B

FIGURE 22 197
Interaction du RR18 avec les HPt2, 7 et 9 *in planta* par BiFC

FIGURE 23 199
Suivi des conductances stomatiques des plants stressés au PEG_{6000}

FIGURE 24 200
Expression relative des transcrits du *RR13* dans les différents organes de boutures de peuplier en condition témoin

FIGURE 25 201
Expression relative des transcrits du *RR13* dans les différents organes de boutures de peuplier soumises à une contrainte osmotique au PEG_{6000}

FIGURE 26 202
Expression relative des transcrits du *RR18* dans les différents organes de boutures de peuplier en condition témoin

FIGURE 27 203
Expression relative des transcrits du *RR18* dans les différents organes de boutures de peuplier soumises à une contrainte osmotique au PEG_{6000}

FIGURE 28 205
Expression relative des transcrits du *RR13* et *RR18* dans les différents organes de boutures de peuplier en condition témoin

FIGURE 29 221
Alignement du domaine GARP chez plusieurs espèces de plantes

FIGURE 30 221
Schéma topologique des structures secondaires du domaine GARP

FIGURE 31 223
Diagramme des architectures contenant le domaine receveur présentes chez les organismes référencés notamment chez *Populus* dans la banque de données Uniprot

FIGURE 32 224
Schéma topologique des structures secondaires du domaine receveur DDK

FIGURE 33 226
Les différents modes de dimérisation des domaines receveurs des RR bactériens

FIGURE 34 232
Alignement des séquences des domaines receveurs DDK et GARP, et de la partie charnière les séparant, des différents RR-B de peuplier

FIGURE 35 233
Profil de la propension au désordre de la protéine RR13 prédit par IUPred

FIGURE 36 234
Le RR13 de peuplier active le promoteur d'un gène de RR de type-A d'*Arabidopsis*

FIGURE 37 240
Alignement de séquences des domaines receveurs de protéines, sélectionnées à partir d'une base de données, appartenant à plusieurs espèces

FIGURE 38 241
Visualisation en 3D du modèle de dimère formé par le DDK du RR13 de peuplier

FIGURE 39 242
Basculement du RR13 d'un état dimérique vers un état monomérique : choix des mutations à réaliser

FIGURE 40 244
Validation de la dimérisation du RR13 par son DDK et du choix des positions clés de son état monomérique en levure

FIGURE 41 245
Validation de la dimérisation du RR13 *in planta*, et du mutant E123K-M105K

FIGURE 42 249
Modèle d'interaction des domaines GARP/DDK

FIGURE 43 251
Basculement du RR13 en conformation ouverte : choix des mutations à réaliser

FIGURE 44 253
Analyses de la production et de la purification de la protéine recombinante 6xHIS-DDK

FIGURE 45 254
Analyses de la production et de la purification de la protéine recombinante GST-GARP

FIGURE 46 255
Capacité du domaine GARP à interagir avec le domaine DDK *in vitro*

FIGURE 47 257
Capacité du domaine GARP à interagir avec le domaine DDK mutant *in vitro*

FIGURE 48 260
Dichroïsme circulaire dans l'UV lointain réalisé sur le domaine DDK du FT RR13

FIGURE 49 275
Interaction entre le domaine GARP du RR13 et des sondes ADN comportant les éléments de réponse des ARR de type-B

FIGURE 50 276
Expression relative des transcrits de *peudhn1* dans les différents organes en condition témoin

FIGURE 51 277
Expression relative des transcrits du gène *peudhn1* dans les différents organes de peuplier soumis à une contrainte osmotique au PEG_{6000}

FIGURE 52 278
Expression relative des transcrits du gène *HK1* dans les différents organes en condition témoin

FIGURE 53 279
Expression relative des transcrits du gène *HK1* dans les différents organes de peuplier soumis à une contrainte osmotique au PEG_{6000}

FIGURE 54 280
Séquence nucléotidique du promoteur en amont du gène *peudhn1* du peuplier génotype Dorskamp

FIGURE 55 281
Séquence nucléotidique du promoteur en amont du gène *HK1* du peuplier génotype Dorskamp

FIGURE 56 294
Modèle en 3D de la structure d'un RR de type-B

Liste des tableaux

TABLEAU 1 54
Les partenaires du phosphorelais multiple identifiés chez plusieurs espèces de plantes

TABLEAU 2 61
Résumé des principales caractéristiques des récepteurs HK chez *Arabidopsis*

TABLEAU 3 70
Résumé des principales caractéristiques des HPt chez *Arabidopsis*

TABLEAU 4 73
Récapitulatif des interactions entre les récepteurs HK et les HPt, entre les RR et les HPt chez *Arabidopsis*

TABLEAU 5 78
Résumé des principales caractéristiques des régulateurs de réponse de type-A chez *Arabidopsis*

TABLEAU 6 79
Résumé des principales caractéristiques des régulateurs de réponse de type-B chez *Arabidopsis*

TABLEAU 7 80
Résumé des principales caractéristiques des régulateurs de réponse de type-C chez *Arabidopsis*

TABLEAU 8 102
Souches utilisées d'*E. coli*

TABLEAU 9 102
Composition de la solution nutritive utilisée pour la culture en hydroponie des boutures

TABLEAU 10 103
Composition des milieux de culture bactérienne

TABLEAU 11 103
Composition des milieux de culture levure

TABLEAU 12 111
Composants d'une PCR

TABLEAU 13 111
Programme d'une PCR

TABLEAU 14 113
Séquences des amorces utilisées pour la RT-PCR relative

TABLEAU 15 114
Séquences des amorces utilisées pour la RT-PCR en temps réel

TABLEAU 16 115
Conditions PCR pour la mutagénèse dirigée

TABLEAU 17 117
Résumé des matrices plasmidiques et amorces utilisées pour la mutagénèse

TABLEAU 18 118
Résumé des clonages réalisés dans pLex et pGAD

TABLEAU 19 119
Résumé des clonages effectués pour le BiFC

TABLEAU 20 120
Résumé des clonages effectués pour la localisation cellulaire

TABLEAU 21 121
Résumé des conditions de clonage dans le pSCA-cassette GUS

TABLEAU 22 121
Résumé des conditions de clonage dans les plasmides pGEX-5X-1 et pET15b

TABLEAU 23 123
Résumé des conditions de clonage dans le plasmide pRT104

TABLEAU 24 127
Détails des cubes de fluorescence utilisés pour les différents fluorochromes

TABLEAU 25 132
Séquences des amorces utilisées et des sondes ADN

TABLEAU 26 271
Descriptif des séquences *cis* reconnues par les ARR de type-B

Introduction Générale

Les plantes sont des organismes sessiles et doivent en permanence faire face aux contraintes environnementales. Ces contraintes peuvent être d'origine biotique (insectes, pathogènes bactérien ou fongique) ou d'origine abiotique, regroupant des contraintes édaphiques (contrainte hydrique, salinité, déficit de nutriments…) et atmosphériques (augmentation des températures, vent…) qui s'exercent en permanence avec plus ou moins d'amplitude sur ces organismes. Le manque d'eau ou déficit hydrique est l'une des contraintes abiotiques les plus drastiques pour le fonctionnement des plantes.

I. IMPACT DE LA CONTRAINTE HYDRIQUE SUR LE FONCTIONNEMENT DES PLANTES

La notion de déficit hydrique décrit la situation dans laquelle la quantité d'eau disponible pour la plante est insuffisante pour répondre à ses besoins essentiels. Ce manque d'eau survient couramment lors de périodes de sécheresse induisant une diminution de la disponibilité en eau du sol. Il peut également être provoqué lorsqu'une plante croît dans un environnement riche en sel, conduisant à une altération des teneurs en osmolytes et donc des perturbations de l'absorption de l'eau. Ce manque d'eau peut être aussi induit à la suite d'une période de froid, où l'on peut voir des cas de déshydratation cellulaire notamment liés à la formation de glace dans l'espace intercellulaire. Ceci dit, la sécheresse reste parmi ces contraintes, celle qui affecte le plus drastiquement la productivité agricole, avec 64% des surfaces cultivées dans le monde touchées (Cramer *et al.*, 2011).

La circulation de l'eau dans la plante entière s'effectue selon un gradient de potentiel hydrique (FIGURE 1). L'eau circule depuis le sol (potentiel hydrique proche de 0) jusqu'aux feuilles (potentiel hydrique très négatif) qui est le lieu de la transpiration. Ainsi, l'eau se déplace des potentiels les plus élevés ("humides", proches de zéro) vers les potentiels les plus faibles ("secs", plus négatifs). La cellule considérée comme l'unité de base d'un ensemble plus vaste, organe ou tissu de la plante, peut être également définie par son potentiel hydrique (Ψ_{TOT}). Ce potentiel hydrique, qui permet donc de prédire à tout moment le sens et l'intensité des mouvements d'eau, résulte de deux composantes : la composante hydrostatique ou potentiel de turgescence (Ψ_P) qui est la pression exercée par le protoplaste sur la paroi (comptée positivement), et la composante osmotique ou potentiel osmotique (Ψ_S) liée à l'accumulation en solutés (comptée négativement, sa valeur absolue diminue avec la concentration en osmolytes). Le potentiel hydrique cellulaire est donc définit par :

$$\Psi_{TOT} = \Psi_P + \Psi_{OSM}$$

(Ψ_{TOT} est soit égal à 0 soit inférieur à 0 dans la cellule)

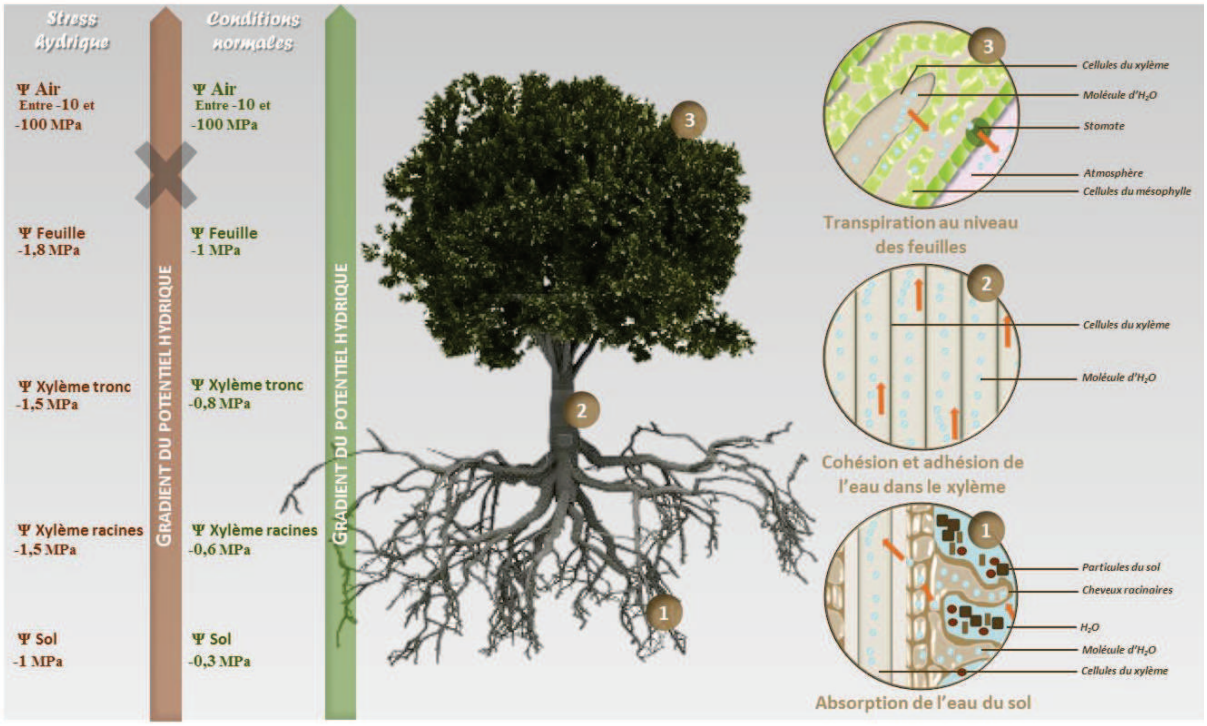


FIGURE 1 – Circulation de l'eau dans la plante depuis le sol selon le gradient de potentiel hydrique

Modifiée d'après www.as.miami.edu/biology/ et Tardieu *et al.* (2010)

La circulation de l'eau dans la plante s'effectue selon un gradient appelé "gradient de potentiel hydrique". Plus la différence entre les potentiels hydriques du sol et des feuilles est grande plus le flux d'eau parcourant la plante est fort (en supposant une résistance au flux faible). En conditions normales de croissance, l'eau est peu retenue dans le sol (1) (potentiel hydrique élevé) ce qui est en faveur de son absorption par les racines. L'eau est ensuite transportée *via* le xylème (2) vers les feuilles (potentiel hydrique plus faible) (3) dans lesquelles les stomates ouverts modulent les pertes en eau par transpiration. En cas de contrainte hydrique, la fermeture des stomates permet de limiter les pertes d'eau à court terme. Néanmoins, si l'intensité ou la durée de la contrainte augmente, le potentiel hydrique du sol et celui de la plante continuent de diminuer, d'où des dysfonctionnements possibles de la plante.

Au niveau cellulaire, une contrainte hydrique provoquée par une dessiccation ou par l'apport d'un agent osmolyte quel qu'il soit, engendre une contrainte osmotique. Ainsi, cette notion de contrainte ou stress osmotique sera utilisée tout au long du manuscrit.

I.1 Réponses physiologiques mises en place par la plante face à un déficit hydrique

Une diminution de la disponibilité en eau du sol (FIGURE 1) provoque chez la plante, un stress, pouvant être défini comme toute modification des conditions de croissance qui bouleverse l'homéostasie des cellules et qui nécessite un ajustement des voies métaboliques durant la phase d'acclimatation (Shulaev *et al.*, 2008). Ainsi, la perception de ce changement de disponibilité en eau entraine une réponse ou acclimatation de la plante, *via* notamment un ajustement de son propre état

hydrique grâce à divers mécanismes intervenant de façon chronologique (Tardieu *et al.,* 2007). Au niveau moléculaire, une grande part de ces processus physiologiques identifiés est gouvernée par les voies de signalisation de l'acide abscissique (ABA), évoqués dans un premier temps dans cette section, et également développés ultérieurement.

A court terme, **la conductivité hydraulique des racines**, paramètre traduisant la facilité avec laquelle l'eau circule dans les racines, **est diminuée** (Maurel *et al.,* 2010). De plus, la fermeture des stomates (principalement contrôlée par la synthèse d'ABA) permet de **limiter les pertes en eau par transpiration** (Schroeder *et al.,* 2001). En outre, la perte d'eau au niveau des cellules entraine **une rigidification des parois cellulaires** observée au niveau de certains organes (Moore *et al.,* 2008). Elle se produit en à peine quelques minutes dans des plants de maïs, à la suite d'un traitement au Polyéthylène glycol (PEG) qui diminue la disponibilité en eau (Cf. MATÉRIELS ET MÉTHODES, section II.1.a.2) (Chazen & Neumann, 1994). Ce phénomène de rigidification serait corrélé à une diminution de l'expression de plusieurs gènes codant des protéines expansines, dont le rôle essentiel contribue à l'assouplissement de la paroi (Muller *et al.,* 2007). **L'élongation cellulaire** est définie comme l'augmentation du volume des organes par entrée d'eau dans les cellules en croissance. Son taux, déterminé par les capacités d'extensibilité des parois et le potentiel osmotique cellulaire (Bartels & Sunkar, 2005), est alors diminué dans un laps de temps court (Tardieu *et al.,* 2011).

A moyen terme, afin de maintenir la turgescence des cellules, un **ajustement osmotique** s'opère au sein de la cellule, considéré comme le processus crucial de la réponse des plantes face à une contrainte hydrique. Dans les racines, ce phénomène est primordial, d'une part, pour assurer une absorption d'eau en maintenant un potentiel hydrique plus négatif que celui du sol, et d'autre part, pour maintenir leur croissance, ce malgré la diminution de l'eau disponible dans le sol (Chaves *et al.,* 2003). Cet ajustement est effectué *via* l'accumulation de solutés organiques, molécules non toxiques qui n'interfèrent pas avec le métabolisme de la cellule et s'accumulent principalement dans le cytoplasme à forte concentration (Bartels & Sunkar, 2005). Ces molécules considérées comme osmoprotecteurs sont de natures variées comme des polyols et des sucres (mannitol, sorbitol, glucose, hexose, oligo-saccharose…), des acides aminés, tels que la proline, ou des molécules proches telle que la glycine bétaïne (Chen & Murata, 2002).

A long terme, la fermeture des stomates mise en place pour conserver un état hydrique foliaire suffisant à la survie de la plante provoque un **ralentissement de la photosynthèse.** La faible quantité d'assimilâts carbonés accumulés est principalement allouée aux racines, ce qui contribue également à la baisse de croissance des parties aériennes (carence métabolique). De plus, l'énergie

solaire n'étant pas complètement utilisée au niveau de la feuille, l'**apparition de formes réactives d'oxygène (ROS)** impacte les structures cellulaires et le métabolisme (Bartels & Sunkar, 2005) en provoquant un stress oxydatif. Par la suite, la **croissance de nombreux organes de la plante diminue** (Boyer, 1970; Nonami & Boyer, 1990a). L'altération de la croissance dépend de la sévérité et de la durée de la contrainte (Bartels & Sunkar, 2005), et est variable en fonction des tissus ou des organes considérés. En effet, lors d'un stress modéré, la croissance des racines serait moins affectée que celle des parties aériennes (Westgate & Boyer, 1985; Saab *et al.,* 1990), ce qui contribue à explorer d'autres zones du sol pour maintenir une absorption d'eau, tandis que la réduction de la surface foliaire permet de diminuer la transpiration de la plante. Elle est la conséquence entre autre : i) de la diminution de la turgescence (Bouchabké *et al.,* 2006), ii) de la diminution de l'extensibilité des parois cellulaires (Nonami & Boyer, 1990b) qui doivent normalement autoriser la croissance cellulaire (Cosgrove, 2005), iii) de la diminution de la vitesse de division cellulaire (Granier *et al.,* 2000). La possible implication de l'ABA dans l'inhibition de la croissance de la feuille est quant à elle controversée. Plusieurs études ont montré que l'ABA entraîne une diminution du taux de croissance des feuilles (Voir revue par Wilkinson & Davies, 2010). D'autres ont, quant à elles, montré que l'ABA améliore les flux d'eau au travers de la membrane des cellules racinaires, et dans la plante entière par la voie symplastique, ce qui serait favorable à une croissance cellulaire rapide. Cependant, là encore en fonction des espèces étudiées, du temps et de la dose d'application de l'ABA, des études montreraient soit un effet positif soit un effet négatif de l'ABA sur la conductivité hydraulique des racines (Maurel *et al.,* 2010).

I.2 L'ABA, chef d'orchestre de réponses moléculaires générées par la plante lors d'un stress hydrique

L'ABA est une phytohormone qui joue un rôle pivot dans les processus de croissance et de développement, notamment dans le développement des embryons et des graines, les phénomènes de dessiccation et dormance des graines, la germination, l'établissement des jeunes plants, le développement des organes végétatifs et la reproduction (Cheng *et al.,* 2002; Barrero *et al.,* 2005; Fujii *et al.,* 2009; Nakashima *et al.,* 2009). Mis à part son rôle dans ces différents processus biologiques, elle tient une place importante dans certaines étapes clés des réponses de la plante face à une contrainte hydrique. Son accumulation dans les cellules des plantes témoigne d'ailleurs de son rôle essentiel. Ainsi, elle stimule notamment la fermeture des stomates dans les cellules de garde, régule l'expression de nombreux gènes de réponses, et induit l'expression de protéines protectrices des tissus végétatifs.

I.2.a *Les principaux partenaires de la voie de signalisation ABA*

Récemment, les trois composants essentiels de la voie de signalisation ABA ainsi que leurs modes d'action ont été caractérisés chez *Arabidopsis* (Umezawa *et al.*, 2010) et comprennent :

- Les récepteurs à l'ABA, de la famille PYR/PYL/RCAR (**PY**rabactin **R**esistant/**PY**rabactin resistant-**L**ike/**R**egulatory **C**omponent of **A**BA **R**eceptor) composée de 14 protéines (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009; Santiago *et al.*, 2009), capables de former une large poche hydrophobe de liaison d'un ligand dans laquelle une molécule d'ABA peut complètement être piégée (Umezawa *et al.*, 2010).
- Les protéines appartenant au groupe A des phosphatases type 2C (PP2C), régulateurs négatifs de cette voie de signalisation, sont représentées par 9 membres dont ABI1 et 2 (**AB**A **I**nsensitive 1 et 2) (Schweighofer *et al.*, 2004). Elles ont été identifiées dans le milieu des années 90 par études de mutants déficients à l'ABA (*abi1-1* et *abi2-1*) (Leung *et al.*, 1997).
- Les protéines kinases, SNF1-related protein kinase 2 (SnRK2), derniers effecteurs de cette voie, sont au nombre de 10 chez *Arabidopsis* désignés SRK2A à SRK2J (Yoshida *et al.*, 2002) ou SnRK2.1 à SnRK2.10 (Hrabak *et al.*, 2003). Au sein des trois familles existantes dans lesquelles sont réparties ces kinases, les trois membres SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/OST1/SnRK2.6, et SRK2I/SnRK2.3 composant la troisième famille, semblent être des régulateurs positifs de la voie de signalisation ABA (Umezawa *et al.*, 2010). En effet, le triple mutant *srk2d/e/i* montre des perturbations au niveau de l'expression des gènes de la tolérance à la sécheresse, la dormance des graines, suggérant que ces gènes *SnRK2* sont des éléments centraux de cette voie de signalisation (Fujita *et al.*, 2009; Nakashima *et al.*, 2009).

Le modèle actuel de la voie de signalisation ABA est présenté en FIGURE 2 (d'après Umezawa *et al.*, 2010). En conditions normales (*i.e.* dépourvues d'ABA), PP2C déphosphoryle et inactive SnRK2. Une fois que la quantité d'ABA est augmentée par des signaux environnementaux ou développementaux, les récepteurs PYR/PYL/RCAR fixent cette hormone, et deviennent capables d'interagir avec PP2C, inhibant de ce fait son activité phosphatase. L'inhibition exercée par PP2C sur l'activité de SnRK2 est ainsi levée, et cette kinase peut alors phosphoryler notamment des protéines cibles comme par exemple les facteurs de transcription de type bZIP (**b**asic domain leucine **ZIP**per) qui stimulent à leur tour l'expression des gènes de réponse à l'ABA, mais également celle des gènes codant des protéines membranaires impliquées dans la réponse physiologique rapide de la plante *i.e.* la fermeture des stomates. Le complexe de signalisation PYR/PYL/RCAR-PP2C-SnRK2 serait localisé à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau de la cellule (Ma *et al.*, 2009; Umezawa *et al.*, 2009; 2010).

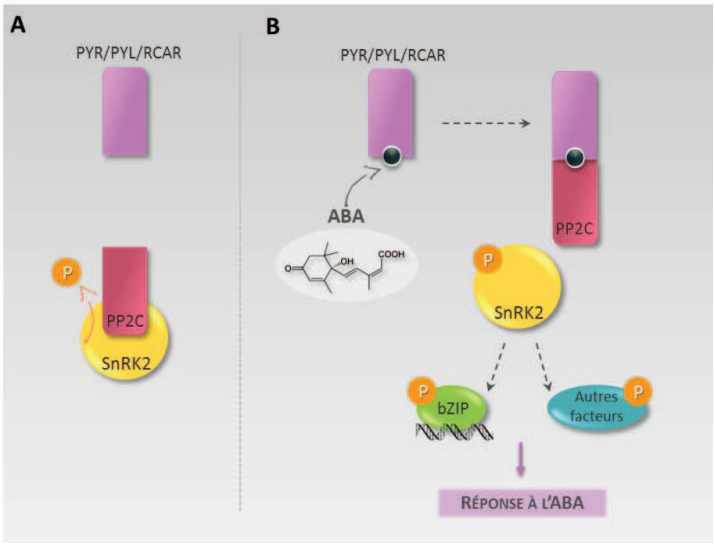


FIGURE 2 – Modèle de la voie de signalisation ABA chez *Arabidopsis thaliana*

Modifiée d'après Umezawa *et al.* (2010)

A-Sous conditions normales (*i.e.* sans ABA), PP2C inhibe l'activité kinase de SnRK2 en la déphosphorylant au niveau de plusieurs de ses résidus.

B-Suite à une accumulation d'ABA, le récepteur PYR/PYL/RCAR est activé par cette molécule, ce qui lui confère la faculté d'interagir avec PP2C inhibant ainsi son activité phosphatase. Une fois libérée de la régulation de PP2C, SnRK2 est activée par autophosphorylation qui à son tour active par phosphorylation des cibles telles que les facteurs de transcription bZIP ou des protéines membranaires impliquées dans les flux d'ions.

I.2.b *L'ABA et ses principaux modes d'action*

L'implication de la phytohormone ABA dans la fermeture des stomates est désormais établie. Cependant son origine et ses modes d'action à l'échelle de la plante entière sont encore aujourd'hui discutés.

Modes d'action de l'ABA à l'échelle de la plante

Lors d'une contrainte hydrique, l'origine de la production de l'ABA est actuellement débattue.

D'un côté, certains auteurs considèrent cette phytohormone comme un signal "longue distance". Sa synthèse se localiserait au niveau des racines, d'où elle serait exportée *via* le xylème vers le reste de la plante jusqu'aux feuilles où elle initierait la fermeture des stomates en réponse à un déficit hydrique (Davies & Zhang, 1991; Tardieu & Simonneau, 1998; Wilkinson & Davies, 2002). En effet, lors d'un stress de ce type, la teneur en ABA dans la sève du xylème serait augmentée de 50 fois par rapport à sa teneur initiale. Cette phytohormone serait transférée depuis les racines, dans lesquelles des teneurs réduites en ABA ont été relevées, vers le xylème où elle serait concentrée par la limitation en eau occasionnée par la contrainte hydrique (Tardieu *et al.*, 2010).

D'un autre côté, sur la base de plusieurs observations, certains auteurs ont récemment remis en cause ce transport "longue distance" de l'ABA (Christmann *et al.*, 2007).

- Premièrement, un déficit hydrique détecté par les racines induirait une augmentation des teneurs en ABA dans les parties aériennes, au niveau des stomates et des parties vasculaires alors qu'aucune augmentation de ces teneurs n'a été observée dans les racines (Christmann *et al.*, 2005; 2007). Ainsi, selon les auteurs, deux possibilités non exclusives sont envisageables concernant l'augmentation des taux d'ABA dans les parties aériennes. D'une part, cette phytohormone pourrait être stockée sous forme conjuguée (ABA-glucose) physiologiquement inactive qui sera relâchée lors d'une contrainte hydrique par l'action d'une hydrolase spécifique AtBG1 (Lee *et al.*, 2006). D'autre part, elle pourrait également être néo-synthétisée lors de ce stress. En effet, dans des plants non stressés, les enzymes clés impliquées dans la biosynthèse de l'ABA sont localisées dans les cellules du parenchyme vasculaire des parties aériennes et racinaires (Cheng *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2003; Koiwai *et al.*, 2004). Cependant, sous l'impact d'un déficit hydrique, l'expression de ces enzymes augmente dans les tissus vasculaires des feuilles (Endo *et al.*, 2008), suggérant une possible augmentation des teneurs en ABA dans ces organes.
- Deuxièmement, chez la tomate, des greffes de parties aériennes sur des racines de plants déficients en ABA ont montré que la biosynthèse d'ABA dans les parties aériennes était suffisante pour induire la fermeture des stomates lors d'une contrainte osmotique (Holbrook *et al.*, 2002).
- Troisièmement, la rapidité de l'ajustement physiologique par fermeture des stomates observée chez les plantes face à ce stress est difficile à concilier avec un transport "longue distance" chez les arbres notamment. Selon Christmann et ses collaborateurs (2007), l'ABA agirait en aval d'un signal lié à la contrainte hydrique, qui permettrait de communiquer cette information des racines aux parties aériennes. En effet, un changement de la pression de turgescence des cellules du mésophylle dans les minutes qui ont suivi l'application de la contrainte sur les racines a été observé.

Le modèle actuel offre un compromis et propose la biosynthèse de l'ABA principalement dans les tissus vasculaires lors d'un déficit hydrique. La phytohormone serait ensuite exportée *via* l'apoplasme vers d'autres cellules comme les cellules de garde des stomates par des transporteurs spécifiques ATP dépendant positionnés à des endroits stratégiques permettant ainsi une distribution rapide et efficace de l'ABA vers les tissus voisins (FIGURE 3). Le premier transporteur, AtABCG25, qui aurait pour rôle de faire sortir l'ABA des tissus vasculaires vers l'apoplasme, est en effet synthétisé dans les tissus vasculaires au niveau de la membrane plasmique des cellules (Kuromori *et al.*, 2010). En parallèle, le deuxième transporteur, AtABCG40, qui a pour rôle majeur l'import de l'ABA dans les cellules de gardes des stomates ou les cellules des racines primaires et latérales, est d'ailleurs exprimé au niveau de la membrane plasmique de ces cellules (Kang *et al.*, 2010).

Modes d'action de l'ABA à l'échelle de la cellule de garde des stomates

Une fois transporté à l'intérieur des cellules de garde, par son action, l'ABA provoque une réduction de la pression de turgescence des cellules de garde *via* une augmentation de calcium cytosolique (Ca^{2+}), par des influx de Ca^{2+} extracellulaire et la libération de ce second messager des stocks intracellulaires. Cette accumulation de Ca^{2+} aurait pour effet l'activation de deux canaux à anions (S-type : **S**low-activating sustained ou R-type : **R**apid transient) par lesquels des anions sont relargués depuis les cellules de garde vers le milieu extracellulaire. Cet efflux d'anions provoquerait à son tour une dépolarisation membranaire qui activerait des canaux à efflux de potassium (K^+). A long terme, l'efflux d'anions et d'ions K^+ aboutirait à une perte de turgescence des cellules de garde et donc une fermeture des stomates (Schroeder *et al.*, 2001).

Au préalable, cette phytohormone a été détectée par les récepteurs précédemment décrits suite à son accumulation dans les cellules de garde *via* le transporteur membranaire, ce qui aboutit *in fine* à l'activation de la kinase SnRK2. Récemment, des protéines membranaires localisées dans les cellules de garde ont été identifiées comme étant les cibles de cette kinase (FIGURE 3-A).

- SLAC1 (**SL**OW **A**NION **C**HANNEL-ASSOCIATED **1**) est un canal anionique localisé au niveau de la membrane plasmique des cellules de garde (Negi *et al.*, 2008; Vahisalu *et al.*, 2008). L'activité de SLAC1 est décrite comme étant induite par une augmentation de CO_2 conduisant à l'efflux d'anions (Cl^- et $malate^{2-}$) durant la fermeture des stomates (Negi *et al.*, 2008). La kinase SRK2E/OST1/SnRK2.6 phosphorylerait et activerait SLAC1 sous le contrôle de la phosphatase PP2C (Geiger *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009). Cependant, la régulation de cette protéine membranaire ne serait pas assurée que par SRK2E, mais également par un autre type de kinases Ca^{2+} dépendante nommées CPK21 et CPK23 (Geiger *et al.*, 2010). Récemment, le modèle de la voie de signalisation "ABA dépendante" de SLAC1/CPK6 (kinase Ca^{2+} dépendante) au niveau des stomates a été proposé (FIGURE 3-B) (Brandt *et al.*, 2012). La capacité de CPK6 à phosphoryler SLAC1 indique que les CPK peuvent suppléer les SnRK2 dans la régulation des canaux anioniques par l'ABA, suggérant que les deux familles de protéines kinases, dépendantes du Ca^{2+} et indépendantes du Ca^{2+}, fonctionnent en parallèle *in vivo*. De plus, ABI1 (PP2C) serait capable de déphosphoryler directement SLAC1, suggérant ainsi une compétition entre cette phosphatase et CPK6 pour la (dé)phosphorylation de la partie N-terminale de SLAC1. Ce mécanisme pourrait constituer un contrôle supplémentaire des canaux anioniques de type S dans les cellules de garde.

- KAT1 est un canal à influx de potassium (K^+) retrouvé dans les cellules de garde chez *Arabidopsis* (Pilot *et al.*, 2001), et qui jouerait un rôle dans l'ouverture des stomates (Ichida *et al.*, 1997). La région C-terminale de cette protéine serait la cible de la kinase "ABA dépendante" SRK2E, qui phosphorylerait un résidu thréonine inhibant son activité. Ainsi, la fermeture des stomates impliquerait l'inactivation de KAT1 (Sato *et al.*, 2009). Comme SLAC1, des protéines kinases dépendantes du Ca^{2+} peuvent aussi activer ces canaux à K^+ (Sato *et al.*, 2010).

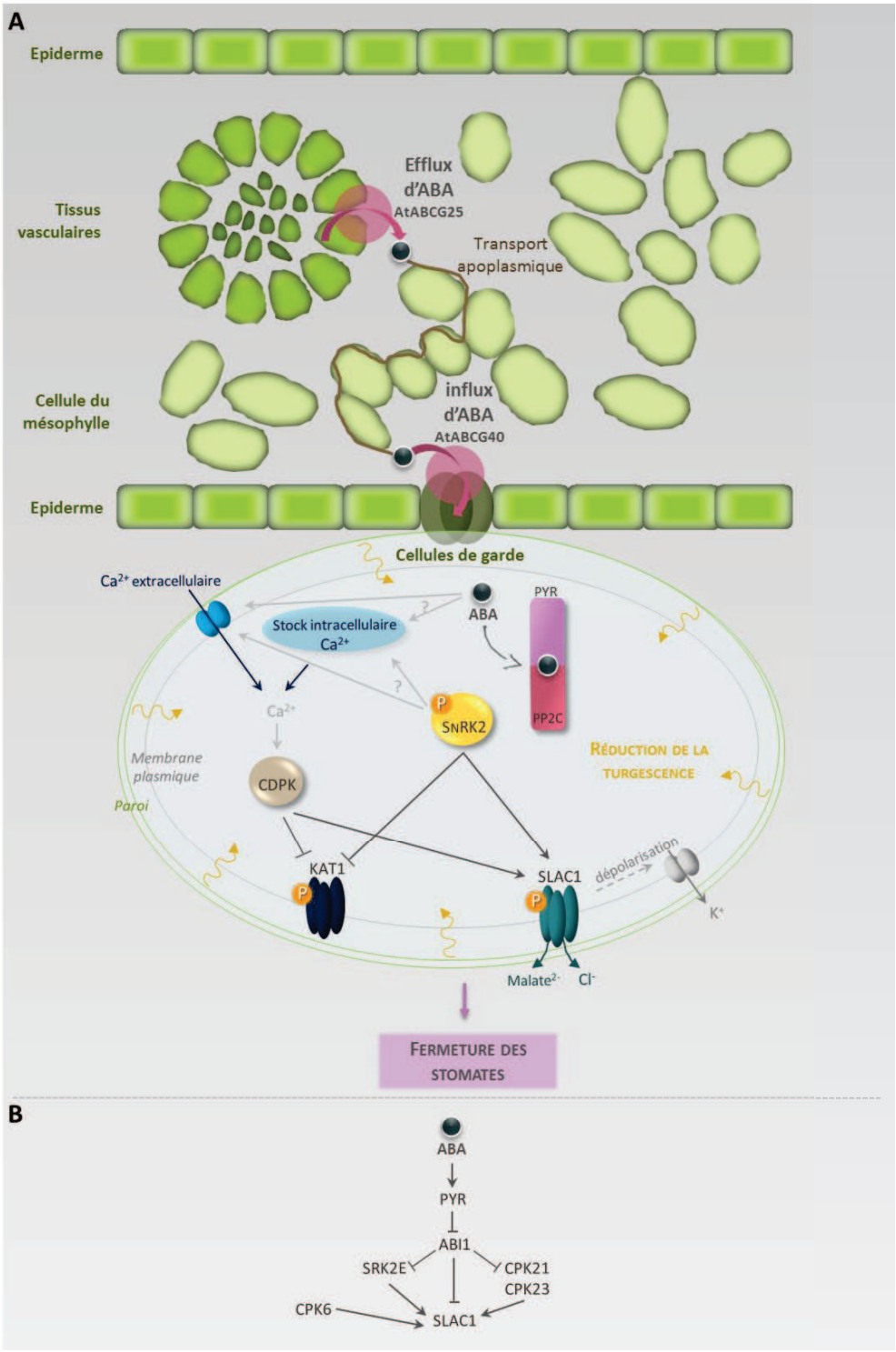


FIGURE 3 – Schéma récapitulatif de la transduction du signal ABA dans les cellules de garde

Modifiée d'après Umezawa *et al.* (2010) et Brandt *et al.* (2012)

A-Schéma hypothétique de la transmission intercellulaire de l'ABA vers les stomates, et de la détection et la transduction du signal ABA dans les cellules de garde.

B-Modèle d'activation des canaux anioniques SLAC1 par l'ABA *via* SRK2E et les protéines kinases Ca^{2+} dépendantes, régulées négativement par la phosphatase ABI1.

Le rôle prépondérant des kinases dépendantes du Ca^{2+} dans l'activité de ces protéines membranaires est cohérent avec la fonction de messager secondaire du calcium dans la transduction du signal intercellulaire qui participe ainsi au contrôle de l'homéostasie des ions dans les cellules de garde.

I.2.c *L'ABA et la régulation des gènes de réponses*

Afin d'induire des réponses face à une contrainte hydrique, les plantes subissent préalablement une profonde ré-organisation de l'expression des gènes, dont la grande majorité est sous le contrôle de l'ABA. Cependant, certains des gènes induits ne répondent pas à un apport exogène d'ABA, permettant de distinguer des voies dépendantes et indépendantes de l'ABA (FIGURE 4). L'ensemble de ces gènes de réponse exprimés lors d'une contrainte hydrique va non seulement protéger la cellule des effets du stress, mais va aussi réguler la transcription des gènes impliqués dans la transduction du signal. Les produits de ces gènes peuvent être classés en deux groupes (Roychoudhury *et al.*, 2013).

- Le premier regroupe les gènes codant les enzymes clés de biosynthèse de solutés permettant ainsi leur accumulation lors du stress, ceux codant les transporteurs membranaires ou protéines des canaux à eau permettant les transports passifs ou actifs de l'eau, ceux codant les enzymes de détoxification permettant la protection et la stabilisation des structures cellulaires de la dessiccation et des dommages causés par les formes réactives de l'oxygène (ROS), ceux codant tout un ensemble d'enzymes responsables du métabolisme des acides gras, comme des ferritines ou protéines de transfert des lipides, ou ceux codant d'autres protéines protectrices de macromolécules (LEA, **L**ate **E**mbryogenesis **A**bundant).

- Le deuxième groupe rassemble des gènes codant des protéines de régulation de la transduction du signal de stress et de l'expression des gènes, regroupant de nombreux **F**acteurs de **T**ranscription (FT), des protéines kinases (**M**itogen **A**ctivated **P**rotein **K**inase (MAPK), protéines kinases dépendantes du calcium, protéines récepteurs kinases…), des phosphatases et des protéases. Les FT interagissent avec des éléments en *cis* dans la région promotrice des gènes de réponse, et régulent de fait l'expression de ces gènes de réponses secondaires. En effet, les gènes de réponse primaire sont les premiers à être transcrits (comme les FT), et ces derniers déclenchent, à leur tour, la transcription de gènes de réponse secondaire (FT ou autres).

I.2.C.1 *La voie dépendante de l'ABA*

Activation des facteurs de transcription bZIP par les kinases SnRK2 sans synthèse préalable

La plupart des gènes induits par l'ABA contiennent un motif de réponse à l'ABA, appelé ABRE (**AB**scisic acid **R**esponsive **E**lement), une séquence *cis* de 8 paires de bases 5' ACGTGG/TC 3'. Par analyse de promoteurs de gènes de réponse, de nombreux motifs ABRE ont été identifiés. L'expression de ces gènes nécessite la présence de plusieurs éléments ABRE ou une combinaison de la séquence ABRE avec d'autres séquences appelées CE pour "**C**oupling **E**lements" notamment une séquence riche en GC. Les ABF (**A**BRE **B**inding **F**actor) et les AREB (**A**BA-**R**esponsive **E**lement **B**inding protein), capables de se fixer aux éléments ABRE/CE, ont été isolés par des criblages simple-hybride de levures en utilisant la séquence ABRE comme appât (Choi *et al.*, 2000; Uno *et al.*, 2000). Ces ABF/AREB sont des FT appartenant à la famille des bZIP, protéines basiques riches en résidus lysines et arginines, se fixent sur leur motif de reconnaissance, et forment des "Leucines Zippers" qui sont des motifs "Coiled-coil" de deux hélices alpha. Chez *Arabidopsis*, il existe 75 FT bZIP, dont 9 membres, classés dans le groupe A, sont des ABF/AREB (Jakoby *et al.*, 2002). Il a été montré que la surexpression d'ABF2/AREB1 est corrélée avec une tolérance à la sécheresse des plants mutants (Fujita *et al.*, 2005). Une analyse transcriptomique à grande échelle a montré que l'expression des gènes de réponse au stress est réprimée dans le triple mutant *areb1, areb2, abf3,* et semble indiquer un contrôle direct ou indirect de l'expression des gènes de *LEA*, de *PP2C* (phosphatase essentielle présentée précédemment) et de facteurs de transcription par ces trois FT (Yoshida *et al.*, 2010). En présence d'ABA, les facteurs ABF/AREB bZIP sont phosphorylés et cette modification post-traductionnelle est suffisante pour leur activation (Uno *et al.*, 2000; Furihata *et al.*, 2006). En ce sens, plusieurs études *in vitro* et *in planta* ont permis de dégager les protéines kinases SnRK2 notamment SRK2D/E/I comme principaux régulateurs des facteurs ABF/AREB bZIP à l'origine de ces phosphorylations nécessaires à leur activation (Furihata *et al.*, 2006; Fujita *et al.*, 2009).

Activation de la synthèse d'autres facteurs de transcription

L'induction de certains gènes de réponse de la voie "ABA dépendante" nécessite au préalable la synthèse *de novo* de protéines et notamment de facteurs de transcription qui jouent ainsi un rôle tardif dans les réponses de la plante face au stress.

-Les facteurs de transcription NAC-

Chez *Arabidopsis*, les FT appelés NAC pour **N**AM (**N**O **A**PICAL **M**ERISTEM), **A**TAF (**A**RABIDOPSIS **T**RANSCRIPTION **A**CTIVATION **F**ACTOR), et **C**UC2 (**CU**P-SHAPED **C**OTYLEDON), jouent un rôle dans l'expression des gènes de réponse dans la voie dépendante de l'ABA (Fujita *et al.*, 2004). Ces cibles

sont par exemple le gène *RD20* et un gène codant une glyoxalase (Fujita *et al.*, 2004). Cependant, ces FT seraient eux-mêmes synthétisés *via* la voie de signalisation "ABA dépendante", alors qualifiés de gènes de réponse primaire. De fait, quatre séquences de reconnaissance similaires au motif ABRE (ex : ACACGTGTCA) ont été retrouvées dans les promoteurs du gène *RD26* (qui code une des protéines NAC) et serait induit lors de contraintes hydrique et saline, et d'une application d'ABA (Fujita *et al.*, 2004), ainsi que trois autres représentants de ces FT (ANAC019, ANAC055, and ANAC072) (Tran *et al.*, 2004). Dans les promoteurs de leurs gènes cibles, ces FT se fixeraient aux sites de reconnaissance NAC (NAC-SR) et induiraient leur transcription sous des conditions de contrainte hydrique.

-Les facteurs de transcription MYC/MYB-

Les FT appartenant à la famille MYC/MYB participent également à la régulation de gènes qui permettent aux plantes de faire face à la déshydratation. Par exemple, chez *Arabidopsis,* ce type de FT, dont AtMYC2 (ou RD22BP1) et AtMYB2, régule l'expression du gène *RD22*. Cependant, contrairement aux FT ABF/AREB de type bZIP, ces FT MYC/MYB sont synthétisés sous des conditions de contrainte osmotique, ce qui fait d'eux des gènes de réponse primaire qui régulent la transcription de gène de réponse secondaire. Dans le promoteur de *RD22*, les sites de reconnaissance MYC (MYC-SR) et MYB (MYB-SR) fonctionnent comme des éléments en *cis* impliqués dans l'induction de ce gène face à la déshydratation. Les deux FT MYC et MYB se fixent respectivement aux éléments *cis* CACATG et TGGTTAG et coopèrent pour déclencher son activation (Abe *et al.*, 1997; 2003).

I.2.C.2 *La voie indépendante de l'ABA*

L'analyse des gènes de réponse induits lors d'un déficit hydrique a permis de mettre en évidence l'existence d'une voie "ABA indépendante" (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1997) (FIGURE 4). Les promoteurs de ces gènes présentent des éléments de réponse *cis* appelés DRE pour "**D**ehydratation-**R**esponsive **E**lements", connus également sous le nom de CRT/DRE pour **C**old **R**esponsive **E**lements" ou C/DRE pour "**C**-repeat". Cette boîte se caractérise par les 9 pb 5' TACCGACAT 3', et a été identifiée la première fois dans le promoteur du gène *RD29* (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 1994). Les facteurs de transcription appartenant à la famille ERF/AP2 capables de se fixer sur ces éléments DRE ont été identifiés et isolés, on les appelle CBF pour "**C**-Repeat DRE **B**inding **F**actor"/DREB1 et DREB2 pour "**DRE B**inding factors" (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2005). Les protéines CBF/DREB1, constituent une famille composée de cinq membres. Ceux-ci seraient majoritairement impliqués dans la résistance des plantes au froid à l'exception de

DREB1D et DREB1F (Roychoudhury *et al.*, 2013). Les gènes *DREB2*, quant à eux, sont induits lors de déshydratation et peuvent induire l'expression d'autres gènes impliqués dans la tolérance à la sécheresse (Liu *et al.*, 1998).

Parallèlement à cette voie, il existe des gènes de réponse exprimés lors d'une déshydratation et non pas après un traitement froid suggérant ainsi une autre voie indépendante de l'ABA (FIGURE 4). Le gène *ERD1* (**E**ARLY **R**ESPONSIVE TO **D**EHYDRATION) serait un de ces gènes et verrait son expression augmentée lors d'une contrainte hydrique, d'un traitement au NaCl ou d'une sénescence mais pas lors de traitement à l'ABA et au froid (Nakashima *et al.*, 1997). Deux éléments en *cis* seraient impliqués dans l'induction de ce gène lors d'une déshydratation, dont le motif "MYC-like" reconnu par les protéines NAC également (présentées précédemment) et la séquence "rpS1-like" reconnue par les protéines ZFHD (**Z**inc **F**inger **H**omeo**D**omain). Les protéines NAC agiraient comme des régulateurs transcriptionnels en synergie avec les protéines ZFHD pour permettre la transcription d'*ERD1* (Roychoudhury *et al.*, 2013).

I.2.C.3 *Interconnexion des voies dépendante et indépendante de l'ABA*

Les voies dépendante et indépendante de l'ABA agissent en parallèle, mais peuvent également interagir en synergie pour coordonner la régulation de certains gènes. L'interconnexion des voies peut être illustrée avec l'exemple du gène *RD29A*, capable de répondre à de multiples *stimuli* (froid, déshydratation, NaCl, ABA). Le promoteur de ce gène contient trois éléments de réponse DRE reconnus par DREB1A et 2A, et un élément ABRE reconnu par deux protéines AREB, AREB1 et 2 (Narusaka *et al.*, 2003), ce qui suggère une régulation "ABA dépendante et indépendante" de ce gène. Ces auteurs ont montré que l'activation complète du gène *RD29A* dépend de la synergie entre les FT AREB et DRE, et que leurs effets sont ainsi cumulés dans cette activation. Ainsi, même si l'ABA n'est pas requis pour le recrutement de FT au niveau des éléments DRE, il peut être essentiel pour une activation complète des gènes, dont le promoteur est constitué de boîtes DRE et ABRE. Narusaka et collaborateurs (2003) ont également suggéré que les éléments DRE pourraient être des séquences CE (**C**oupling **E**lements) des éléments ABRE, et que ces deux séquences de reconnaissance seraient interdépendantes pour l'expression de *RD29* sous diverses conditions de stress.

Il a également été rapporté que la synthèse de certains FT DREB est dépendante de l'ABA, mais que l'activation de leurs gènes cibles est, au contraire, "ABA indépendante". DREB1D/CBF4, FT se fixant sur un élément DRE, est induit par une contrainte hydrique et l'ABA (Haake *et al.*, 2002). La surexpression de ce FT active l'expression en aval de gènes de réponse à la contrainte hydrique et au froid qui contiennent dans leurs promoteurs des éléments *cis* DRE (Knight *et al.*, 2004).

Nous avons également vu que les protéines NAC joueraient un rôle dans la voie indépendante de l'ABA, en contrôlant la transcription du gène *ERD1*, et la voie dépendante de l'ABA en se fixant sur les promoteurs de nombreux gènes de réponses au stress déshydratation.

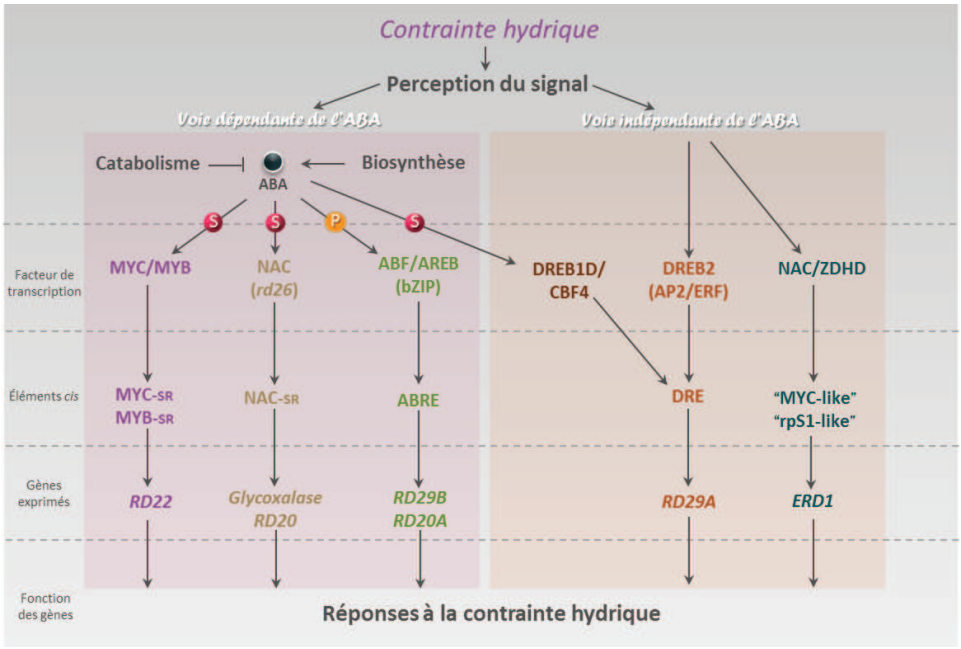


FIGURE 4 – Schéma récapitulatif des voies dépendante et indépendante de l'ABA

Modifiée d'après Roychoudhury *et al.* (2013)

Une contrainte hydrique entraîne l'expression de nombreux gènes de réponses régulés par une voie dépendante de l'ABA. La présence de l'ABA peut induire la phosphorylation (P) de certains facteurs de transcription de type ABF/AREB ou la synthèse (S) des facteurs de transcription MYC et MYB ou NAC. D'autres gènes de réponse sont régulés *via* une voie indépendante de l'ABA par les facteurs de transcription DREB2 ou NAC/ZDHD. Cependant, des interconnexions de voies existent comme illustré ici par DREB1D/CBF4, dont la synthèse (S) dépend de l'ABA, et qui active des gènes de réponse indépendamment de cette phytohormone. L'ensemble des éléments en *cis* et le nom des gènes régulés sont indiqués.

Ainsi, les plantes, et de façon plus générale, l'ensemble des organismes vivants contraints aux changements de conditions environnementales, doit percevoir et répondre rapidement et de manière adaptée à tout un panel de facteurs limitants (notamment l'approvisionnement en eau). Une fois le *stimulus* détecté, le signal doit être relayé jusqu'à la région de la cellule responsable de l'initiation de la réponse. Ce qui implique une amplification et une transmission du signal par des systèmes de relais d'information aboutissant à des changements d'expression des gènes de réponse.

La phosphorylation des protéines est une des principales stratégies chez les organismes procaryotes et eucaryotes par laquelle la propagation d'un signal intracellulaire s'effectue. Ce sont les protéines kinases et phosphatases qui sont en charge de la gestion des "réseaux de

phosphorylation", et sont elles-mêmes régulées par de nombreuses molécules "signal" (calcium, hormones…) externes ou produites lors d'un stress. La phosphorylation des protéines s'effectue dans la majorité des cas au niveau de résidus sérine ou thréonine, néanmoins elle peut également mettre en jeu des résidus tyrosine, histidine et aspartate. Il existe de nombreuses voies impliquant des transferts de phosphate de protéines à protéines, qui diffèrent cependant dans leurs modes de transfert. En effet, les voies de MAP kinase (**M**itogen **A**ctivated **P**rotein **k**inase) impliquent en général une activation successive de plusieurs kinases par phosphorylation nécessitant à chaque étape une hydrolyse d'une molécule d'ATP. Contrairement à ces voies, les relais de phosphorylation impliquent, selon un schéma simple, une étape initiale d'hydrolyse d'ATP par une kinase et des transferts de phosphate entre un résidu histidine et un résidu aspartate.

II. IMPLICATION DES RELAIS DE PHOSPHORYLATION DE TYPE HISTIDINE/ASPARTATE DANS LA PERCEPTION ET LA TRANSDUCTION DE SIGNAUX

Les relais de phosphorylation de type histidine/aspartate sont des systèmes de signalisation retrouvés chez les procaryotes et les eucaryotes, unicellulaires ou pluricellulaires comme *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans, Neurospora crassa, Dictyostelium discoideum* et également au sein des chlorobiontes comprenant les algues et les plantes supérieures. Le système à deux composants, le plus classique et très présent chez les procaryotes, fait intervenir un seul transfert de phosphate entre deux partenaires. Chez les eucaryotes et certains procaryotes, ces systèmes se sont complexifiés en systèmes appelés phosphorelais multiple ou relais multiple de phosphate faisant intervenir des partenaires additionnels impliquant donc des transferts de phosphate supplémentaires.

II.1 Les relais de phosphorylation chez les procaryotes

Les procaryotes représentent la forme de vie la plus ancienne sur terre et la plus efficace en terme d'adaptation. Ils sont capables d'occuper tous types d'habitats, pouvant vivre sous la forme d'organismes unicellulaires, parasites ou encore symbiotiques. Contraints par leur faible mobilité aux fluctuations de leur environnement, ils doivent détecter une grande variété de signaux externes et internes, et réguler en conséquence des réponses d'acclimatation s'étendant des régulations métaboliques classiques (azote, oxygène…) à des acclimatations comportementales plus complexes impliquant le chimiotactisme ou des changements développementaux (sporulation, virulence…). Cela leur demande une gestion de différents paramètres environnementaux, informations reçues et

traitées pour la mise en place d'une réponse qui assurera leur viabilité malgré la variation subie. Dans la plupart des cas, les réponses cellulaires se manifestent au niveau génétique sous l'effet du signal reçu avec une modification de profils d'expression des gènes exprimés.

Chez les procaryotes, la majorité des systèmes de transduction des signaux consiste en une seule protéine constituée d'un domaine receveur du signal et d'un domaine effecteur de la réponse, (système à une composante). Ces systèmes auraient évolué en système à deux composants (TCS), constituant également une voie majeure de la transduction du signal chez les organismes procaryotes (Ulrich *et al.*, 2005), composé de deux types de protéines : les récepteurs histidine kinase membranaires (HK) et les régulateurs de réponses cytoplasmiques (RR) (Stock *et al.*, 2000). Il repose sur un transfert de phosphate entre ces deux éléments conservés (FIGURE 5). Pour schématiser, le récepteur perçoit les signaux, et s'autophosphoryle au niveau d'un résidu histidine. Il transmet alors le phosphate à un résidu aspartate du RR qui va subir un changement conformationnel devenant ainsi actif et pourra alors orchestrer la réponse cellulaire.

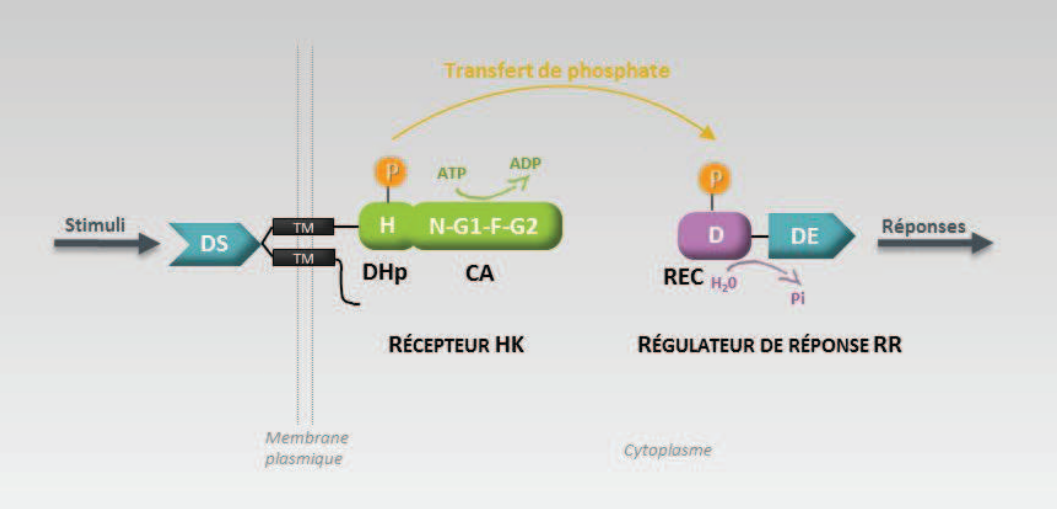


FIGURE 5 – Organisation du système à deux composants chez les procaryotes

Modifiée d'après Gao *et al.* (2009)

Le système à deux composants se caractérise par un transfert de phosphate entre le résidu histidine du domaine catalytique (contenant les boîtes hautement conservées : H, N, G1, F et G2) de l'HK, composé des domaines DHp et CA, et le résidu aspartate conservé du domaine receveur (REC) du RR afin de répondre, grâce au domaine effecteur du RR (DE), à toute une variété de *stimuli*. Ils sont détectés par le domaine senseur (DS) de l'HK, protéine enchâssée dans la membrane par deux passages (ou hélices α) transmembranaires (TM).

II.1.a *Partenaires des systèmes à deux composants*

II.1.a.1 *Le récepteur*

Les histidines kinases (FIGURE 5) sont typiquement composées en partie N-terminale d'un domaine senseur (DS), bordé par deux régions transmembranaires (TM), capable de détecter une grande variété de signaux (petites molécules, lumière, pression de turgescence, modification de la paroi…) et en partie C-terminale d'un module transmetteur de phosphate hautement conservé. Présent dans 31% des HK, le domaine HAMP (conservé parmi les **H**istidine kinases, **A**denylyl cyclases, **M**ethyl-accepting proteins, **P**hosphatases) est primordial dans le mécanisme de transmission de l'information du milieu externe vers les parties cytoplasmiques du récepteur. La partie transmettrice de phosphate de l'HK est constituée du domaine DHp (**D**imerization **H**istidine containing **p**hosphotranfer domain) contenant le site de phosphorylation *i.e.* le résidu histidine conservé et du domaine CA (**C**atalytic **A**TP binding domain) renfermant les boîtes N, G1, F, G2. Ce dernier domaine est capable de fixer l'ATP dans une poche de liaison formée entre les boîtes G1 et G2, et transférer le groupement phosphate au domaine DHp. Dans la majorité des cas, la formation d'un dimère réalisée par le domaine DHp, contenant une région "coiled-coil", c'est-à-dire d'hélices super-enroulées, est fondamentale pour le fonctionnement des HK engendrant ainsi classiquement une phosphorylation en *trans*. Le domaine CA d'un monomère phosphorylerait le résidu histidine conservé du domaine DHp de l'autre monomère. Ceci a été montré expérimentalement pour plusieurs senseurs notamment EnvZ (Cai & Inouye, 2003). Biochimiquement, les HK catalysent trois types de réactions de transfert de phosphate : leur propre phosphorylation (de l'ATP au résidu histidine), la phosphorylation du RR (du résidu histidine au résidu aspartate) et la déphosphorylation du RR (au niveau du résidu aspartate) (Stock *et al.*, 2000).

Basée sur l'architecture de leurs domaines et leurs topologies, une classification des HK en trois groupes majeurs est possible (Mascher, 2006). Le premier groupe, le plus vaste, regroupe les HK présentant un domaine senseur extra-cytoplasmique encadré par deux hélices transmembranaires, capable de détecter des signaux externes (nutriments ou substances solubles présentes dans son environnement). Le deuxième groupe, quant à lui, rassemble les HK avec un domaine senseur cytoplasmique détectant les signaux internes (solutés cytoplasmiques, signaux provenant du métabolisme…). Les HK peuvent être dépourvues de domaine extracellulaire mais possèdent dans ce cas des hélices qui, enchâssées dans la membrane, sont spécialisées dans la détection de *stimuli* associés à la membrane (pression de turgescence, stress mécanique, gradients électrochimiques), constituant ainsi le troisième groupe.

Parmi les génomes bactériens caractérisés, 20% d'entre eux codent des histidine kinases hybrides, qui présentent à la fois un domaine donneur de phosphate classique et un domaine receveur de phosphate avec un résidu aspartate conservé, constituant ainsi à elles seules un système à deux composants (Schaller *et al.*, 2011).

II.1.a.2 *Les régulateurs de réponse*

Les régulateurs de réponse (FIGURE 5) possèdent un domaine receveur N-terminal conservé appelé REC et un domaine effecteur variable en partie C-terminale.

Le domaine receveur (REC) s'étend sur environ 120 résidus et existe en équilibre entre deux conformations limites, une dite "active" et une dite "inactive" en fonction de son état de phosphorylation. En effet, le domaine REC catalyse le transfert du groupement phosphate provenant du résidu histidine de l'HK jusqu'à son résidu aspartate conservé. Lorsque l'aspartate est non phosphorylé, on retrouve principalement la forme "inactive", et la phosphorylation provoque un changement de conformation du REC aboutissant à la stabilisation de la forme "active" (Gao & Stock, 2009). Ce domaine receveur est donc également un domaine régulateur puisqu'il module l'activité du domaine effecteur du RR en fonction de son état de phosphorylation. Dans 15% des cas, le domaine effecteur est absent chez certains RR bactériens comme CheY (chimiotaxie) (Appleby *et al.*, 1996) et Spo0F (Sporulation) (Varughese, 2005).

Cependant, quand il est présent, le domaine effecteur peut effectuer différentes fonctions :

- La grande majorité des RR (63%) fonctionnent comme des facteurs de transcription présentant ainsi un domaine de fixation à l'ADN (DBD) en partie C-terminale (Gao & Stock, 2009). En se basant sur leur DBD, une classification des RR facteurs de transcription en trois groupes majeurs est possible dont les représentants respectifs sont OmpR, NarL et NtrC.
- Le domaine effecteur de certains RR peut également présenter une unité enzymatique comme CheB qui présente une activité méthylestérase dans la voie de transduction conduisant au chimiotactisme chez *E. coli* (Simms *et al.*, 1985).
- Une petite minorité de RR agissent par fixation sur des ARN ou régulent leurs cibles par interaction protéine-protéine (Gao & Stock, 2009).

II.1.b *Exemples de voies de signalisation : des systèmes basiques aux systèmes plus complexes*

Les bactéries présentent en moyenne de 10 à 30 systèmes de transduction du signal. Elles peuvent posséder des systèmes classiques à deux composants représentés par un couple HK/RR spécifique. Cependant, ce schéma classique linéaire de voie de signalisation peut présenter des variations. En effet, une HK peut phosphoryler plusieurs RR ou plusieurs HK peuvent réguler un seul RR ou plusieurs. Certaines bactéries détiennent également des systèmes plus complexes et rares, impliquant d'autres partenaires tels que des HPt (**H**istidine containing **P**hospho**t**ransfer protein), ce qui signifie des transferts de phosphate supplémentaires.

Le système à deux composants EnvZ/OmpR (FIGURE 6-A), dit "basique", joue un rôle dans la perception de variations d'osmolarité du milieu externe. L'HK EnvZ détecte les changements d'osmolarité externe, s'autophosphoryle en *trans* et transmet le phosphate au RR OmpR. L'état de phosphorylation du RR conditionne l'expression des gènes *OmpF* et *OmpC*. En condition d'hyper-osmolarité, le gène *OmpC* sera exprimé, et inversement la protéine OmpF sera produite en condition d'hypo-osmolarité. Ces protéines sont des porines, qui diffèrent par la taille de leurs diamètres, et ajusteront donc le taux de diffusion des osmolytes au travers de la membrane plasmique en fonction de l'osmolarité du milieu (Wurgler-Murphy & Saito, 1997).

A titre d'exemple de systèmes plus complexes, l'HK CheA (FIGURE 6-B), impliquée dans les processus de chimiotaxie, peut phosphoryler deux RR différents : CheY et CheB. Dans ce système, l'HK ne possède pas de domaine senseur, c'est une autre protéine appelée MCP (**M**ethylated **C**hemotaxis **P**rotein) qui détecte le signal, qui est transmis à l'HK par l'intermédiaire de la protéine CheW (Bourret & Stock, 2002). Une fois phosphorylée, CheY interagit avec des complexes de flagelles moteurs permettant ainsi à la bactérie de se mouvoir. Cette voie de signalisation possède des systèmes d'auto-régulation assurés notamment par deux protéines CheZ et CheB : la protéine CheZ déphosphoryle le RR, CheY, et la protéine CheB, qui possède une activité méthyl-transférase, retire le groupement méthyl du récepteur MCP.

Le RR Spo0F (FIGURE 6-C) de *Bacillus subtilis* impliqué dans la sporulation de la bactérie, quant à lui se retrouve en aval de cinq HK différentes KinA-KinE capables de le phosphoryler. Ce système est un relais multiple de phosphate : le phosphate va être transféré successivement des HK au résidu aspartate de Spo0F, à l'HPt Spo0B (résidu histidine), puis au RR final Spo0A (résidu aspartate) qui est l'activateur transcriptionnel des gènes de sporulation (Appleby *et al.*, 1996).

La FIGURE 6-D illustre un exemple de voie de signalisation dans laquelle le *stimulus* est perçu par deux HK et acheminé vers deux RR. Lors de la respiration par anaérobie, les deux HK homologues NarX et NarQ contrôlent la régulation de l'expression des gènes induits par le nitrate/nitrite par l'intermédiaire de deux RR homologues NarL et NarP (Rabin & Stewart, 1993).

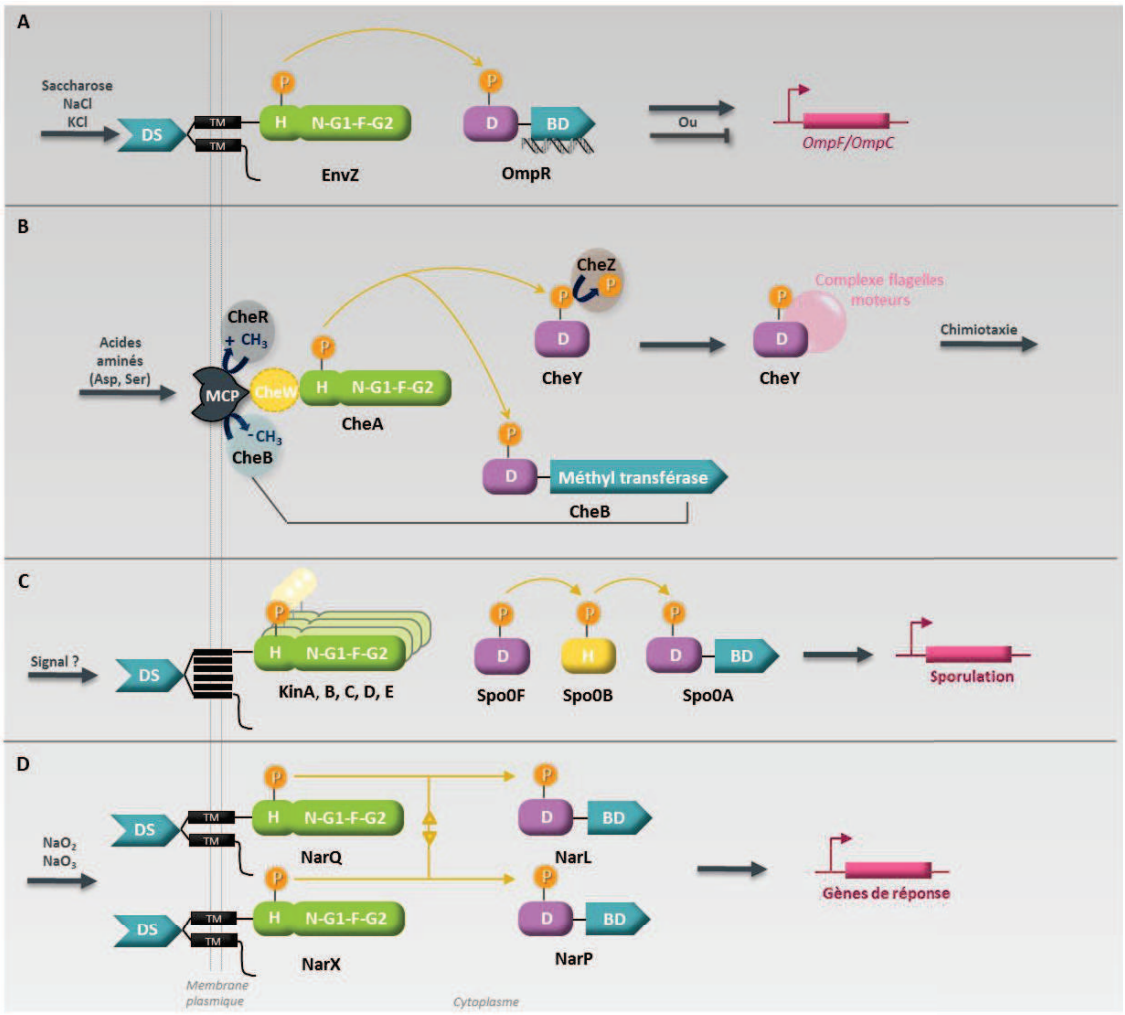


FIGURE 6 – Exemples de différents systèmes de transduction des signaux chez les bactéries

A-VOIE DE SIGNALISATION ENVZ/OMPR. Sous l'effet d'une osmolarité élevée, l'HK EnvZ s'autophosphoryle puis le groupement phosphate est transféré au RR OmpR. En fonction de son état de phosphorylation, le RR n'interagit pas de la même façon avec les promoteurs des gènes *OmpF* et *OmpC*.

B-VOIE DE SIGNALISATION CHEA/CHEY-CHEB. L'HK CheA impliquée dans la chimiotaxie est capable de phosphoryler deux RR différents. CheY qui une fois phosphorylé interagit avec les complexes de flagelles moteurs, et CheB, qui régule sa propre voie de signalisation.

C-VOIE DE SIGNALISATION KINA/SPO0A. Les cinq HK KinA, B, C, D, E impliquées dans la sporulation induisent le transfert de phosphate vers un RR commun Spo0A. Ce système, plus complexe, correspond à un transfert multiple de phosphate : avant d'être acheminé vers Spo0A, le signal est transmis successivement au résidu aspartate de Spo0F puis au résidu histidine de Spo0B.

D-VOIE DE SIGNALISATION NARQ-NARX/NARL-NARP. Les deux HK homologues *NarQ-NarX* sont capables de détecter le nitrate ou le nitrite dans le milieu extérieur, et transférer le signal phosphate à deux RR également homologues *NarL-NarP* qui activeront les gènes de réponse.

II.1.c *Spécificité entre les partenaires du transfert de phosphate*

Compte tenu du nombre et du haut degré de similitude entre les membres d'une même famille de molécules signal HK ou RR (conservation des domaines DHp et REC), des phosphorylations croisées entre plusieurs paires HK/RR sont envisageables. D'ailleurs, plusieurs exemples d'interconnexions de voies sont rapportés dans la bibliographie (Laub & Goulian, 2007). Ces phénomènes d'interférence des voies de transduction des signaux peuvent altérer la spécificité de transduction des signaux, et donc court-circuiter les voies de réponse induisant une réponse erronée par rapport au signal perçu. Cependant, ces phénomènes sont rares chez les bactéries, et le contrôle de la spécificité des voies est assuré par des mécanismes clés comme la reconnaissance moléculaire, l'activité phosphatase et la compétition des substrats, permettant aux deux partenaires HK/RR de se reconnaître spécifiquement parmi les protéines présentes. Ces aspects qui seront développés dans la section II.2.b.5, témoignent des stratégies de maintien d'une spécificité dans les voies de signalisation chez les bactéries, stratégies que l'on peut retrouver chez les plantes.

II.2 Les relais de phosphorylation chez les eucaryotes

Chez les eucaryotes, chez qui les phosphorelais de type histidine/asparate sont retrouvés (hormis dans le règne animal), une adaptation de ce système liée à l'apparition de la compartimentation cellulaire a été nécessaire pour permettre la transduction des signaux. L'HPt y assure un rôle navette capable d'établir une liaison spatiale entre les HK et les RR nucléaires. Dans ces systèmes, les premiers protagonistes sont tous des HK hybrides, qui possèdent à la fois un domaine donneur et un domaine receveur de phosphate dans la même molécule. Il faut cependant noter que, par rapport à ce qui existe chez les procaryotes, de nombreuses caractéristiques structurales et fonctionnelles de ces systèmes sont conservées, notamment la structure des domaines fonctionnels (Horak *et al.,* 2011) et le mode d'activation des HK qui requiert l'existence d'une forme dimérique afin qu'une phosphorylation en *trans* puisse avoir lieu (Wolanin *et al.,* 2002).

Les cellules eucaryotes végétales auraient hérité des systèmes de relais multiple de phosphorylation, d'une cyanobactérie, dans laquelle, ils assuraient la fonction de différenciation des hétérocystes, cellules capables de fixer l'azote atmosphérique (Fan *et al.,* 2006). Certains domaines fonctionnels trouvés dans les HK chez les plantes, notamment les domaines CHASE (**C**yclases/**H**istidine kinases **A**ssociated **S**ensory **E**xtracellular domain, impliqué dans la fixation des cytokinines) et les domaines de fixation de l'éthylène, ont été retrouvés dans le génome des cyanobactéries (Horak *et al.,* 2011). Néanmoins, ils assurent des fonctions différentes chez ces

organismes, témoignant ainsi de l'adaptation, chez les eucaryotes, des voies de signalisation héritées des organismes procaryotes au cours de l'évolution. Le nombre de gènes des différentes familles de molécules impliquées dans ces voies de signalisation (HK, HPt, RR) serait en outre corrélé au degré de complexité des organismes et à l'adaptation au mode de vie terrestre (FIGURE 7) (Pils & Heyl, 2009).

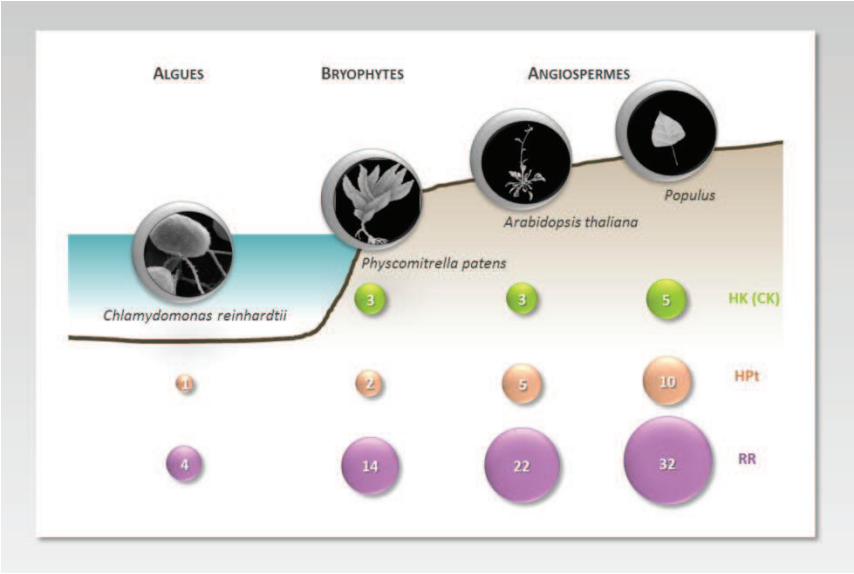


FIGURE 7 – Evolution du nombre de membres des molécules impliquées dans les phosphorelais de type histidine/aspartate

D'après Pils & Heyl (2009)

Le nombre de membres de chaque famille de molécules impliquées dans ces voies de signalisation par organisme est indiqué dans les pastilles qui les schématisent. Les HK (Histidine Kinase) récepteurs des CK (cytokinines) sont représentées en vert, les HPt (Histidine containing Phosphotransfer) en orange, les RR (Régulateur de Réponse) en violet. La taille des pastilles est proportionnelle à ce nombre. *Chlamydomonas reinhardtii* a été choisi comme représentant des algues, *Physcomitrella patens* comme représentant des bryophytes, et *Arabidopsis thaliana* et *Populus sp.* comme représentants des angiospermes.

II.2.a *L'osmo-adaptation chez Saccharomyces cerevisiae*

II.2.a.1 *La voie de transduction HOG*

Dans leurs habitats naturels, les levures sont soumises à d'importantes fluctuations osmotiques. Une augmentation de l'osmolarité externe conduit à une perte d'eau intracellulaire et une diminution du volume cellulaire, ce qui perturbe la croissance cellulaire. Pour faire face à ces conditions, les levures vont synthétiser au niveau intracellulaire un osmo-protecteur, le glycérol. Ces évènements sont dirigés par la voie HOG (**H**igh **O**smolarity **G**lycerol) qui orchestre l'adaptation de la cellule (Saito & Posas, 2012) notamment grâce à une MAPK (**M**itogen-**A**ctivated **P**rotein **K**inase),

Hog1p. La cascade HOG1 MAPK est régulée en amont par deux voies indépendantes, SHO1 et SLN1 (FIGURE 8). Un signal émanant d'une ou de l'autre voie converge vers une MAPK Kinase commune appelée Pbs2p qui constitue l'activateur spécifique de Hog1p (Maeda *et al.*, 1994; 1995).

La voie Sho1p/Ste11p/Pbs2p

La voie SHO1 est contrôlée par deux osmosenseurs transmembranaires putatifs, Msb2p et Hkr1p, protéines très glycosylées possédant un seul passage transmembranaire (Tatebayashi *et al.*, 2007). Une autre protéine transmembranaire intervient dans cette voie, Sho1p, longtemps considérée comme osmosenseur (Maeda *et al.*, 1995). A ce jour, elle apparaît comme un élément de recrutement de plusieurs protéines, nécessaire à la transduction du signal à la surface de la cellule, notamment au niveau des pôles de croissance cellulaire (Reiser *et al.*, 2003). Elle est constituée de quatre régions transmembranaires et d'un domaine cytoplasmique SH3 (**S**RC **H**omology **3** domain) qui lui permet d'interagir avec Pbs2p (Posas *et al.*, 1998). Lors d'un stress hyper-osmotique, Pbs2p est recrutée à la membrane et va se placer à proximité de deux kinases Ste20p et Cla4p (associées à une protéine G) et de la MAPKK kinase Ste11p (Reiser *et al.*, 2000). Après la phosphorylation de Ste11p (MAPKKK) par Ste20 et/ou Cla4, celle-ci est activée et phosphoryle Pbs2p (MAPKK), qui s'active à son tour et phosphoryle Hog1p (MAPK) alors activée (Saito & Posas, 2012) (FIGURE 8).

La voie Sln1p/Ypd1p/Ssk1p

La voie SLN1 est sous le contrôle du récepteur Sln1p, le premier élément de ce phosphorelais multiple composé également d'une protéine HPt, Ypd1p et d'un RR cytoplasmique, Ssk1p. Sln1p se compose de deux régions transmembranaires qui borne un domaine extracellulaire, localisant ainsi ce récepteur au niveau de la membrane plasmique (Maeda *et al.*, 1994; Posas *et al.*, 1996; Reiser *et al.*, 2003). Le domaine cytoplasmique possède à la fois un domaine donneur et receveur de phosphate, faisant de Sln1p une HK dite hybride c'est-à-dire qu'elle constitue à elle seule un système à deux composants. Actuellement, les mécanismes de détection des *stimuli* en faveur de l'activation ou de l'inactivation de Sln1p sont mal connus. Sln1p semble répondre à des changements de pression de turgescence, dus à la présence ou à l'absence d'une pression exercée par l'eau intracellulaire sur la paroi de la cellule de la levure. Des mutants *fps1p*, protéine impliquée dans l'efflux de glycérol intracellulaire, présentent une augmentation de l'activité kinase de Sln1p (Tao *et al.*, 1999). L'absence de canaux à glycérol conduirait à un déséquilibre osmotique par accumulation de glycérol dans la cellule et provoquerait une augmentation de la pression de turgescence par entrée d'eau dans la cellule. Inversement, il a également été montré qu'une réduction de la turgescence de la cellule traitée par un antibiotique fongique (nystatine) ou par action enzymatique supprimant sa paroi (provoquant l'augmentation de la perméabilité membranaire et diminuant le

volume cellulaire), cause une réduction de l'activité kinase de Sln1p et par conséquent une augmentation de l'activité de Hog1p (Reiser *et al.,* 2003). Plus récemment, il a été montré que la présence de la mannoprotéine Ccw12 (protéine membranaire périphérique), attachée à la membrane plasmique par une ancre GPI (**G**lycosyl **P**hosphatidyl **I**nositol) aurait un rôle dans l'activation de Sln1p (Shankarnarayan *et al.,* 2008). Sln1p serait capable de détecter la présence ou l'absence de cette protéine en interaction covalente avec des constituants de la paroi. Plus récemment, il a été montré que Sln1p serait localisé au niveau de radeaux lipidiques membranaires, composés principalement de sphingolipides et de stérols. Cette association permettrait au récepteur de constituer des dimères et par ce biais de conduire efficacement le signal phosphate à ces partenaires situés en aval en conditions normales d'osmolarité. Lors d'un stress osmotique ou d'une baisse du taux de sphingolipides, la localisation de Sln1p dans les radeaux serait perturbée, aboutissant de par l'inactivation de Sln1p à l'inhibition du transfert de phosphate et à l'activation de la voie HOG (Tanigawa *et al.,* 2012). Ces résultats suggèrent que le stress osmotique pourrait être perçu par les levures *via* des changements des propriétés structurales et physiques des radeaux lipidiques et que ces fluctuations modifieraient l'état de phosphorylation du récepteur Sln1p, ce qui serait en accord avec des travaux antérieurs révélant une sensibilité du récepteur à la fluidité membranaire (Hayashi & Maeda, 2006; Panadero *et al.,* 2006).

Ainsi, le récepteur Sln1p se caractérise par trois états d'activité.

- Dans les levures en conditions "normales" de croissance, Sln1p a une activité kinase dite "modérée" ou basale, nécessaire à la viabilité des levures. La fonction kinase de Sln1p nécessite la formation d'un dimère (Ostrander & Gorman, 1999; Tao *et al.,* 2002) et la *trans*-phosphorylation de chaque monomère sur le résidu histidine conservé (His 576). Le phosphate est ensuite transféré successivement au résidu aspartate (Asp 1144) du domaine receveur de l'autre sous-unité, à Ypd1p (His 64), puis au RR Ssk1p (Asp 554) (Posas *et al.,* 1996). Ssk1p phosphorylé correspond à la forme inactive de cette protéine qui n'est plus capable d'activer la voie de MAPK en aval (Posas & Saito, 1998).
- En conditions d'hyper-osmolarité, l'activité kinase de Sln1p est très réduite conduisant à l'accumulation de la forme non phosphorylée de Ssk1p (Ssk1p-OH) (Maeda *et al.,* 1994; Posas *et al.,* 1996). Le RR, actif, est ainsi capable de contrôler l'activation de Ssk2p/Ssk22p MAPKKK en se fixant à leurs domaines de régulation en partie C-terminale (Posas & Saito, 1998).
- En conditions d'hypo-osmolarité, l'activité kinase de Sln1p peut également être stimulée, ce qui conduit d'une part à l'inactivation de la voie HOG, et d'autre part à l'activation d'une autre protéine RR, le facteur de transcription Skn7p (abordée en PARTIE 2).

Chez des souches mutantes *sln1*Δ *ypd1*Δ, dans lesquelles Ssk1p ne peut plus être phosphorylée, la voie HOG est alors activée de manière constitutive même sans stress osmotique (Maeda *et al.,* 1994; Posas *et al.,* 1996), ce qui devient létal pour la levure. La forme non phosphorylée de Ssk1 (Ssk1p-OH) étant requise à l'activation de Ssk2p ou Ssk22p lors d'un stress osmotique, le système doit réduire à son niveau minimal le pool Ssk1p-OH en absence de contrainte ce qui évite alors une activation anormale de la voie HOG. Cependant, la forme phosphorylée du RR est chimiquement instable et facilement hydrolysable. En effet, la demi-vie *in vitro* de Ssk1p~P est d'environ 13 minutes (Janiak-Spens *et al.,* 2000). De la même façon, après un stress osmotique, le pool de Ssk1p-OH doit rapidement être réduit pour éviter toute activation excessive du système.

Pour prévenir ces activations inopportunes, plusieurs stratégies sont potentiellement utilisées.

- Tout d'abord, Ypd1p est capable en condition *in vitro* d'augmenter la demi-vie du Ssk1p~P à environ 40 heures (Janiak-Spens *et al.,* 1999) grâce à la formation d'un complexe stable entre Ypd1p et Ssk1p~P, qui stabilise la forme phosphorylée (Janiak-Spens *et al.,* 2000).
- De plus, il a été montré que la fonction de Ssk1p est double vis-à-vis de Ssk2p à savoir un rôle inhibiteur et activateur (Horie *et al.,* 2008). En effet, le rôle de Ssk1p serait directement associé à la formation de dimère et plus particulièrement à la nature du dimère formé. Ssk1p possède trois dimères différents en fonction de son état de phosphorylation : Ssk1p~P/Ssk1p~P, Ssk1p~P/Ssk1p-OH et Ssk1p-OH/Ssk1p-OH. En conditions normales, le dimère Ssk1p~P/Ssk1p~P dominerait. En outre, la présence éventuelle de formes résiduelles Ssk1p-OH serait neutralisée et donc inhibée par la formation du dimère stable Ssk1p~P/Ssk1-OH. Les auteurs considèrent que si 10% de Ssk1p se déphosphorylent, seulement 1% des dimères Ssk1 seront en forme active c'est-à-dire déphosphorylés. En conditions de stress osmotique, seuls les dimères doublement déphosphorylés Ssk1p-OH/Ssk1p-OH pourraient activer les dimères de Ssk2p ou Ssk22p. L'activation significative de Ssk2p se produit seulement si une quantité importante de Ssk1p est déphosphorylée, ajoutant ainsi un niveau de contrôle supplémentaire à l'activation de la voie.
- Enfin, le système de dégradation ubiquitine/protéasome est également impliqué dans le contrôle de Ssk1p-OH. Sa fonction principale dans cette voie serait de réguler négativement la voie après stimulation par un stress osmotique en ramenant Ssk1p-OH à un taux basal minimum. En effet, Sato et ses collaborateurs (2003) ont montré que Ssk1p-OH est plus rapidement dégradé que Ssk1p~P *in vitro*. Après stimulation de la voie, la protéine Ssk1p-OH marquée par le complexe Ubc7p/E2 et E3 au niveau de la surface du réticulum endoplasmique serait ainsi conduite au protéasome 26S pour être dégradée.

Cependant, en condition de contraintes osmotiques, la voie HOG doit être activée en quelques minutes afin que la levure réponde rapidement. Les mécanismes de contrôle doivent donc

permettre malgré tout d'obtenir rapidement un pool de Ssk1p-OH. Il a été montré que des concentrations importantes d'osmolytes s'accompagnent d'une diminution de la demi-vie de Ssk1p~P (Kaserer *et al.*, 2009). Cependant, la vitesse de la réponse demeure rapide (observée après 2 minutes de stress) et laisse entrevoir l'existence d'autres mécanismes de régulation, comme par exemple l'action de phosphatases qui est soupçonnée.

Après accumulation de Ssk1p non phosphorylé, la voie HOG sera donc active *via* Ssk2p/Ssk22p et aboutira à la phosphorylation de la protéine Hog1p *via* la MAPKK Pbs2p.

Le contrôle de la synthèse de glycérol par Hog1p

Un fois phosphorylée par l'une ou l'autre voie, la protéine Hog1p peut être transportée dans le noyau (Ferrigno *et al.*, 1998; Saito & Posas, 2012), et participe au contrôle de l'expression des gènes de réponse (Alepuz *et al.*, 2001; Mas *et al.*, 2009). Le rôle prépondérant de la voie HOG dans l'osmo-adaptation de la cellule est le contrôle de l'accumulation du glycérol utile à un réajustement osmotique par la rétention d'eau intracellulaire (Saito & Posas, 2012). Le glycérol est produit à partir du di-hydroxy-acétone-phosphate en deux étapes, catalysées par deux types d'enzyme : la glycerol-3-phosphate déshydrogenase et la glycerol-3-phosphatase. Le contrôle de Hog1p dans l'accumulation de cet osmolyte s'exerce à différents niveaux (Hohmann, 2009) :

- Dans la régulation de l'expression de gènes :

  -codant les enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse du glycérol

  -codant des protéines impliquées dans l'absorption du glycérol contenu dans le milieu externe

- Dans l'activité de protéines :

  - participant à la transformation du glucose en glycérol intracellulaire

  - constituant des canaux exportateurs de glycérol.

II.2.a.2 *Activation de la voie Sln1p/Ypd1p/Skn7p*

Comme abordé précédemment, Ypd1p est capable de transférer son phosphate non seulement à Ssk1p mais également à Skn7p. Contrairement au RR cytoplasmique Ssk1p qui interagit physiquement avec une MAPKKK de la cascade de réponse HOG1, Skn7p est un facteur de transcription nucléaire qui régule la transcription *via* la fixation de son DBD (**D**NA **B**inding **D**omain) à son élément de réponse présent dans les promoteurs des gènes cibles. L'activation de la voie Sln1p/Ypd1p/Skn7p serait dépendante de l'état d'hypo-osmolarité des cellules et des changements des propriétés physiques de la paroi (contraintes entrainant un affaiblissement ou une rénovation de

la paroi cellulaire). L'abondance relative de la protéine Ccw12, protéine ancrée dans la membrane plasmique et qui compose la paroi de la levure, serait particulièrement liée aux changements subis au niveau de la paroi (Shankarnarayan *et al.*, 2008). Lorsque Ccw12 est absente ou en quantité réduite, l'activité kinase de Sln1p serait maintenue, permettant ainsi une activation par phosphorylation (Asp 427) de Skn7p. Ce facteur de transcription induirait alors l'expression de gènes de réponse spécifiques dont *OCH1*, qui code une mannosyltransférase, enzyme de la N-glycosylation de protéines membranaires ou de sécrétion, et *NCA3* qui code une protéine de la paroi impliquée dans la septation de la levure. Skn7p travaillerait donc en parallèle avec la voie de transduction MAPK/Protéine kinase C (PKC) pour coordonner la régulation de l'intégrité de la paroi en réponse aux signaux extracellulaires (Fassler & West, 2011).

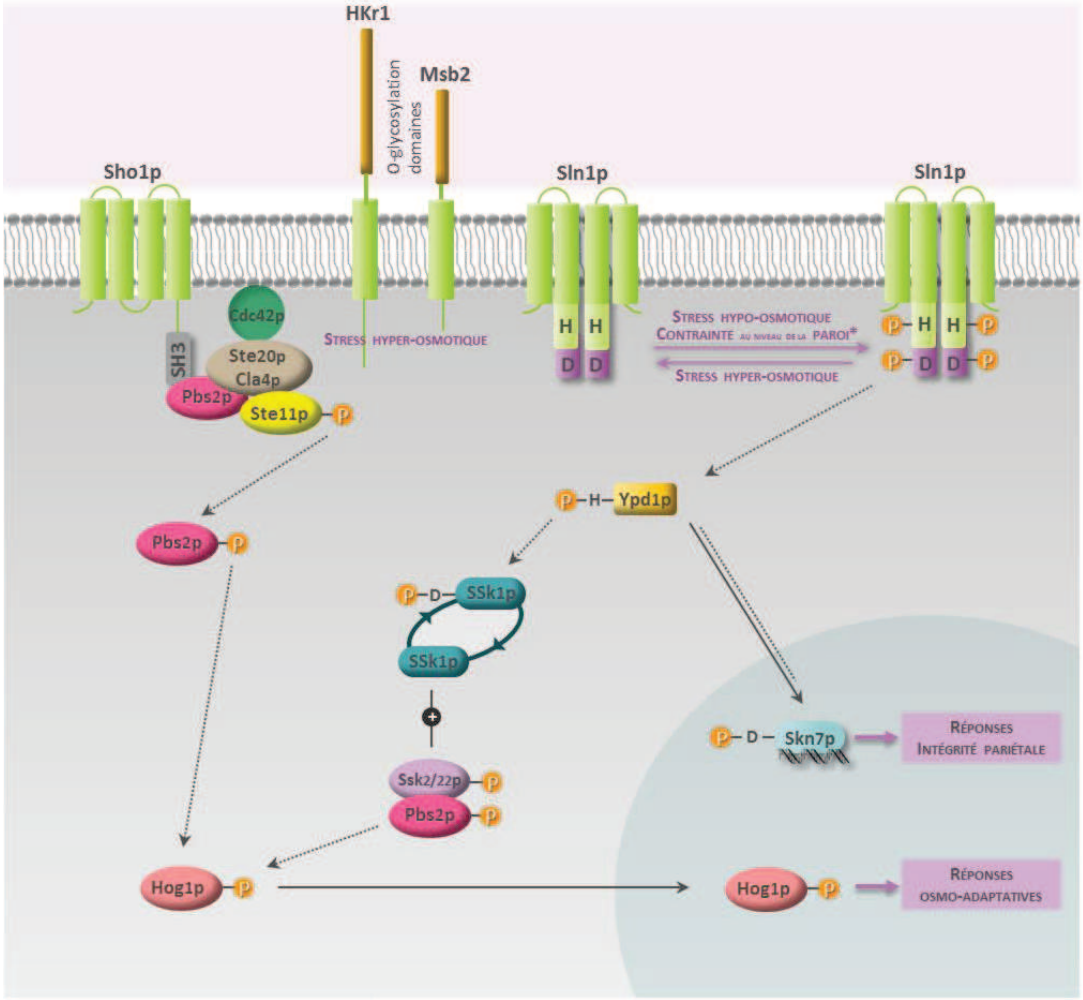


FIGURE 8 – Schéma de l'organisation des voies SLN1 et SHO1 chez *S. cerevisiae*

Modifiée d'après Fassler & West (2011)

En conditions normales de croissance des cellules, l'HK Sln1p s'autophosphoryle au niveau de son résidu Histidine conservé (d'une sous-unité à l'autre). Une augmentation de l'activité de cette HK est observée lors de changements affectant la paroi cellulaire activant ainsi la voie **Sln1p/Ypd1p/Skn7p**. Un transfert successif de phosphate est observé entre ces trois protéines aboutissant à la phosphorylation de SKn7p qui déclenche la

transcription de gènes de réponse impliqués dans la régulation de l'intégrité de la paroi.
Un stress hyper-osmotique ou d'autres contraintes qui entrainent une perte de turgescence des cellules provoquent l'activation de deux voies indépendantes :

La voie **Sln1p/Ypd1p/Ssk1p** : la contrainte provoque une diminution de l'activité de Sln1p. Une accumulation de Ssk1p non phosphorylé se produit, qui favorise l'activation de la voie de MAPK HOG aboutissant à la phosphorylation de Hog1p.

La voie **Sho1p/Ste11p/Pbs2p** : la contrainte détectée par les deux osmosenseurs Hkr1 et Msb2 entraine la formation d'un complexe composé de Sho1p, Pbs2p recrutée à la membrane, Ste20p et Cla4p associées à une protéine G, Cdc42p, et la MAPKKK Ste11p, aboutissant à la phosphorylation de Hog1p *via* Pbs2p.
Une fois phosphorylé, Hog1p entre dans le noyau et déclenche l'activation de gène de réponse à la contrainte osmotique et notamment la synthèse de glycérol.
Les résidus histidine et aspartate sont notés par H et D respectivement. Les transferts des groupements phosphate (orange) de protéines en protéines sont symbolisés par des flèches ou traits discontinus. Les flèches en trait plein indiquent des mouvements des protéines dans le noyau de la cellule.

II.2.b *Les phosphorelais multiples des cellules végétales*

Chez les plantes, le relais multiple de phosphate impliquant, comme chez *S. cerevisiae*, un récepteur HK, des HPt et des RR, joue un rôle primordial dans la transduction des signaux exogènes et endogènes. Ces partenaires du phosphorelais multiple sont très conservés chez plusieurs espèces de plantes et ont été identifiés, notamment chez *Arabidopsis*, *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Glycine max*, *Lotus japonicus*, *Populus* (TABLEAU 1). Au sein d'une même espèce, il existe plusieurs isoformes d'HK, d'HPt ou de RR. Contrairement aux systèmes bactériens, possédant un couple de réponse HK/RR spécifique à un signal donné, la redondance fonctionnelle d'une famille de protéines de phosphorelais multiple a été suggérée comme une caractéristique remarquable et essentielle de ces systèmes chez les plantes. Cependant, elles peuvent tout de même exercer une fonction ou intervenir dans un processus physiologique qui leur est propre.

TABLEAU 1 – Les partenaires du phosphorelais multiple identifiés chez plusieurs espèces de plantes

Famille	Espèces	HK		HPt	RR	Références
		Ethylène	Non-Ethylène			
Poaceae	*Oryza sativa*	4	5	5	36	a, b
	Zea mays	-	3	3	10	c, d, e
Brassicaceae	*Arabidopsis thaliana*	5	6	6	32	f
Fabaceae	*Glycine max*	4	17	10	49	g
	Lotus japonicus	5	9	6	24	h
Salicaceae	*Populus trichocarpa*	4	8	12	25/48	i, j

REFERENCES : (a) Pareek *et al.*, 2006; (b) Tsai *et al.*, 2012; (c) Asakura *et al.*, 2003; (d) Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2004; (e) Javadmanesh *et al.*, 2013; (f) Hwang *et al.*, 2002; (g) Le *et al.*, 2011; (h) Ishida *et al.*, 2009; (i) Ramirez-Carvajal *et al.*, 2008; (j) Singh & Kumar, 2012

II.2.b.1 *Les différents partenaires impliqués dans les relais multiple de phosphate*

Les récepteurs Histidine kinase HK

De par leur niveau de conservation dans les différentes espèces de plantes, les HK apparaissent primordiales pour assurer notamment la perception de phytohormones telles que l'éthylène et les cytokinines, le développement de certains organes (méga-gamétophyte), et la perception de contraintes abiotiques (froid, stress salin, sécheresse) ou biotiques (résistance aux attaques bactériennes et fongiques). Chez *Arabidopsis*, les HK se répartissent en deux catégories : les récepteurs à l'éthylène ETR1 et ETR2 (**ET**HYLENE **R**ESPONSE), ERS1 et ERS2 (**E**THYLENE **R**ESPONSE **S**ENSOR), EIN4 (**E**THYLENE **IN**SENSITIVE) et les autres récepteurs regroupant les récepteurs aux cytokinines AHK2, AHK3 et AHK4/CRE1/WOL (**A**RABIDOPSIS **H**ISTIDINE **K**INASE / **C**YTOKININES **RE**SPONSE / **WO**ODEN **L**EG), l'osmosenseur AHK1 et les récepteurs CKI1 et AHK5/CKI2 (**C**YTO**K**ININE **I**NDEPENDENT). Il n'en demeure pas moins que l'ensemble des HK de plantes présente un haut degré de similitudes structurales suggérant des modes de fonctionnement commun.

-HK impliquées dans la détection du signal éthylène-

L'éthylène est une hormone gazeuse et diffusible qui joue un rôle dans la dynamique de croissance et les évènements développementaux de la plante durant la totalité de son cycle de vie notamment lors de la germination des graines et la croissance des plantules, la sénescence des organes dont l'abscission des feuilles et des pétales, la maturation des fruits et l'ouverture des stomates (Bleecker & Kende, 2000; Desikan *et al.,* 2005; 2006). La synthèse de l'éthylène peut être régulée par d'autres phytohormones (auxine, gibbérellines, cytokinines, et brassinoïdes), et est fortement induite dans les réponses face aux contraintes abiotiques et aux pathogènes. De jeunes plantules traitées à l'éthylène présentent un phénotype "triple réponse" (Guzmán & Ecker, 1990; Chen *et al.,* 2005) caractérisé par : i) un raccourcissement et un épaississement de l'hypocotyle, ii) une exagération du crochet apical, ii) une inhibition de la croissance racinaire.

Chez *Arabidopsis*, cette hormone est perçue par une famille de cinq récepteurs composée d'ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 et EIN4 (Binder, 2008) (FIGURE 9 & TABLEAU 2). L'ensemble de ces récepteurs partage des caractéristiques structurales communes : une partie N-terminale formée de trois passages transmembranaires dédiée à la perception du signal éthylène, et une partie C-terminale comprenant un domaine GAF impliqué essentiellement dans les interactions non covalentes et réversibles des récepteurs *in vivo* (Grefen *et al.,* 2008; Gao *et al.,* 2008) et un domaine kinase. A

l'exception d'ERS1 et 2, ils possèdent tous un domaine receveur (RD) de phosphate en partie C-terminale. La structure de ce domaine concernant la protéine ETR1 a été obtenue par cristallographie par Müller-Dieckmann et ses collaborateurs (1999), ce qui a permis d'apporter des informations sur sa fonction. Il faut cependant noter que le RD d'ETR1 ne partage que 14% d'identité avec les autres AHK.

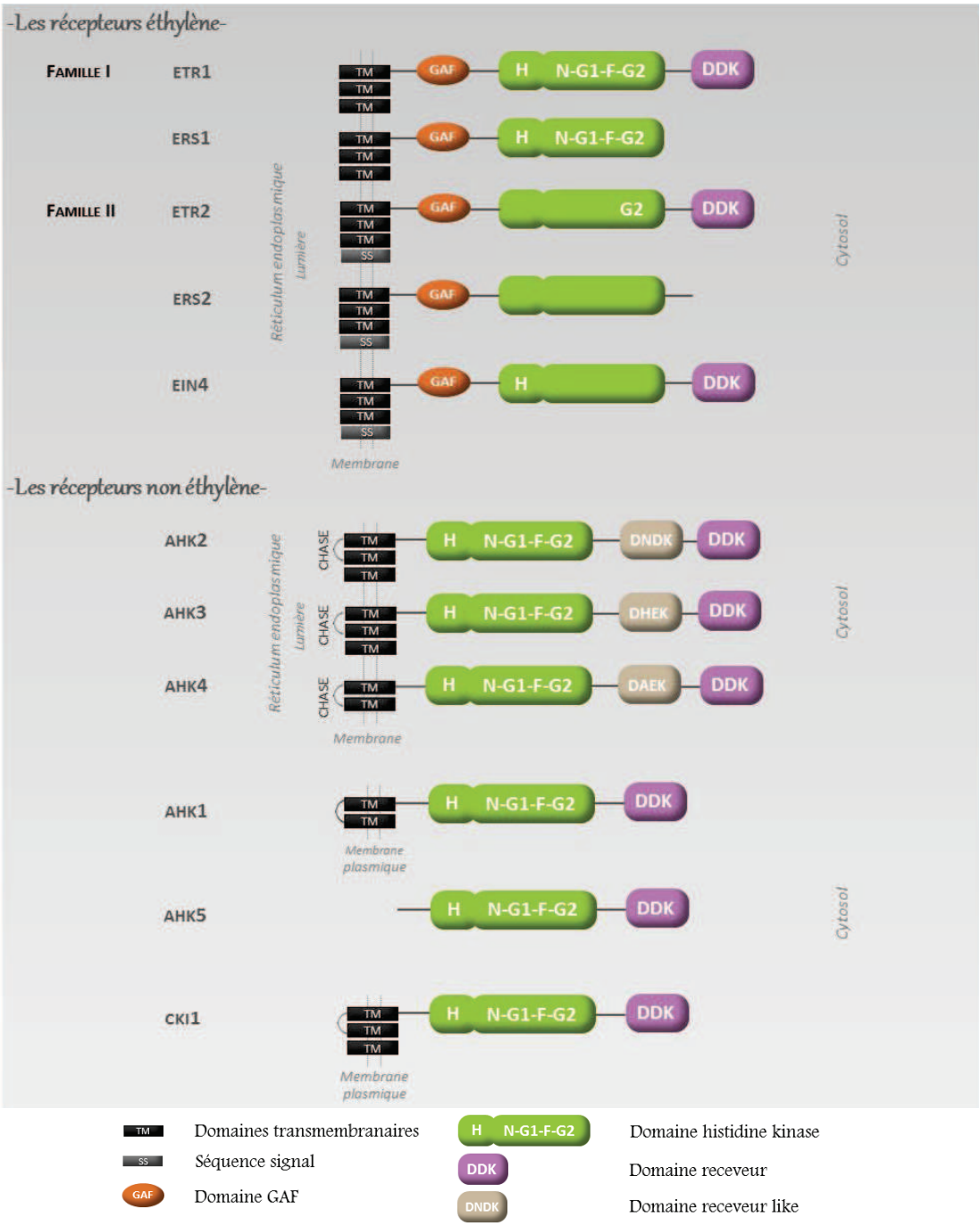


FIGURE 9 – **Famille des Histidine asparate Kinase chez *Arabidopsis thaliana***

Modifiée d'après Hwang *et al.* (2002)

Cette famille est composée des récepteurs éthylène et des récepteurs non éthylène. Les sites de phosphorylation conservés histidine (H), aspartate (D) et les motifs sont indiqués.

Basé sur des études phylogénétiques, ces récepteurs se répartissent en deux familles : une première composée d'ETR1 et ERS1 possédant un domaine histidine kinase complet et donc une activité histidine kinase *in vitro* (Gamble *et al.*, 1998; Moussatche & Klee, 2004), et la deuxième composée d'ETR2, ERS2 et EIN4 ne possédant pas de domaine histidine kinase complet. Par conséquent, elles ne présentent pas d'activité histidine kinase mais sérine/thréonine kinase *in vitro* (Hua *et al.*, 1998; Sakai *et al.*, 1998a).

Un élément de séquence transmembranaire putatif supplémentaire est retrouvé chez les représentants de la famille II correspondant à une séquence qui dirige la localisation du récepteur (Binder, 2008). Des études de fluorescence ont montré que les cinq récepteurs sont localisés au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) (Grefen *et al.*, 2008) ce qui est compatible avec la capacité de l'éthylène à diffuser librement dans des environnements aqueux et lipidiques. ETR1 ne serait pas exclusivement localisé au niveau du RE, mais se trouverait également au niveau de la membrane de l'appareil de Golgi (Dong *et al.*, 2008) (TABLEAU 2). L'analyse des transcrits par RT-PCR a montré que les cinq récepteurs sont détectés dans tous les tissus testés à tous les stades de développement, et que les deux représentants de la famille I présentent globalement un chevauchement dans leurs zones d'expression avec certaines spécificités au niveau des racines (Grefen *et al.*, 2008) (TABLEAU 2).

L'homodimérisation des récepteurs a été démontrée *in vitro* (Schaller *et al.*, 1995) pour ETR1 se présentant sous la forme d'un dimère constitutif stabilisé par la présence à leurs extrémités N-terminales de deux ponts disulfures, et *in vivo* pour la totalité des récepteurs éthylène (Grefen *et al.*, 2008) (TABLEAU 2). Ces HK seraient également capables d'hétéro-dimériser, par des interactions non covalentes, conduisant à la formation de "cluster" jouant un rôle dans l'amplification du signal (Grefen *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2008). En effet, il a été montré que l'éthylène était capable de déclencher une réponse chez les plantes malgré sa très faible concentration (0,2 $nL.L^{-1}$) (Chen & Bleecker, 1995). On peut donc supposer que les récepteurs activés par fixation de la molécule d'éthylène, activeraient en retour par interaction physique les récepteurs voisins et l'ensemble du "cluster" pourrait répondre au signal de façon ordonnée (Grefen *et al.*, 2008). Une seule molécule d'éthylène est capable de se fixer dans la partie N-terminale transmembranaire d'un dimère en présence d'un seul ion de cuivre (Rodríguez *et al.*, 1999), faisant du dimère l'unité fonctionnelle du récepteur.

De plus, les récepteurs sont considérés comme des régulateurs négatifs du signal éthylène. En effet, en absence d'hormone, le récepteur est actif, mais permet, *via* l'intermédiaire d'autres protéines (présentées dans le modèle de transduction éthylène) de réprimer les voies de réponse. Alors qu'en présence d'éthylène, le récepteur, bien qu'inactif, sert -pour ainsi dire par défaut de signal- pour la

mise en place des réponses face à cette hormone (Binder, 2008). Le degré d'implication des deux familles de récepteur dans cette voie n'est pas équivalent. De fait, le double mutant *etr1/ers1* qui présente un phénotype de réponse éthylène constitutif, n'est pas restitué par complémentation des récepteurs de la famille II (Qu *et al.*, 2007).

Malgré les avancées considérables sur les connaissances de cette voie de signalisation, le rôle de l'activité HK des récepteurs de la famille I dans la voie de signalisation éthylène reste obscur. Une étude récente (Hall *et al.*, 2012) a confirmé que l'activité kinase d'ETR1 n'est pas requise pour son rôle de récepteur lors de l'activation des réponses de la voie éthylène. Cependant, la complémentation du double mutant *etr1/ers1* par *etr1 kinase inactive* est capable de rétablir le phénotype dominant insensible sans éthylène, mais en présence d'éthylène, les mutants complémentés sont moins sensibles. Ceci suggère que l'activité kinase, bien que non requise pour les réponses à l'éthylène, joue un rôle modulateur dans la régulation de la voie.

Les autres partenaires d'un phosphorelais multiple dans la transduction du signal éthylène ont été mis en évidence par des études d'interaction entre ETR1 et les AHP (AHP1, 2, 3) dans la levure par le système double-hybride (Urao *et al.*, 2000), et entre ETR1 (protéine complète) et AHP1 par des mesures de polarisation de fluorescence (TABLEAU 4) (Scharein *et al.*, 2008). L'implication potentielle d'un RR-B (ARR2) dans cette voie de signalisation a également été étudiée par analyse de mutants et expériences d'expression transitoire dans des protoplastes (Hass *et al.*, 2004). Selon Scharein et ses collaborateurs (2011), en absence d'éthylène le récepteur serait capable de s'autophosphoryler, et de transférer ce phosphate aux HPt. Inversement, en présence d'éthylène, le récepteur subirait un changement conformationnel, l'empêchant de s'autophosphoryler et d'interagir avec les protéines HPt.

-HK impliquées dans la détection du signal cytokinine-

Les cytokinines (CK) sont des phytohormones qui peuvent affecter de nombreux processus physiologiques, et stimulent entre autre la division cellulaire, la différenciation des plastes et la caulogenèse, et retarde la sénescence des feuilles (Mok & Mok, 2001). Chez les légumineuses, les CK sont également impliquées dans la formation des nodules, fixateurs d'azote (Frugier *et al.*, 2008). Ces molécules sont des dérivés naturels d'adénine portant en position N^6 un groupe isopentényl (zéatine, isopenténylad énine…) ou un composé aromatique (N^6-benzyladenine, kinétine…). Elles sont représentées par une grande variété d'isoformes capables de migrer dans la plante des racines aux parties aériennes par le xylème et des parties aériennes aux racines par le phloème. La *trans*-zéatine

(tZ) serait majoritaire dans la sève brute et l'isopentenyladénine (iP) majoritaire dans la sève élaborée (Lomin *et al.,* 2012). Cette phytohormone est perçue dans la plante par des récepteurs de type HK, qui relayent ainsi sa présence par interaction avec le second partenaire, les AHP (TABLEAU 4) permettant à terme des réponses adaptées de la plante.

Les trois récepteurs aux cytokinines AHK2, AHK3 et AHK4/CRE1/WOL (FIGURE 9 & TABLEAU 3) ont été isolés et caractérisés en 2001 (Inoue *et al.,* 2001; Ueguchi *et al.,* 2001; Yamada *et al.,* 2001; Suzuki *et al.,* 2001). Antérieurement, des mutants appelés *wol* présentant des racines sans phloème et anormalement courtes ont été isolés (Mähönen *et al.,* 2000). L'année suivante, il s'est avéré que la mutation se localisait sur le gène du récepteur AHK4. Ces trois HK hybrides possèdent une structure multi-domaines comparable aux récepteurs à l'éthylène, à l'exception de la nature du domaine senseur.

Le domaine senseur situé en partie N-terminale du récepteur est appelé domaine CHASE (**C**YCLASE/**H**ISTIDINE KINASE **A**SSOCIATED **S**ENSORY **E**XTRACELLULAR). Heyl et ses collaborateurs (2007) ont montré que ce domaine isolé avec les régions transmembranaires adjacentes (deux ou trois) conservent la capacité de fixer les CK, contrairement aux récepteurs dépourvus du domaine CHASE. De plus, un certain nombre de mutations situées dans ce domaine supprime également cette capacité, permettant aux auteurs d'identifier les acides aminés pouvant potentiellement être impliqués dans la fixation des CK (Heyl *et al.,* 2007). Bien que les mutations localisées dans ce domaine provoquent dans la plupart des cas des perturbations dans le fonctionnement des récepteurs, une mutation (*ore12-1*) a provoqué une activation constitutive de l'activité HK du récepteur AHK3 (Kim *et al.,* 2006). Cette substitution d'acides aminés provoquerait une altération de la structure du domaine CHASE comparable à celle provoquée par la fixation des CK. Quelques années plus tard, l'obtention de la structure du domaine CHASE en complexe avec plusieurs CK a permis d'éclaircir de manière précise le mode de fixation des CK (Hothorn *et al.,* 2011). Les récepteurs se distinguent notamment par leurs différences d'affinité en fonction de la nature des CK. La *trans*-zéatine est un des ligands les plus actifs pour les récepteurs présentant tous une grande affinité avec cette isoforme. Par contre, AHK2 et AHK4 présentent également une grande affinité pour iP, alors qu'AHK3 est plus affin avec la dihydrozeatine (DZ) (Spíchal *et al.,* 2004; Stolz *et al.,* 2011; Romanov *et al.,* 2006). Ces préférences de fixation détermineraient le rôle physiologique des isoformes dans la plante en relation avec la co-localisation des isoformes disponibles et l'expression des récepteurs, précisés ultérieurement.

Les caractéristiques communes des HK concernant le cœur catalytique détenant l'activité histidine kinase, sont retrouvées chez les récepteurs aux CK en l'occurrence la présence des domaines DHp et CA (conservation des boîtes de résidus) (FIGURE 9). En plus du domaine receveur

classique en C-terminal des HK hybrides, ils possèdent un domaine supplémentaire en amont dont la fonction reste indéterminée. Différentes études ont permis de montrer l'activité singulière de chaque domaine, telle que la dimérisation (domaine DHp), et les activités kinase et phosphatase (domaine DHp et CA) des HK.

L'homodimérisation d'AHK2 a été démontrée *in vitro* et par double-hybride avec sa partie cytoplasmique (CP) (Dortay *et al.*, 2006) et *in planta* avec les protéines entières (Wulfetange *et al.*, 2011). De plus, AHK2 (CP) est également capable d'interagir avec AHK3 (CP) (Dortay *et al.*, 2006), et de former des homodimères chez la levure (Caesar *et al.*, 2011). L'hétérodimérisation entre les protéines entières (Caesar *et al.*, 2011) ou les parties cytoplasmiques (Dortay *et al.*, 2006) d' AHK3 et AHK4 a également été montrée.

Par ailleurs, des mutations au niveau des résidus histidine et aspartate, sites de phosphorylation et donc majeurs dans le rôle des hybrides HK, ont provoqué une perte des fonctions respectives kinase et phosphatase d'AHK4 (Mähönen *et al.*, 2006; Inoue *et al.*, 2001). En effet, contrairement à AHK2 et AHK3 (Miwa *et al.*, 2007), AHK4 possède une double fonction : en présence de CK, elle détient une fonction kinase et en absence de signal, elle est capable d'agir comme une phosphatase et déphosphoryle notamment ses partenaires HPt (Mähönen *et al.*, 2006). Le phénotype *wol* peut d'ailleurs être explicité par cette caractéristique d'AHK4 : les mutations *wol* rendent AHK4 incapable de fixer les CK, ce qui force AHK4 a exercer son activité phosphatase inhibant ainsi la transduction du signal CK (Lomin *et al.*, 2012). Cette capacité est notamment retrouvée chez certaines HK des systèmes bactériens où elle offre aussi le moyen direct d'exercer un rétrocontrôle du système. D'autre part, Miwa et ses collaborateurs (2007) ont identifié des positions d'acides aminés localisés entre le domaine de fixation du ligand et le résidu histidine conservé chez AHK2, 3 et 4, jouant un rôle dans l'autophosphorylation des HK. Les mutations de ces résidus induiraient un changement de conformation similaire à celui observé lors de la fixation des CK et rendrait l'activation des HK constitutive indifféremment de l'apport de CK.

TABLEAU 2 – Résumé des principales caractéristiques des récepteurs HK chez *Arabidopsis*

HK	Profils d'expression		Dimérisation	Localisation	Régulation transcriptionnelle				Fonction régulation face aux stress			
	RT-PCR	Fusion GUS			CK	Froid	CH	NaCl	ET	Froid	CH	NaCl
ETR1	Racines, tiges, feuilles, fleurs (a)	**PA** : Cotylédons, feuilles, méristème des pousses, fleurs **PR** : Zone méristématique et d'élongation proximale des racines, primordia des racines latérales (a)	ETR1 *in vitro* (b) en levure, *in planta* (a) ERS1, ETR2, ERS2, EIN4 en levure, *in planta* (a)	Membranes RE (a) et appareil de Golgi (c)	→ (z)	/	↓ (d)	↓ (d)	- (f)	/	/	- (g)
ERS1	Racines, tiges, feuilles, fleurs, siliques (a)	**PA** : Cotylédons, feuilles, méristème des pousses, fleurs Collet **PR** : Zone méristématique et d'élongation proximale des racines (a)	ERS1 en levure, *in planta* (a) ETR1, ETR2, ERS2, EIN4 en levure, *in planta* (a)	Membrane RE (a)	→ (z)	/	→ (e)	↑ (e)	- (f)	/	/	/
ETR2	Racines, tiges, fleurs, siliques (a)	/	ETR2 en levure, *in planta* (a) ETR1, ERS1, ERS2, EIN4 en levure, *in planta* (a)		→ (z)	/	→ (e)	→ (e)	- (f)	/	/	/
ERS2	Racines, tiges, fleurs, siliques (a)	/	ERS2 en levure, *in planta* (a) ETR1, ERS1, ETR2, EIN4 en levure, *in planta* (a)		→ (z)	/	↑ (e)	→ (e)	- (f)	/	/	/
EIN4	Racines, tiges feuilles, fleurs (a)	/	EIN4 en levure, *in planta* (a) ETR1, ERS1, ETR2, ERS2 en levure, *in planta* (a)		→ (z)	/	/	/	- (f)	/	/	/

HK	Profils d'expression		Dimérisation	Localisation	Régulation transcriptionnelle				Fonction régulation face aux stress				
	RT-PCR, NB	Fusion GUS			CK	Froid	CH	NaCl	ET	CK	Froid	CH	NaCl
AHK2	Racines, tiges, Feuilles, fleurs (h, i)	**PA•** : Nervures des feuilles, pétioles, axe d'inflorescence, fleurs, siliques (i)	AHK2 *in vitro* & en levure (l) AHK2 *in planta* (n) AHK3 *in vitro* & en levure (l)	Membrane RE (m, n, k)	/	/	↑ (o)	↑ (o)	/	+ (Aa)	- (o, r)	- (o, r)	- (o, r)
AHK3	Racines, tiges, Feuilles, fleurs (h, i)	**PA•** : Feuilles, axe d'inflorescence, fleurs (i) **PR•**	AHK3 en levure (m) AHK2 *in vitro* & en levure (l) AHK4 *in vitro* & en levure (l, m)		/	↑ (o)	↑ (o)	↑ (o)	/	+ (Aa)	- (o, r)	- (o, r)	- (o, r)
AHK4	Racines, tiges, Feuilles, fleurs (h, i)	**PR•** : Stade précoce : procambium Stade graine : cylindre vasculaire et péricentre des racines (j)	AHK3 *in vitro* & en levure (l, m)		↑ (z)	/	↑ (o)	/	/	+ (Aa)	/	- (o)	- (o)
AHK1	Racines, tiges, feuilles (q)	NaCl : Racines, tiges, pétioles (p)	/	Membrane plasmique (i)	↑ (z)	↑ (q)	↑ (o, q)	↑ (q)	/	/	/	+ (o, p)	+ (o)
AHK5	Racines, tiges, feuilles, fleurs, siliques (s, t)	Cellules épidermiques, cellules de garde (s)	/	Cytoplasme, membrane plasmique (s)	/	→ (o)	→ (o)	→ (o)	- (t)	/	/	- (v)	- (u)
CKI1	Fleurs, siliques (y)	**PA** : Tissus vasculaires dans organes floraux, axe d'inflorescence, pédicelle fleur, tissu sporophytique (mâle), procambium des pousses (x)	CKI1 *in vitro, in planta* (x)	Membrane plasmique (w, x)	/	→ (o)	→ (o)	→ (o)	/	/	/	/	/

Profils d'expression : NB : **N**orthern-**B**lot ; PA : **P**arties **A**ériennes ; PR : **P**arties **R**acinaires ; • Tissus dans lesquels les HK sont exprimés préférentiellement ; NaCl : traitement au NaCl / **Régulation transcriptionnelle** : CK : Cytokinines ; CH : Contrainte Hydrique ; ↑ positive ; ↓ négative ; ➞ aucune / **Fonction dans la régulation face aux différents stress** : ET : Ethylène, **-** rôle négatif ; **+** rôle positif. Les récepteurs éthylène sont indiqués en bleu et les récepteurs non éthylène en vert.

REFERENCES : (a) Grefen *et al.*, 2008; (b) Schaller *et al.*, 1995; (c) Dong *et al.*, 2008; (d) Zhao & Schaller, 2004; (e) Cela *et al.*, 2011; (f) Binder, 2008; (g) Wang *et al.*, 2008; (h) Ueguchi *et al.*, 2001; (i) Higuchi *et al.*, 2004; (j) Mähönen *et al.*, 2000; (k) Lomin *et al.*, 2011; (l) Dortay *et al.*, 2006; (m) Caesar *et al.*, 2011; (n) Wulfetange *et al.*, 2011(o) Tran *et al.*, 2007; (p) Wohlbach *et al.*, 2008; (q) Urao *et al.*, 1999; (r) Jeon *et al.*, 2010; (s) Desikan *et al.*, 2008; (t) Iwama *et al.*, 2007; (u) Pham *et al.*, 2012; (v) Pham & Desikan, 2012; (w) Hwang & Sheen, 2001; (x) Hejátko *et al.*, 2009; (y) Deng *et al.*, 2010; (z) Rashotte *et al.*, 2003; (Aa) Hwang *et al.*, 2012

Au niveau cellulaire, les récepteurs sont des protéines transmembranaires présentant leur domaine CHASE d'un côté de la membrane et les domaines kinase et receveur de l'autre côté. Compte tenu du nom du domaine CHASE (**C**YCLASE/**H**ISTIDINE KINASE **A**SSOCIATED **S**ENSORY **E**XTRACELLULAR), il a été longtemps pensé que ce domaine se localisait dans le milieu extracellulaire par analogie avec les cellules bactériennes. Cependant, trois études réalisées sur *Arabidopsis* et le maïs ont montrées que ces récepteurs sont localisés en majorité dans la membrane du RE (Lomin *et al.,* 2011; Wulfetange *et al.,* 2011; Caesar *et al.,* 2011). Il ne faut cependant pas exclure une possible localisation en proportion réduite au niveau de la membrane plasmique. La fixation des CK sur leurs récepteurs est pH dépendante, ce qui est en accord avec cette localisation intracellulaire. En effet, à pH neutre ou basique (caractéristique du cytosol et du RE) la fixation des CK est optimale contrairement à celle à un pH acide (caractéristique de l'apoplasme), moins affine (Romanov *et al.,* 2006).

Au niveau tissulaire, les récepteurs aux CK sont principalement exprimés dans les tissus méristématiques, ce qui est en accord avec leur fonction dans la voie de signalisation CK et donc leur implication dans le développement des plantes. Bien qu'exprimés dans tous les tissus, les transcrits d'AHK2 et 3 seraient préférentiellement exprimés au niveau des pousses aériennes, et ceux d'AHK4 au niveau des racines (Ueguchi *et al.,* 2001; Higuchi *et al.,* 2004). Les récepteurs contribuent tous dans les processus régulés par les CK. En effet, un mutant simple n'induit pas de phénotype marqué. Cependant, ils présentent chacun des fonctions spécifiques. AHK4 joue un rôle dans la régulation de l'élongation des racines primaires (Inoue *et al.,* 2001; Riefler *et al.,* 2006) et également dans le développement de leurs tissus vasculaires (Mähönen *et al.,* 2000). AHK3, lui, est impliqué dans la sénescence des feuilles (Kim *et al.,* 2006) et le contrôle de la différenciation des cellules méristématiques induite par les CK dans les racines primaires (Dello Ioio *et al.,* 2007). Ainsi, en rassemblant les informations décrites précédemment, on peut suggérer que les répartitions variables des isoformes de CK et de leurs récepteurs contribuent grandement à la spécificité des réponses observées (Lomin *et al.,* 2012). Par exemple, le récepteur AHK3 principalement exprimé dans les parties aériennes, fixe les CK de type *trans*-zéatine provenant des racines mais transportées vers les partie aériennes, permettant le contrôle des processus métaboliques survenant dans la feuille. De la même façon, AHK4 majoritairement retrouvé au niveau des racines et y exerçant ses principales fonctions, répond aux isopentenyladenines, CK transportées des parties aériennes aux racines.

Des interactions entre les récepteurs et les AHP ont été répertoriées (TABLEAU 4)

-HK impliquées dans la détection de signaux environnementaux abiotiques et/ou biotiques-

Les plantes sont soumises à une variété de facteurs environnementaux abiotiques ou biotiques nuisibles à leurs développements, et les HK jouent un rôle prépondérant dans leurs réponses.

Urao et ses collaborateurs (1999) ont isolé AHK1 (FIGURE 9, TABLEAU 2), une HK typique contenant tous les domaines requis pour son activité kinase montrée chez la levure. Elle comprend notamment deux régions transmembranaires qui permettent la localisation de la protéine au niveau de la membrane plasmique de la cellule (Caesar *et al.,* 2011). Seule une interaction avec AHP2 a été relevée par utilisation d'un système double-hydride en levure (TABLEAU 4) (Urao *et al.,* 2000). Cette HK est capable d'agir comme un osmosenseur chez la levure en complémentant la croissance d'une souche de levures mutantes *sln1*Δ *sho1*Δ (Urao *et al.,*1999). Sa capacité à complémenter cette souche a mené à l'idée qu'AHK1 pouvait fonctionner de manière analogue à Sln1p chez les plantes. Par étude de mutants, son rôle a également été démontré *in planta*, révélant que sa surexpression rendait les mutants plus tolérants à la contrainte hydrique (Tran *et al.,* 2007) et inversement que les mutants déficients *ahk1* étaient plus sensibles à la sécheresse (Wohlbach *et al.,* 2008) et au stress salin (Tran *et al.,* 2007). Les transcrits d'*AHK1* se localisent principalement dans les racines (Urao *et al.,*1999), et son expression est induite par de nombreux stress (déshydratation, NaCl, froid) (Urao *et al.,*1999; Tran *et al.,* 2007). Il a été relevé que les mutants *ahk1* présentaient également une perte en eau plus rapide au niveau des feuilles par rapport aux plants sauvages (Tran *et al.,* 2007). L'étude des profils transcriptionnels des mutants *ahk1* a montré des changements importants dans l'expression de gènes, et plus précisément une réduction de la transcription des gènes codant des protéines impliquées dans la synthèse de la proline (*P5CS1*) et de l'ABA (*NCED3*). Il a donc été avancé qu'AHK1 déclencherait la synthèse d'osmolytes tels que la proline comme mécanisme d'osmoprotection (Wohlbach *et al.,* 2008), mais également d'ABA augmentant ainsi sa teneur durant un stress osmotique (Tran *et al.,* 2007; Wohlbach *et al.,* 2008). De plus, des graines, dans lesquelles *AHK1* ne s'exprime pas, présentent des phénotypes altérés avec des teneurs réduites en ABA et un taux d'humidité élevé, indiquant qu'AHK1 pourrait également être impliqué dans les processus de dessiccation des graines (Wohlbach *et al.,* 2008). Cependant, les travaux de Kumar et ses collaborateurs (2013) démontrent que le rôle physiologique d'AHK1 serait de prévenir la déshydratation des plantes par régulation de la densité des stomates plutôt que d'induire une tolérance à la sécheresse. En effet, ces auteurs ont montré que des mutants *ahk1* ne présentent aucune sensibilité de croissance au PEG, et une augmentation de la densité de stomates et de l'indice stomatique pouvant expliquer les pertes en eau importante au niveau des feuilles. Dans cette étude,

des niveaux de transcription réduits des gènes *P5CS1* et *NCED3* ont également été mis en évidence, cependant aucune baisse des niveaux d'ABA ou de proline n'a été observée. Les auteurs concluent par le fait qu'AHK1 pourrait détecter directement le statut hydrique de la plante par un mécanisme encore inconnu, régulerait la sensibilité à l'ABA et la densité stomatique, mais n'assurerait pas une des réponses primordiales d'un osmosenseur (comme Sln1p), l'osmoprotection.

Comme AHK1, AHK2, AHK3 et AHK4 (TABLEAU 2) sont capables de complémenter la croissance des souches de levures mutantes *sln1*Δ *sho1*Δ (Reiser *et al.*, 2003; Tran *et al.*, 2007), avec un apport de CK pour AHK4 pour probablement abolir sa fonction phosphatase (Tran *et al.*, 2007). Ces récepteurs CK sont considérés comme des régulateurs négatifs de plusieurs contraintes abiotiques (Tran *et al.*, 2007; Jeon *et al.*, 2010).
Concernant les stress biotiques, la perte de fonction d'AHK2 et d'AHK3 augmenterait la sensibilité envers la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* DC3000, agent pathogène. Bien qu'il ne produirait pas de CK, les auteurs ont montré que c'est cette phytohormone qui stimulerait la résistance des plantes face à ce type d'agent pathogène en modulant les voies de signalisation permettant une réponse de défense (Choi *et al.*, 2010).

AHK5 (Figure 9, TABLEAU 2) s'est révélée avoir un rôle dans les voies de signalisation en réponse à des stress biotiques et abiotiques. Cette HK présente une particularité puisqu'elle ne possède pas de région transmembranaire, qui la situait initialement dans le cytoplasme (Hwang *et al.*, 2002). Cependant, il s'est avéré qu'AHK5 serait également retrouvée au niveau de la membrane plasmique corroboré par la présence de sites de N-myristylation suggérant une association possible à la membrane plasmique (Desikan *et al.*, 2008). Son activité histidine kinase démontrée chez les bactéries est indépendante d'un apport de CK et d'ABA (Iwama *et al.*, 2007). De plus, des interactions avec des AHP ont été montrées chez la levure et *in planta* (TABLEAU 4) (Mira-Rodado *et al.*, 2012; Bauer *et al.*, 2013) et ont été validées par l'obtention du cristal de l'interaction AHK5/AHP1 (Bauer *et al.*, 2013). L'étude d'expression des transcrits d'*AHK5* a montré que ce gène s'exprimait dans la plupart des tissus mais principalement dans les racines et les fleurs (Iwama *et al.*, 2007; Desikan *et al.*, 2008). Il a également été montré qu'AHK5 s'exprimait dans les cellules épidermiques et les cellules de garde, ce qui est en accord avec un rôle intégrateur de différents *stimuli* biotiques et abiotiques dans les cellules de garde par la régulation de l'homéostasie du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), permettant ainsi la fermeture des stomates (Desikan *et al.*, 2008). Initialement, il a été démontré qu'AHK5 agissait comme un régulateur négatif dans l'inhibition de la croissance racinaire causé par l'ABA/éthylène (Iwama *et al.*, 2007). Plus récemment, le rôle d'AHK5 dans la résistance de la plante face à deux agents pathogènes (*Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* DC3000, *Botrytis cinerea*) et dans la régulation négative d'un stress salin a été avancé (Pham *et al.*, 2012). Etant donné

que des interconnexions des voies de signalisation du stress salin et de la sécheresse existent, les auteurs ont testé le rôle potentiel d'AHK5 dans la résistance à la sécheresse. Ils ont montré que les mutants *ahk5* étaient plus résistants à la sécheresse dégageant ainsi un rôle négatif dans la régulation de ce stress (Pham & Desikan, 2012).

-CKI1, une HK à part ?-

CKI1 (FIGURE 9, TABLEAU 2) a été la première HK découverte impliquée dans la perception des CK (Kakimoto, 1996). Les auteurs ont observé que sa surexpression dans des cals d'*Arabidopsis* sans apport de CK mimait les réponses typiques engendrées par les CK exogènes, aboutissant à l'idée que CKI1 pouvait être un récepteur aux CK. Cependant, CKI1 ne présente pas de domaine CHASE et est incapable de fixer des CK *in vitro* (Yamada *et al.*, 2001). De plus, CKI1 est capable, sans apport de CK d'activer le promoteur du gène codant l'ARR6 (RR-A) dans des protoplastes d'*Arabidopsis* (Hwang & Sheen, 2001) et de complémenter un gène muté codant une HK homologue bactérienne (RcsC) (Yamada *et al.*, 2001). La nécessité des résidus histidine et aspartate, définissant les domaines donneur et receveur du groupement phosphate a également été démontrée comme indispensable à sa fonction (Hwang & Sheen, 2001). La structure cristallographique du RD de cette protéine est disponible et ressemble particulièrement au RD de l'un des récepteur à l'éthylène, ETR1 (Klumpler *et al.*, 2009; Pekárová *et al.*, 2011).

CKI1 est également capable de former des homodimères (mais pas d'hétérodimère) *in vitro* et *in planta* visualisés au niveau de la membrane plasmique (Hejátko *et al.*, 2009), et présente des sites putatifs de glycosylation (Hwang & Sheen, 2001). Son expression préférentielle dans les fleurs et les siliques (Deng *et al.*, 2010) et dans les tissus vasculaires des tiges (Hejátko *et al.*, 2009) corrobore l'idée d'un rôle majeur dans le développement du mégagamétophyte et dans les tissus vasculaires des pousses aériennes d'*Arabidopsis* (Pischke *et al.*, 2002; Hejátko *et al.*, 2003; 2009; Deng *et al.*, 2010). La surexpression de CKI1, entrainant des réponses liées aux CK, a mené Deng et ses collaborateurs (2010) à proposer l'hypothèse que les récepteurs CK et CKI1 seraient activés indépendamment, mais que les voies initiées par chaque type de récepteur convergeraient vers un même système de signalisation par l'intermédiaire des HPt. Ces protéines établiraient le lien direct de CKI1 avec la mise en place de réponses impliquées dans des processus développementaux dépendants de cette hormone.

Pour finir, comme pour les autres HK, des interactions avec les AHP ont été observées en levure et *in planta* (TABLEAU 4) (Urao *et al.*, 2000; Pekárová *et al.*, 2011). Comme AHK4, la partie C-terminale de CKI1 possèderait également une activité phosphatase, la rendant capable de déphosphoryler AHP1 et AHP2 *in vitro* (Nakamura *et al.*, 1999).

Les protéines relais de phosphate (HPt)

Les HPt (TABLEAU 3) ont un rôle essentiel dans les phosphorelais multiples puisqu'elles transmettent le phosphate des récepteurs HK au RR (Suzuki *et al.*, 1998). Chez *Arabidopsis*, il existe cinq AHP (***Arabidopsis* H**istidine containing **P**hosphotransfer), qui possèdent dans leurs séquences le résidu essentiel accepteur de phosphate (donné par le récepteur), le résidu histidine. AHP6 est une pseudo-HPt présentant une mutation du résidu histidine en résidu asparagine (Suzuki *et al.*, 2000). La structure complète des HPt est connue depuis que les cristaux des protéines HPt du maïs, ZmHP1 et ZmHP2 ont été obtenus (Sugawara *et al.*, 2005a; 2005b).

Plusieurs études se sont intéressées aux profils d'expression des HPt au sein de la plante par diverses techniques. Hradilová & Brzobohatý (2007) ont montré en utilisant la technique de la Q-PCR, que les transcrits des *AHP1*, *2*, *3* et *5* sont détectés dans tous les organes testés, contrairement à *AHP4* plus faiblement exprimée. Globalement, les résultats de l'ensemble des études ont montré que *AHP1*, *2*, *4* et *6* ont des expressions organo-spécifiques contrairement aux *AHP3* et *5* qui sont ubiquitaires (TABLEAU 3) (Suzuki *et al.*, 1998; 2000; Tanaka *et al.*, 2004; Mähönen *et al.*, 2006; Hradilová & Brzobohatý, 2007; Jung *et al.*, 2008). Les AHP sont également capables de former des hétéro- et/ou des homodimères dans la levure (Dortay *et al.*, 2006) et *in planta* (Punwani *et al.*, 2010). Des études antérieures de localisation subcellulaire, ont montré que ces protéines sont généralement cytosoliques et qu'elles sont transférées dans le noyau suite à une exposition ou un traitement aux CK (Hwang & Sheen, 2001; Tanaka *et al.*, 2004). Récemment, la localisation nucléo-cytoplasmique des AHP1, 2, 3, 4, et 5 a été montrée (Dortay *et al.*, 2008; Punwani *et al.*, 2010; Punwani & Kieber, 2010) et contrairement à ce qui avait été observé, cette localisation est indépendante du signal CK (AHP1, 2, 4 et 5) (Punwani *et al.*, 2010; Punwani & Kieber, 2010) ou du froid (AHP1, 2, 4 et 5) (Jeon & Kim, 2013). Les HPt auraient donc une localisation non statique, en accord avec leur fonction, se déplaçant incessamment entre le cytosol et le noyau par le biais d'un potentiel transport actif (Punwani *et al.*, 2010). Contrairement aux études antérieures (Rashotte *et al.*, 2003; Brenner *et al.*, 2005), une étude récente a montré par Q-PCR que les transcrits des gènes *AHP1, 2, 3* et *4* sont régulés positivement en réponse à un traitement aux CK exogènes ou à une augmentation du taux de CK endogènes (induction d'un gène IPT) de courte durée (de 1 à 24 heures) (Hradilová *et al.*, 2007). *AHP5*, lui, ne présente aucune régulation de ses transcrits face à ce signal (Hradilová *et al.*, 2007).

De par leur redondance fonctionnelle, l'étude des mutants *ahp* afin de comprendre leur rôle a nécessité l'utilisation de mutants triples au minimum. Ces études ont montré une insensibilité de

ces mutants face aux CK révélant ainsi leur rôle de régulateur positif dans la voie de transduction du signal CK (Mähönen *et al.*, 2000; Hutchison *et al.*, 2006). Inversement, l'hyper-sensitivité des plantes face aux CK a été visualisée lors de l'utilisation de mutants sur-exprimant les AHP (Suzuki *et al.*, 2002).

Des études ont également été réalisées afin de comprendre le rôle des AHP dans deux stress abiotiques, le froid et la sécheresse. Malgré le fait que l'expression des *AHP1, 2, 3, 4* et *5* ne soit pas induite par le froid, le triple mutant *ahp2, 3, 5* montre des taux réduits de transcrits de certains gènes régulés par le froid (Jeon & Kim, 2013). Nishiyama et ses collaborateurs (2013) ont montré que ce même triple mutant est plus tolérant à la sécheresse. Ces AHP fonctionnent donc en combinaison en tant que régulateurs négatifs de l'adaptation de la plante à un déficit hydrique, avec un rôle prépondérant d'AHP2 et 3. Cette tolérance serait liée au maintien d'un statut hydrique important des plantes associé à une préservation de l'intégrité membranaire plutôt qu'à des différences de densité stomatique ou de fermeture des stomates.

Compte tenu de leur rôle de médiateurs de la voie entre les HK et les RR, des études d'interaction de protéines ont été réalisées, révélant ainsi que les AHP sont capables d'interagir avec la plupart des membres d'une même famille de protéines qui s'agissent en amont (HK) ou en aval (RR) des phosphorelais multiples chez *Arabidospis* (TABLEAU 4). Ainsi la redondance fonctionnelle des AHP et la nature de leurs partenaires, laissent supposer qu'elles constituent des éléments intégrateurs à l'interface de différentes HK (qui détectent des *stimuli* différents) et d'autres protéines nucléaires ou cytoplasmiques (Punwani & Kieber, 2010). Cependant, Pekárová et ses collaborateurs (2011) ont montré que CKI1 disposait de partenaires préférentiels HPt, illustrant de fait que les systèmes de phosphorelais multiples maintiennent une certaine spécificité des voies de signalisation comme dans les systèmes bactériens.

TABLEAU 3 – Résumé des principales caractéristiques des HPt chez *Arabidopsis*

	Profils d'expression		Dimérisation	Localisation	Régulation transcriptionnelle				Fonction régulation face aux stress		
	RT-PCR, NB	Fusion -GUS et -GFP			CK	Froid	CH	NaCl	CK	Froid	CH
AHP1	Racines*, feuilles, fleurs, siliques (a, b)	/	AHP5$^{en\ levure}$ (e)		↑ (i)	→ (j)	/	/	+ (l, m, n)	/	/
AHP2	Racines, tiges, feuilles*, fleurs*, siliques (a, b)	/	AHP2$^{in\ planta}$ (f)		↑ (i)	→ (j)	↓ (k)	↓ (k)	+ (l, m, n)	/	- (k)
AHP3	Racines, tiges, feuilles, fleurs, siliques (a, b)	/	AHP5$^{en\ levure}$ (e)	Noyau et cytoplasme (f, g, h)	↑ (i)	→ (j)	↓ (k)	↓ (k)	+ (l, m, n)	/	- (k)
AHP4	Feuilles*, tiges, fleurs* jeunes et matures, silique (a, b, c)	/	AHP5$^{en\ levure}$ (e)		↑ (i)	→ (j)	/	/	+ (l, m, n)	/	/
AHP5	Racines, tiges, feuilles, fleurs, siliques (a, b)	/	AHP1, AHP2, AHP3, AHP4, AHP5$^{en\ levure}$ (e)		→ (i)	→ (j)	↓ (k)	↓ (k)	+ (l, m, n)	/	- (k)
AHP6	/	**PA** : apex des pousses, jeunes feuilles, cotylédons **PR** : protoxylème, cellules péricentrales (d)			↓ (d)	/	/	/	- (d)	/	/

Profils d'expression : NB : **N**orthern-**B**lot ; PA : **P**arties **A**ériennes ; PR : **P**arties **R**acinaires ; * Tissus dans lesquels les AHP sont exprimés préférentiellement / **Régulation transcriptionnelle** : CK : Cytokinines ; CH : Contrainte Hydrique ; ↑ positive ; ↓ négative ; → aucune / **Fonction dans la régulation face aux différents stress** : **-** rôle négatif ; **+** rôle positif.

REFERENCES : (a) Hradilová & Brzobohatý, 2007; (b) Tanaka *et al.*, 2004; (c) Jung *et al.*, 2008; (d) Mähönen *et al.*, 2006b; (e) Dortay *et al.*, 2006; (f) Punwani *et al.*, 2010; (g) Dortay *et al.*, 2008; (h) Punwani & Kieber, 2010; (i) Hradilová *et al.*, 2007; (j) Jeon & Kim, 2013; (k) Nishiyama *et al.*, 2013; (l) Mähönen *et al.*, 2000; (m) Mähönen *et al.*, 2006; (n) Hutchison *et al.*, 2006

Les régulateurs de réponses (RR)

Les régulateurs de réponses (RR) représentent les derniers partenaires des relais multiples de phosphate constituant des régulateurs majeurs des voies de signalisation. Dans le génome d'*Arabidopsis*, il existe 32 gènes codant pour des RR (Hwang *et al.*, 2002). Communément aux bactéries et aux levures, la caractéristique principale des RR est la présence dans leur domaine receveur de deux résidus aspartate et un résidu lysine (DDK) conservés, le 2ème résidu aspartate étant le siège de la réception du phosphate provenant des HPt. Le transfert de phosphate entre les AHP et les RR a été démontré à plusieurs reprises *in vitro* (Suzuki *et al.*, 1998; Imamura *et al.*, 2001; Imamura *et al.*, 2003; Kiba *et al.*, 2004; Mähönen *et al.*, 2006). Basé sur la comparaison des séquences en acides aminés et sur la structure de leurs domaines, les RR ont été classés initialement en trois familles : les RR-A, les RR-B et les pseudo-RR (FIGURE 10).

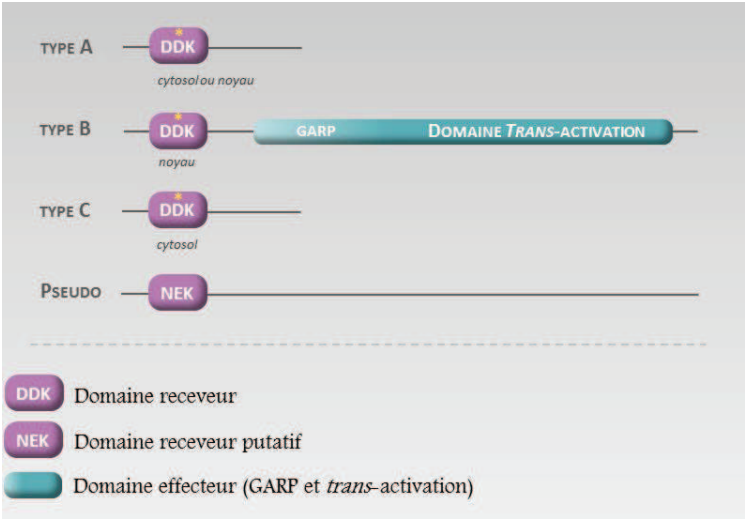


FIGURE 10 – Famille des Régulateurs de Réponse chez *Arabidopsis thaliana*

Modifiée d'après Hwang *et al.* (2002)

Les RR se répartissent en quatre familles : Les RR de type-A, de type-B, de type-C et les pseudo-RR. Les résidus aspartate (D), lysine (K), glutamate (E) sont indiqués. Le site de phosphorylation conservé D est visualisé par un astérisque.

Les RR-A contiennent le domaine receveur avec le résidu aspartate conservé et une extrémité C-terminale courte (Imamura *et al.*, 1998).

Les RR-B, quant à eux, possèdent en plus du domaine receveur complet, un domaine de fixation à l'ADN appelé domaine GARP et une séquence de *trans*-activation dans leur extrémité C-terminale (Gupta & Rashotte, 2012), les caractérisant comme facteurs de transcription.

Les pseudo-RR ne présentent pas de domaine receveur typique, le 2ème résidu aspartate est remplacé par un résidu glutamate, asparagine ou glutamine (Hwang *et al.*, 2002). N'étant pas

impliqué dans les relais multiple de phosphate (Mizuno & Nakamichi, 2005), nous ne traiterons pas ce type de RR.

Récemment, une 4ème famille de RR a été dégagée. Cette dernière rassemblent des RR de type-C ressemblant au RR-A mais à la différence qu'ils ne sont pas régulés par les CK (Kiba *et al.*, 2004; Horák *et al.*, 2008).

-Les régulateurs de réponse de type A-

Arabidopsis compte 10 gènes codant des RR de type-A (ARR3 à 9 et ARR15 à 17) regroupés par paires (TABLEAU 5) (To *et al.*, 2004). Ces RR présentent un fort degré de similitude avec le RR bactérien CheY, qui ne possède pas de domaine effecteur (D'Agostino & Kieber, 1999). Sans CK, ces différentes paires de RR-A s'expriment de façon différentielle au niveau tissulaire des plants d'*Arabidopsis* (TABLEAU 5). Cependant lors d'un apport de CK, une des caractéristiques importantes des RR-A est leur régulation positive et rapide (dès 10 minutes d'exposition) de leurs transcrits. Certains RR présentent une forte induction, dont ARR5, 6, 7 et 15 par rapport aux autres, tels que ARR4, 8 et 9 dont l'induction est plus modérée (Taniguchi *et al.*, 1998; D'Agostino *et al.*, 2000; Rashotte *et al.*, 2003). De plus, il a été rapporté que sous l'impact des CK, l'augmentation des transcrits des RR-A est observée dans tous les organes de la plante (Taniguchi *et al.*, 1998; D'Agostino *et al.*, 2000), aboutissant à une co-expression des différents RR, principalement au niveau des racines (To *et al.*, 2004). Leur transcription serait en partie régulée par les RR-B (Hwang & Sheen, 2001; Sakai *et al.*, 2001) et serait indépendante de la synthèse *de novo* de protéines, suggérant ainsi que les RR-A sont des gènes de réponse primaire aux CK (Brandstatter & Kieber, 1998; D'Agostino *et al.*, 2000).

Régulateurs du signal cytokinine

Plusieurs études de mutagénèse ont permis de dégager le rôle de régulateurs négatifs des RR-A dans la voie de signalisation CK. To et ses collaborateurs (2004) ont observé que le septuple mutant *arr3, 4, 5, 6, 7, 8, 9* présentait une plus forte sensibilité aux CK par rapport aux plants sauvages. De plus, la surexpression de RR-A comme ARR7 a montré un effet de répresseur transcriptionnel de plusieurs gènes régulés rapidement par les CK, dont les transcrits d'autres RR-A (Lee *et al.*, 2007).

TABLEAU 4 – Récapitulatif des interactions entre les récepteurs HK et les HPt, entre les RR et les HPt chez *Arabidopsis*

Récepteurs éthylène	Récepteurs non éthylène					
ETR1	AHK2	AHK3	AHK4	AHK1	AHK5	CKI1
AHP1 *in vitro*, en levure (a, b) AHP2 en levure (b) AHP3 en levure (b)	AHP1 en levure (c) AHP2 en levure (c) AHP3 en levure (c) AHP5 en levure (c)	AHP1 en levure (c) AHP2 en levure (c) AHP3 en levure (c) AHP5 en levure (c)	AHP1 *E. Coli*, en levure (c, d) AHP2 *E.coli*, en levure (c, d) AHP3 *E.coli*, en levure (c, d) AHP5 *E.coli*, en levure (c, d)	AHP2 en levure (b)	AHP1 en levure, *in planta* (e, f) AHP2 en levure, *in planta* (e, f) AHP3 en levure, *in planta* (e, f) AHP5 en levure, *in planta* (e, f) AHP6 *in planta* (f)	AHP2 en levure, *in planta* (b, g) AHP3 en levure, *in planta* (b, g) AHP5 en levure, *in planta* (b, g)

Régulateurs de réponse type-A						
ARR3	ARR4	ARR5	ARR6	ARR7	ARR8	ARR9
AHP1 en levure (c, h) AHP2 en levure (c, h) AHP3 *in vitro*, en levure (c, h) AHP5 *in vitro*, en levure (c)	AHP1 en levure (c) AHP2 en levure (c) AHP3 *in vitro*, en levure (c) AHP5 *in vitro*, en levure (c)	AHP1 *in vitro*, en levure (c) AHP2 *in vitro*, en levure (c, h) AHP3 *in vitro*, en levure (c, h) AHP5 *in vitro*, en levure (c)	AHP1 en levure (c) AHP2 en levure (c) AHP3 en levure (c) AHP5 *in vitro*, en levure (c)	AHP1 *in vitro*, en levure (c, h) AHP2 *in vitro*, en levure (c, h) AHP3 *in vitro*, en levure (c, h) AHP5 *in vitro*, en levure (c)	AHP1 en levure (c, h) AHP2 en levure (c) AHP3 en levure (c, h) AHP5 *in vitro*, en levure (c)	AHP1 en levure (c) AHP2 en levure (c, h) AHP3 en levure (c, h) AHP5 *in vitro*, en levure (c)

Régulateurs de réponse type-A			Régulateurs de réponse type-B					
ARR15	ARR16	ARR17	ARR1	ARR2	ARR10	ARR11	ARR12	
AHP5 *in vitro*, en levure (c)	AHP1 *in vitro*, en levure (c) AHP2 *in vitro*, en levure (c) AHP3 *in vitro*, en levure (c) AHP5 *in vitro*, en levure (c)		AHP1 *in vitro*, en levure (c) AHP2 *in vitro*, en levure (c) AHP3 *in vitro*, en levure (c, h) AHP4 *in vitro*, en levure (c) AHP5 *in vitro*, en levure (c)	AHP1 *in vitro*, en levure (c, h, j) AHP2 *in vitro*, en levure (c, h, j) AHP3 *in vitro*, en levure (c, h) AHP4 *in vitro*, en levure (c) AHP5 *in vitro*, en levure (c)	AHP1 *in vitro*, en levure (c, k) AHP2 *in vitro*, en levure (c, k) AHP3 *in vitro*, en levure (c, k)	AHP2 *in vitro*, en levure (c) AHP5 *in vitro*, en levure (c)		

Régulateurs de réponse type-B						Régulateurs de réponse type-C	
ARR13	ARR14	ARR18	ARR19	ARR20	ARR21	ARR22	ARR24
	AHP1 *in vitro*, en levure (c) AHP2 *in vitro*, en levure (c, h) AHP3 *in vitro*, en levure (c) AHP5 *in vitro*, en levure (c)	AHP1 *in planta* (l) AHP2 en levure, *in planta* (l) AHP3 en levure, *in planta* (l) AHP5 en levure, *in planta* (l)				AHP2 en levure, *in planta* (i) AHP3 en levure, *in planta* (i) AHP5 en levure, *in planta* (c, i)	

REFERENCES : (a) Scharein *et al.,* 2008; (b) Urao *et al.,* 2000; (c) Dortay *et al.,* 2006; (d) Suzuki *et al.,* 2000; (e) Mira-Rodado *et al.,* 2012; (f) Bauer *et al.,* 2013; (g) Pekárová *et al.,* 2011; (h) Dortay *et al.,* 2008; (i) Horák *et al.,* 2008; (j) Lohrmann *et al.,* 2001; (k) Imamura *et al.,* 1999; (l) Veerabagu *et al.,* 2012

Malgré leur redondance fonctionnelle, prouvée par les phénotypes des simples ou doubles mutants, ils présentent des modes d'action spécifiques dans la croissance et le développement (bien qu'ils soient des régulateurs négatifs). Par exemple, les mutants *arr5* et *6* présentent des phénotypes opposés dans la croissance des racines primaires et latérales, et également au niveau de la durée de floraison (Ren *et al.,* 2009).

Les mécanismes impliqués dans la régulation négative de la voie par les RR-A ne sont pas encore complètement connus. Deux hypothèses sont envisageables : la première est que les RR-A interfèreraient avec les RR-B par compétition pour l'obtention du résidu phosphate provenant des AHP et la deuxième hypothèse est que les RR-A réguleraient la voie en interagissant de manière directe ou indirecte avec les membres de cette voie de signalisation (To *et al.,* 2007).
Pour le moment aucune interaction entre des RR-A et des RR-B n'a été mise en évidence. Cependant, les RR-A peuvent interagir avec les HPt dans la levure en système double-hydride (Dortay *et al.,* 2006) (TABLEAU 4), interaction renforcée par la co-localisation des AHP et des RR-A *in planta*. Certains RR-A (ARR5, 6, 7, 8, 9, 15) sont retrouvés uniquement dans le noyau et d'autres (ARR3, 4, 16) ont une localisation nucléo-cytoplasmique (Hwang & Sheen, 2001; Imamura *et al.,* 2001; Kiba *et al.,* 2002; Dortay *et al.,* 2008).
Des transferts de phosphate *in vitro* entre les AHP et les RR-A ont également été démontrés (Suzuki *et al.,* 1998; Imamura *et al.,* 2001; 2003). Des études récentes ont montré que la phosphorylation du résidu aspartate conservé des ARR5 et 7 était nécessaire pour qu'ils agissent en régulateurs négatifs (To *et al.,* 2007; Lee *et al.,* 2008).

En plus du rétrocontrôle de la voie par les RR-A, il existerait d'autres mécanismes de régulation notamment de l'activité des RR-A. Les CK seraient capables de stabiliser les protéines RR-A (ARR5, 6, 7, 16 et 17) *via* les AHK et les AHP, et la phosphorylation du résidu aspartate jouerait d'ailleurs un rôle dans cette stabilisation puisque les mutants de RR-A mimant la phosphorylation (résidu D muté en résidu E) seraient plus stables que les mutants mimant la non phosphorylation (résidu D muté en résidu N) (To *et al.,* 2007; Ren *et al.,* 2009). Ren et ses collaborateurs (2009) ont montré que certains RR-A seraient régulés par un mécanisme de dégradation par le protéasome lié au signal CK.

Régulateurs de signaux engendrés par des stress abiotiques

Outre le signal CK, les ARR seraient également régulés par des stress abiotiques tels que le froid, le NaCl et la déshydratation (Urao *et al.,* 1998; Jeon *et al.,* 2010; Mason *et al.,* 2010).

Il a été montré que certains RR-A possédaient un rôle négatif dans la voie de signalisation froid en inhibant la voie ABA. En effet, des mutants *arr7* sont plus tolérants à des traitements au froid et à l'ABA que les plantes sauvages (Jeon *et al.,* 2010).

De plus, face à un stress salin, plusieurs RR-A auraient un rôle positif en évitant l'accumulation de sodium dans les pousses des plants d'*Arabidopsis* (Mason *et al.,* 2010).

Enfin, Wohlbach et ses collaborateurs (2008) ont montré que les deux paires ARR3/4 et ARR8/9 exercent des rôles opposés dans la voie de signalisation stress osmotique, et ont respectivement une action positive et négative face à ce stress.

-Les régulateurs de réponse de type-B-

Les RR de type-B sont constitués de deux domaines comme décrits précédemment (FIGURE 10).

En plus de son rôle dans la réception du phosphate, le domaine RD joue un rôle primordial dans les interactions avec les AHP en constituant le domaine minimal d'interaction avec ces protéines (Imamura *et al.,* 1999; Lohrmann *et al.,* 2001). Plusieurs interactions entre les RR-B et les AHP ont été testées par différentes techniques (Imamura *et al.,* 1999; Dortay *et al.,* 2006; 2008; Veerabagu *et al.,* 2012), et sont résumées dans le TABLEAU 4.

Par étude phylogénétique de leur RD, la famille des RR de type-B chez *Arabidopsis* comprenant 11 membres (ARR1, 2, 10-14, 18-21) peut être divisée en trois sous-familles : la sous-famille I avec ARR1, 2, 10-12, 14, 18, la sous-famille II avec ARR13 et 21, et la sous-famille III avec l'ARR19 et 20 (Mason *et al.,* 2004). Les membres RR-B de chaque sous-famille présentent globalement les mêmes profils d'expression des transcrits de leurs gènes (TABLEAU 6). En effet, les membres de la sous-famille I sont globalement exprimés dans la plante entière, sauf pour les RR14 et 18 retrouvés principalement dans les fleurs et les siliques. Basée sur des études de localisation *via* l'utilisation de protéines de fusion avec la protéine GUS, les ARR1, 2, 10 et 12 présentent une co-localisation dans les parties aériennes et racinaires. Les RR des sous-familles II et III sont, eux, majoritairement localisés dans les organes de reproduction, mais présentent une localisation

d'expression commune avec les membres de la sous-famille I dans les parties aériennes et les trichomes (Tajima *et al.,* 2004; Mason *et al.,* 2004).

Le domaine de fixation à l'ADN (DBD) appelé à l'origine le motif B (Hwang *et al.,* 2002) est apparenté à la famille du domaine MYB, qualifié de domaine GARP chez les plantes (Riechmann *et al.,* 2000). Ce domaine est spécifique de certains facteurs de transcription (FT) trouvés uniquement chez les plantes, et son nom provient de sa découverte dans plusieurs FT d'espèces différentes : **G**OLDEN2 (*Zea mays*), **ARR** de type-B (*Arabidopsis*), **P**sr1 (*Chlamydomonas*). Plusieurs études ont montré que la séquence d'ADN 5' A/GGATT/C 3' est le site de fixation du DBD des RR-B (ARR1, 2, 10 et 11) *in vitro* (Sakai *et al.,* 2000; Imamura *et al.,* 2003; Hosoda *et al.,* 2002) et *in vivo* (Ross *et al.,* 2004). Les promoteurs des gènes codant les RR-A (Rashotte *et al.,* 2003), et les AHP (Hradilová *et al.,* 2007) seraient d'ailleurs riches de ce motif.

La séquence d'activation de la transcription se situe dans la partie carboxy-terminale des RR-B. Elle est riche en proline et en glutamine qui est une caractéristique des facteurs de transcription (Triezenberg, 1995), et en combinaison avec un DBD, ces deux structures permettent de *trans*-activer l'expression de gènes de réponse et notamment des RR-A (Sakai *et al.,* 2001; Hwang & Sheen, 2001; Veerabagu *et al.,* 2012).

Le dernier point nécessaire pour attitrer les RR-B comme facteur de transcription est leur localisation nucléaire. La présence de NLS (**N**uclear **L**ocalisation **S**ignal) dans la partie C-terminale de la protéine localisait hypothétiquement ces RR dans le noyau, ce qui a été confirmée dans de nombreuses études *in planta* (TABLEAU 6) (Sakai *et al.,* 2000; Lohrmann *et al.,* 2001; Imamura *et al.,* 2001; Hwang & Sheen, 2001; Mason *et al.,* 2004; Dortay *et al.,* 2008; Veerabagu *et al.,* 2012). Il faut noter que leur localisation n'est pas dépendante de leur état de phosphorylation (Hwang & Sheen, 2001; Veerabagu *et al.,* 2012). Par ailleurs, la capacité de dimérisation des RR-B a été montrée *in vitro* pour l'ARR14 (Dortay *et al.,* 2006) et dans la levure et *in planta* pour l'ARR18 (Veerabagu *et al.,* 2012).

Rôle dans les voies de signalisation aux phytohormones

Cytokinines

Il a été rapporté que la plupart des membres de la sous-famille I seraient impliqués dans les réponses face aux CK, et sont exprimés dans les organes et tissus où cette phytohormone joue un rôle

crucial, et ce malgré leur absence de régulation transcriptionnelle face aux CK (Imamura *et al.,* 1999; Rashotte *et al.,* 2003).

Afin de déterminer la contribution des RR-B (sous-famille I) dans la croissance et le développement des plantes au sein de la voie de signalisation des CK, plusieurs études de mutants ont été réalisées. La surexpression de l'ARR2 stimulerait la prolifération des cellules et la formation de pousses aériennes *in vitro* sans apport de CK (Hwang & Sheen, 2001). De plus, Sakai et ses collaborateurs (2001) ont montré que la surexpression de l'ARR1 augmentait la sensibilité des mutants face aux CK et également l'expression du RR-A, ARR6, et inversement pour les mutants *arr1*. Des études mettant en jeu des mutants multiples ont montré une insensibilité plus marquée que les mutants simple ou double témoignant encore une fois de leur redondance fonctionnelle (Mason *et al.,* 2005; Yokoyama *et al.,* 2007; Argyros et al., 2008; Ishida *et al.,* 2008). Les RR-B seraient donc des régulateurs positifs du signal CK.

De plus, la contribution des RR-B aux réponses face aux CK serait corrélée à leurs profils d'expression spécifiques. En effet, il a été montré que les taux d'expression des ARR1, et 10 augmentaient après la germination leur permettant ainsi de jouer leur rôle dans le contrôle des divisions cellulaires du méristème, alors que les ARR2 et 11 n'exerçant pas cette fonction sont retrouvés en quantité moindre dans les racines (Dello Ioio *et al.,* 2008; Moubayidin *et al.,* 2010; Hill *et al.,* 2013).

Cependant, les faibles taux de transcrits de certains gènes *RR-B*, et leurs profils d'expression limités rend l'obtention de phénotypes mutants difficile (Hill *et al.,* 2013). De ce fait, la caractérisation fonctionnelle de certains RR-B présentant ces caractéristiques par des études de mutants devient limitée. D'ailleurs, les RR-B dont la fonction dans la voie de signalisation CK a été déterminée sont ceux qui présentent des profils d'expression les plus larges et de forts taux d'expression dans la plante (ARR1, 10, 12). Afin de contourner ce biais et de pouvoir comparer le rôle fonctionnel de l'ensemble des RR-B dans des conditions comparables, Hill et ses collaborateurs (2013) ont exprimé les 11 RR de type-B en aval du promoteur de l'ARR1 et ont déterminé ceux qui pouvaient restituer le phénotype du mutant *arr1, arr12* exposé aux CK. Contrairement aux ARR11, 14, 18, 13, 19 et 20, les ARR1, 2, 10, 12 et 21 sont capables de le restituer, bien que l'ARR11 fasse partie de la même sous-famille que l'ARR1 et 12, et que l'ARR21 soit un membre éloigné phylogénétiquement de cette sous-famille. Ainsi, cette étude montre d'une part la conservation de la fonction de facteurs de transcription chez tous les membres des RR-B, bien que leur fonction dans la voie CK ne soit pas encore pleinement étudiée, et d'autre part, l'existence de différences fonctionnelles apparentes face aux CK. Les hypothèses avancées concernant ces différences sont :

i) des cibles différentes entre les RR-B puisque le motif de fixation à l'ADN n'est pas strictement identique pour tous (abordée en PARTIE II, Chapitre 2).

TABLEAU 5 – **Résumé des principales caractéristiques des régulateurs de réponse de type-A chez *Arabidopsis***

	Profils d'expression		Dimérisation	Localisation	Régulation transcriptionnelle				Fonction régulation face aux stress			
	NB	Fusion GUS			CK	Froid	CH	NaCl	CK	Froid	CH	NaCl
ARR3		**PA :** Système vasculaire des pousses (d)		noyau, cytosol (h)	↑ (b, i)				- (n)		+ (m)	+ (l)
ARR4	Racines, tiges, feuilles (a, e)	**PA :** Système vasculaire des pousses (d)		noyau, cytosol (h)	↑ (b, i, j)	↑ (k, e)	↑ (e)	↑ (e)	- (n)		+ (m)	+ (l)
ARR5	Racines (e), tiges, feuilles, fleurs (a)	**PA :** Région méristématique des pousses (d)		noyau (h)	↑ (b, i, j)	↑ (k, e)	↑ (e)	↑ (e, l)	- (n)	- (k)		+ (l)
ARR6	Racines, feuilles (b)	**PA :** Région méristématique des pousses (d)		noyau (f, g, h)	↑ (b, i)	↑ (k)			- (n)	- (k)		+ (l)
ARR7	Feuilles, fleurs (b)	**PA :** Régions méristématiques des pousses et des fleurs, tissus vasculaires des feuilles, valves de la silique, pistil **PR :** Régions méristématiques et tissus vasculaires des racines (k)		noyau (g, c, h)	↑ (b, i, j)	↑ (k)	↑ (k)	↑ (k)	- (n)	- (k)		
ARR15		CK : Tissu vasculaire des racines (c)		noyau (c, h)	↑ (b)	↑ (k)						
ARR8	Racines (e)	**PR :** Tissus racinaires (d)		noyau (h)	↑ (b, j)	→ (k)		→ (e)	- (n)		- (m)	+ (l)
ARR9	Racines, feuille, fleurs, graine (e)			noyau (h)	↑ (b)	→ (k)		→ (k)	- (n)		- (m)	+ (l)
ARR16		CK : Endoderme des racines (c)		noyau, cytosol (c, h)	↑ (b, j)	→ (k)						
ARR17						→ (k)						

Profils d'expression : NB : **N**orthern-**B**lot ; PA : **P**arties **A**ériennes ; PR : **P**arties **R**acinaires, CK : traitement aux cytokinines / **Régulation transcriptionnelle :** CH : Contrainte Hydrique ; ↑ positive ; → aucune / **Fonction dans la régulation face aux différents stress :** - rôle négatif ; + rôle positif. Les paires des protéines RR-A sont représentées par les différentes couleurs.

REFERENCES : (a) Brandstatter & Kieber, 1998; (b) D'Agostino *et al.*, 2000; (c) Kiba *et al.*, 2002; (d) To *et al.*, 2004; (e) Urao *et al.*, 1998; (f) Hwang & Sheen, 2001; (g) Imamura *et al.*, 2001; (h) Dortay *et al.*, 2008; (i) Taniguchi *et al.*, 1998; (j) Rashotte *et al.*, 2003; (k) Jeon *et al.*, 2010; (l) Mason *et al.*, 2010; (m)Wohlbach *et al.*, 2008; (n) To *et al.*, 2004

TABLEAU 6 – Résumé des principales caractéristiques des régulateurs de réponse de type-B chez *Arabidopsis*

	Profils d'expression		Dimérisation	Localisation	Régulation transcriptionnelle				Fonction régulation face aux stress				
	RT-PCR, NB	Fusion GUS			CK	Froid	CH	NaCl	ET	CK	Froid	CH	NaCl
ARR1	Racines, tiges, feuilles, fleurs, siliques (f, j)	**PA :** Jeunes feuilles, région du méristème apical / feuilles matures : tissus vasculaires, hydathodes, trichomes des feuilles et fleurs (ARR2 et 12) **PR :** Méristème apical des racines, zone élongation des racines, racines matures (f, j, k)		noyau (c, d)	→ (o)	→ (l)				+ (n)	+ (l)		- (p)
ARR2	Racines, tiges, feuilles, fleurs, siliques (f, j)		ARR14 $^{in\ vitro}$ (a)	noyau (c, d, f, h, i)	→ (o)				+ (k, m)	+ (n)			
ARR10	Racines, tiges, feuilles, fleurs, siliques (b, f, j)			noyau (d, e)	→ (b, o)	→ (l)				+ (n)			
ARR11	Racines, tiges, feuilles, fleurs, siliques (f, j)			noyau (d)									
ARR12	Racines, tiges, feuilles, fleurs, siliques (f, j)			noyau (d, f)	→ (o)	→ (l)				+ (n)			- (p)
ARR14	Feuilles, fleurs, siliques (f, j)	**PA :** Jeunes feuilles (f)	ARR14 $^{in\ vitro}$, ARR2 $^{in\ vitro}$ (a)	noyau (d)	→ (o)								
ARR18	Fleurs, siliques (f, j)	**PA :** Anthère en développement (f)	ARR18 $^{en\ levure,\ in\ planta}$ (g)	noyau (g)			↑ (q)						
ARR13		**PA :** Jeunes feuilles, tissu vasculaire feuilles matures (f)											
ARR21	Fleurs, siliques (f, j)												
ARR19	Siliques (f, j)	**PA :** Jeunes feuilles, Trichomes (f)		noyau (f)									
ARR20	Fleurs, siliques (f, j)	**PA :** Pistil mature, tissus vasculaires, méristème apical, hydathodes (f)		noyau (f)									

Profils d'expression : NB : **N**orthern-**B**lot ; PA : **P**arties **A**ériennes ; PR : **P**arties **R**acinaires, / **Régulation transcriptionnelle** : CK : Cytokinine ; CH : Contrainte Hydrique ; ➞ aucune / **Fonction dans la régulation face aux différents stress** : ET : Ethylène ; **-** rôle négatif ; **+** rôle positif. Les sous-familles des protéines RR-B sont représentées par les différentes couleurs (sous-famille I en vert, sous-famille II en violet, et la sous-famille III en orange).

REFERENCES : (a) Dortay et al., 2006; (b) Imamura *et al.,* 1999; (c) Sakai *et al.,* 2000; (d) Dortay *et al.,* 2008; (e) Imamura *et al.,* 2001; (f) Mason *et al.,* 2004; (g) Veerabagu *et al.,* 2012; (h) Lohrmann *et al.,* 2001; (i) Hwang & Sheen, 2001; (j) Tajima *et al.,* 2004; (k) Hass *et al.,* 2004; (k) Yokoyama *et al.,* 2007; (l) Jeon & Kim, 2013; (m) Desikan *et al.,* 2006; (n) Gupta & Rashotte, 2012; (o) Rashotte *et al.,* 2003; (p) Mason *et al.,* 2010; (q) Veerabagu, 2011

TABLEAU 7 – Résumé des principales caractéristiques des régulateurs de réponse de type-C chez *Arabidopsis*

	Profils d'expression		Dimérisation	Localisation	Régulation transcriptionnelle
	RT-PCR	Fusion GUS			CK
ARR22	Fleurs, siliques (a, b, c)	Chalaze des graines en développement (a, c)	Pas de dimérisation (a)	Cytoplasme (a, b)	➞(b)
ARR24	Bourgeons, fleurs, siliques (c)	Grain de pollen (c)			

Régulation transcriptionnelle : CK : Cytokinine ; ➞ aucune

REFERENCES : (a) Horák *et al.,* 2008; (b) Kiba *et al.,* 2004; (c) Gattolin *et al.,* 2006

ii) des différences ou spécificités d'interaction protéine-protéine avec les AHP et/ou des régulateurs transcriptionnels.

Choi et ses collaborateurs (2010) ont montré que malgré le haut degré de similitude entre le couple de protéines ARR1 et ARR2, seule cette dernière est capable d'interagir spécifiquement avec un facteur de transcription (TGA3) propre à la voie de réponse à l'acide salicylique liée à celle des CK.

iii) des différences de stabilité des protéines RR-B.

En effet, il existe des systèmes de dégradation des RR-B afin d'atténuer le signal CK, notamment l'ARR2 dont la stabilité est réduite en présence de CK (Kim & Hwang, 2012). Plus largement, les RR-B et plus particulièrement ceux de la sous-famille I, seraient les cibles de protéines appartenant à la famille F-box, appelées **K**ISS **M**E **D**EADLY (KMD). Ces dernières formeraient un complexe ligase ubiquitine E3 avec deux autres protéines (S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN1 (SKP1) et Cullin) et le RR-B, le menant ainsi à la dégradation (Kim *et al.*, 2013).

Ethylène

L'ARR2 serait également impliqué dans la voie de signalisation éthylène. En effet, des mutants *arr2* sont incapables d'induire la fermeture des stomates normalement provoquée par l'éthylène et le peroxyde d'hydrogène (Desikan *et al.*, 2006). De plus, il est capable, en plus des motifs 5' A/GGATT/C 3', de se fixer sur des éléments PER (**P**RIMARY **E**THYLENE **R**ESPONSIVE) composés de deux boîtes GAT *in vitro* et d'activer la transcription du promoteur ERF1, régulateur de réponse éthylène, fusionné à la protéine luciférase dans des protoplastes d'*Arabidopsis* (Hass *et al.*, 2004). Il serait donc un régulateur positif de la réponse à l'éthylène.

Rôle dans les voies de signalisation des stress abiotiques

Excepté leur rôle dans la voie de signalisation CK, les RR de type-B et plus particulièrement l'ARR1 auraient un rôle positif dans la voie de signalisation stress froid contrairement aux ARR10 et 12, bien que globalement, ces trois RR-B ne soient pas régulés par ce stress. Les mutants *arr1* présenteraient un taux de transcrits des RR de type-A réduit et inversement pour les mutants sur-exprimant l'ARR1 (Jeon & Kim, 2013).

De plus, les mutants *arr1, arr2* seraient plus tolérants au stress salin en n'accumulant qu'une faible proportion de sodium dans les parties aériennes des plants. Cette tolérance serait due à une augmentation de l'expression d'AtHKT1;1, qui jouerait un rôle primordial dans l'homéostasie du sodium en évitant ainsi son accumulation. Ces deux RR-B constitueraient donc des régulateurs

négatifs du stress salin, en inhibant l'expression d'AtHKT1;1 (Mason *et al.*, 2010). Récemment, une régulation tardive (six et 24 heures) des transcrits de l'ARR18 a été montrée dans des feuilles d'*Arabidopsis* après un stress au PEG. Ce RR-B semble être le seul parmi les RR à être régulé par ce type de stress (Veerabagu, 2011).

-Les régulateurs de réponse de type C-

Chez *Arabidopsis*, le RR22 et le RR24 (TABLEAU 7) constituent à eux deux le groupe des RR de type-C (Pils & Heyl, 2009). Bien qu'ils soient composés d'un domaine receveur typique et complet, des analyses de séquences de ce domaine ont montré qu'ils partageaient plus de similitudes de séquence avec le domaine receveur des HK que celui des RR-A et –B (FIGURE 10) (Kiba *et al.*, 2004; To & Kieber, 2008). De plus, de par leur absence de régulation (TABLEAU 7), les RR-C se différencient du groupe des RR-A auquel ils ont été rattachés pendant longtemps (Kiba *et al.*, 2004).

Il a été montré que l'ARR22, localisé dans le cytoplasme (Kiba *et al.*, 2004; Horák *et al.*, 2008) est capable d'interagir avec des AHP (AHP2, 3 et 5) dans la levure (Dortay *et al.*, 2006; Horák *et al.*, 2008) et *in planta* (Horák *et al.*, 2008). Par contre, aucune interaction entre ce RR-C avec lui-même et les HK n'a été relevée (Horák *et al.*, 2008). Il ne se comporterait pas comme un RR classique, il possèderait une activité phosphatase, étant donné que le signal (groupement phosphate) reçu, provenant d'AHP5, n'est pas conservé (Kiba *et al.*, 2004). Les transcrits de ces deux RR-C seraient principalement présents dans les fleurs et les siliques (Kiba *et al.*, 2004; Gattolin *et al.*, 2006; Horák *et al.*, 2008), et les activités des gènes *ARR22* et *ARR24* se localiseraient à la jonction des cellules de la chalaze et du funicule des graines en développement, et dans les grains de pollen respectivement (TABLEAU 7) (Horák *et al.*, 2008; Gattolin *et al.*, 2006).

Des études de mutagénèse ont montré qu'une surexpression de l'ARR22 ou une complémentation de l'ARR22 dans des lignées déficientes de ce RR provoquaient soit des phénotypes nains avec un système racinaire peu développé et une dé-régulation des gènes de réponse CK (Kiba *et al.*, 2004) soit des phénotypes avec un développement anormal (Horák *et al.*, 2008). L'hypothèse avancée est que cet ARR perturbe et interfère avec les voies de réponse aux CK de par son activité phosphatase.
De plus, Gattolin et ses collaborateurs (2006) ont montré que l'ARR22 est transcriptionnellement régulé lors d'une blessure, suggérant son éventuelle implication dans d'autres voies de signalisation.

II.2.b.2 *Mécanismes de transduction du signal éthylène*

Un modèle simplifié de la transduction du signal éthylène est montré en FIGURE 11.

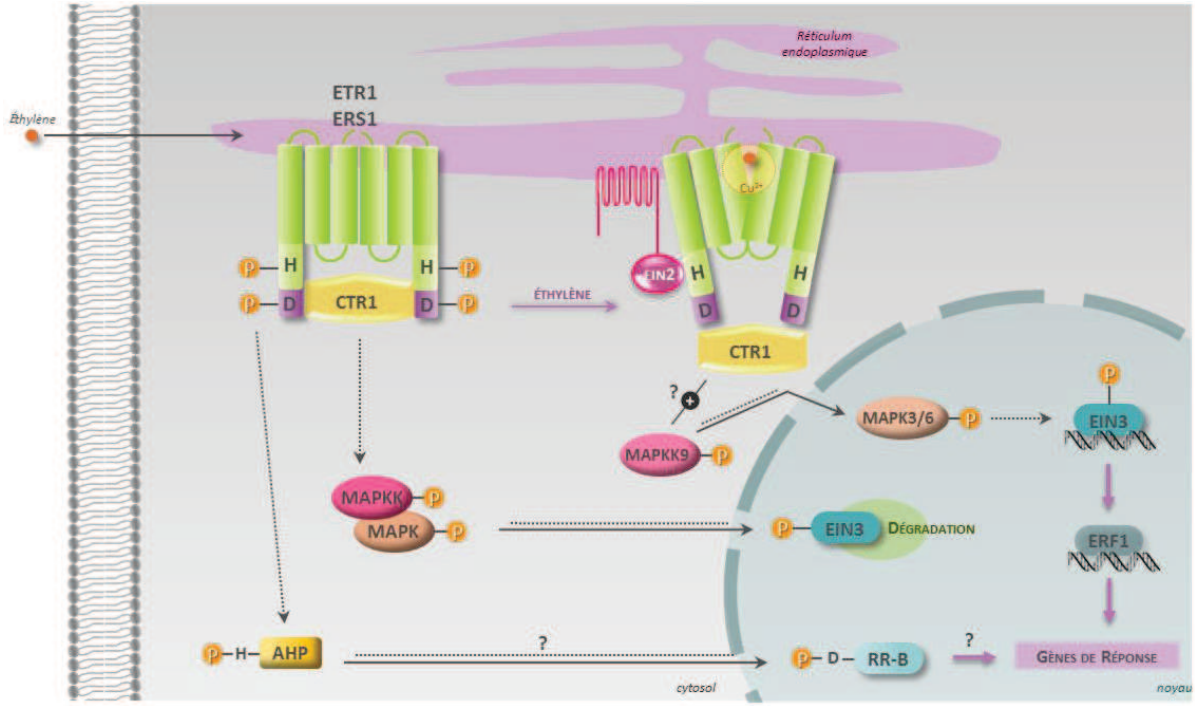


FIGURE 11 – Modèle de la voie de transduction Ethylène

Modifiée d'après Nongpiur *et al.* (2012)

Les détails de cette voie de signalisation sont donnés dans le texte.

Les résidus histidine et aspartate sont notés par H et D respectivement. Les transferts des groupements phosphate (orange) de protéines en protéines sont symbolisés par des flèches ou traits discontinus. Les flèches en trait plein indiquent des mouvements des protéines dans le noyau de la cellule.

En absence d'éthylène, le récepteur phosphorylé interagit avec CTR1 (**C**ONSTITUTIVE **T**RIPLE **R**ESPONSE 1), une MAPKKK, et active sa fonction sérine/thréonine kinase (Huang *et al.*, 2003). La formation du complexe récepteur/CTR1 réprime alors l'interaction du récepteur avec EIN2 (**E**THYLENE **IN**SENSITIVE 2) (Bisson & Groth, 2010). Cette protéine est située également dans la membrane du RE (Bisson *et al.*, 2009), et sa perte de fonction entraine une complète insensibilité à l'éthylène (Alonso *et al.*, 1999). Alors que l'activité kinase d'ETR1 semble jouer un rôle mineur dans la transduction du signal éthylène, la présence du domaine kinase est primordiale (Xie *et al.*, 2006) permettant ainsi une interaction physique avec CTR1 (au niveau de sa partie N-terminale). La co-localisation des récepteurs et de CTR1 au niveau des membranes du RE ou même de l'appareil de Golgi apporte un argument supplémentaire en faveur de cette interaction (Gao *et al.*, 2003). Il a été montré que des plantules d'*Arabidopsis* qui ne possédent pas ce gène ont un phénotype "triple

réponse", indiquant ainsi que CTR1 régule négativement cette voie (Kieber *et al.,* 1993). Ainsi une fois activée, elle inhibe la voie de transduction en aval par phosphorylation de deux résidus thréonines spécifiques, par l'intermédiaire de MAPKK et MAPK, du facteur de transcription EIN3 (**E**THYLENE **IN**SENSITIVE 3). Ce qui entraîne la dégradation de ce FT par le protéasome 26S. En parallèle, ETR1 semble également capable d'interagir avec des AHP lorsqu'il est phosphorylé, c'est-à-dire sans le signal éthylène (Scharein & Groth, 2011).

En présence d'éthylène, le récepteur n'est plus phosphorylé. L'interaction récepteur/CTR1 est dissociée par changement conformationnel, permettant une interaction du récepteur avec EIN2 (Bisson & Groth, 2010). L'activation d'une autre voie de MAPK, composée de MAPKK9 et MAPK3/6, est alors déclenchée. La MAPKK9 activée par une MAPKKK (possiblement CTR1) est capable d'entrer dans le noyau et d'activer les MAPK3/6, qui à leur tour vont phosphoryler d'autres résidus thréonine d'EIN3 permettant cette fois-ci sa protection (Yoo *et al.,* 2008). Une des cibles d'EIN3 est le facteur de transcription ERF1 (**E**THYLENE **R**ESPONSE **F**ACTOR 1) qui constitue un régulateur positif de cette voie de transduction.

II.2.b.3 *Mécanisme de transduction du signal cytokinine*

L'ancien modèle de la perception des CK au niveau de la membrane plasmique a été révisé à la suite de travaux portant sur la localisation des HK. Les CK extracellulaires sont perçues par les récepteurs AHK2, AHK3 et AHK4, localisés majoritairement au niveau du réticulum endoplasmique (RE), activant ainsi un phosphorelais multiple schématisé en FIGURE 12. Plusieurs transporteurs de CK au niveau de la membrane plasmique ont été identifiés, comme les transporteurs de purines PUP, et des transporteurs ENT (**E**QUILABRATIVE **N**UCLEOSIDE **T**RANSPORTER) (Wormit *et al.,* 2004; Bürkle *et al.,* 2003; Cedzich et al., 2008). Cependant, le mode de transport de cette hormone dans la lumière du RE n'a pas encore été identifié. Les protéines AHK2, AHK3 et AHK4 sont composées du domaine senseur CHASE (exposé dans la lumière du RE), du domaine Histidine kinase (H), et du domaine receveur (D), ces derniers étant localisés dans le cytoplasme. La fixation des CK aux récepteurs induit une *trans*-phosphorylation de l'histidine conservée d'un monomère par le domaine catalytique de l'autre monomère. Le groupement phosphate est transféré *via* le résidu aspartate (D) de leur domaine receveur vers le résidu histidine d'une HPt (AHP1, 2, 3, 4, 5, avec résidu H). En absence de CK, AHK4 peut déphosphoryler des AHP. Une fois phosphorylées, les AHP transmettent leur phosphate au résidu aspartate conservé des RR, soit cytoplasmiques tels que les RR-A ou le RR-C ARR22 soit nucléaires tels que les RR-A et -B après transport de l'AHP dans le noyau. De plus, AHP6 peut inhiber les transferts de phosphate aux AHP ou à partir des AHP dans le protoxylème. L'ARR22 agirait comme une phosphatase et enlèverait le résidu phosphate des AHP dans les graines en

développement.

La phosphorylation des RR-B induit la transcription de gènes de réponse aux CK qui inclut les RR-A et les CRF (CYTOKININ RESPONSE FACTOR). Ces derniers sont des facteurs de transcription identifiés à l'origine comme des AP2/ERF like (Rashotte *et al.*, 2003) qui sont activés par les CK et sont capables d'interagir avec les AHP (Cutcliffe *et al.*, 2011). Ils s'accumulent dans le noyau pour déclencher la transcription de gènes de réponse aux CK communs ou non avec les RR-B (Rashotte *et al.*, 2006).

Les RR-A, une fois phosphorylés agissent par rétrocontrôle négatif en inhibant l'activité des RR-B ou comme compétiteurs pour l'obtention du phosphate provenant des AHP.

La stabilité des protéines RR-A serait régulée en fonction de leur état de phosphorylation. En effet, les protéines phosphorylées seraient plus stables, alors que l'absence de phosphate acheminerait les protéines vers un processus de dégradation. Les RR-B seraient également pris en charge par un système de dégradation mais indépendamment de leur état de phosphorylation.

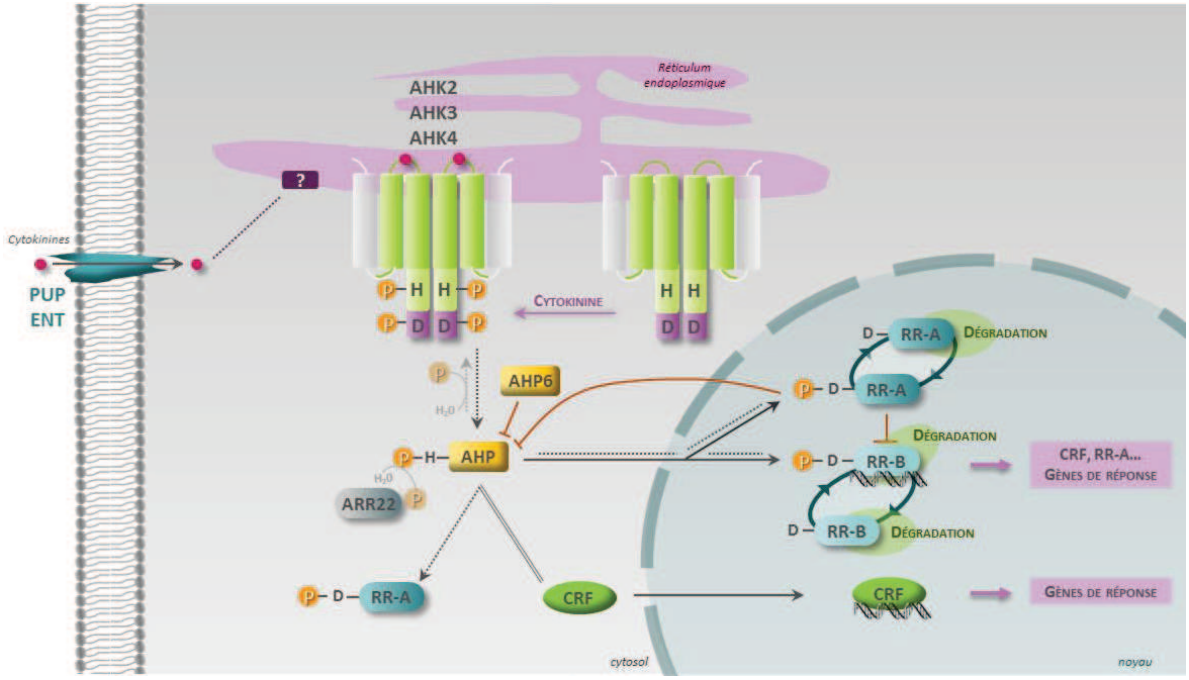


FIGURE 12 – Modèle de la voie de transduction Cytokinine

Modifiée d'après Nongpiur *et al.* (2012)

Les détails de cette voie de signalisation sont donnés dans le texte.

Les résidus histidine et aspartate sont notés par H et D respectivement. Les transferts des groupements phosphate (orange) de protéines en protéines sont symbolisés par des flèches ou traits discontinus. Les flèches en trait plein indiquent des mouvements des protéines dans le noyau de la cellule. Les rétrocontrôles de la voie sont représentés par le symbole inhibition (rouge). Le double trait indique une interaction protéine-protéine.

II.2.b.4 *Interconnexion entre les voies de signalisation*

L'interconnexion entre les voies de signalisation permet aux plantes de répondre rapidement aux signaux reçus lorsqu'elles doivent percevoir de nombreux *stimuli* en même temps ou lorsque des stress différents exigent des réponses physiologiques similaires. Par intégration des différentes voies de signalisation, les plantes sont ainsi capables de coordonner et d'affiner leurs réponses sans avoir besoin de séparer les voies de signalisation pour chaque type de stress ou de combiner les *stimuli* reçus. Il existe ainsi de nombreux couplages entre les voies, illustrés précédemment pour chaque partenaire du phosphorelais, qui rendent parfois leurs analyses complexes. Dans cette partie, seuls des exemples d'interconnexion entre stress abiotiques et éthylène ou CK seront présentés.

Relation éthylène/stress abiotiques

Plusieurs études ont rapporté que des modifications dans la voie de signalisation éthylène, affectaient la réponse des plantes aux stress abiotiques, NaCl et sécheresse (Cao *et al.*, 2007; 2008; Cela *et al.*, 2011).

L'application de contraintes de type abiotique ont montré des régulations différentes des transcrits correspondant aux différents récepteurs éthylène (TABLEAU 2) (Zhao & Schaller, 2004; Cela *et al.*, 2011), suggérant une implication de ces protéines dans ces voies de signalisation. Leur rôle régulateur a d'ailleurs été montré dans les réponses au stress salin (Cao *et al.*, 2008). A titre d'exemple, le récepteur ETR1 a été plus particulièrement étudié dans cette voie de transduction. Wang et ses collaborateurs (2008) ont montré que des mutants sur-exprimant ETR1 ou possédant un gain de fonction sont plus sensibles au NaCl et inversement qu'une perte de fonction augmentait la tolérance des plantes à ce type de stress. Cette implication fonctionnelle de ce récepteur est d'ailleurs corroborée par la régulation négative de ces transcrits d'ETR1 par le NaCl (Zhao & Schaller, 2004).

Les autres intervenants de la voie éthylène sont également impliqués dans la régulation de la réponse au NaCl. Compte tenu de l'ensemble des conclusions fournies par les études de mutants sur les récepteurs ou autres partenaires de la voie, il semblerait que l'éthylène soit un régulateur positif de la tolérance au NaCl (Cao *et al.*, 2008). En effet, contrairement aux régulateurs négatifs de la voie éthylène *i.e.* CTR1 et aux récepteurs, les régulateurs positifs tels que EIN2, EIN3 seraient requis pour la tolérance au NaCl (Cao *et al.*, 2008).

De plus, ERF1, qui rappelons-le est le régulateur transcriptionnel de la voie signalisation éthylène, apparaît comme un élément intégrateur essentiel à l'intersection de plusieurs voies de transduction. En effet, ce facteur de transcription agirait comme un régulateur positif face à des stress biotiques (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002; Lorenzo *et al.*, 2003) et abiotiques (Cheng *et al.*, 2013), tels que le stress

salin et la sécheresse. Des mutants sur-exprimant ERF1 ont montré une forte tolérance face à ces stress abiotiques, due entre autre à une expression accrue des gènes de réponse permettant une meilleure gestion des pertes en eau, limitées notamment par l'accumulation de proline (Cheng *et al.,* 2013). Cette réponse serait modulée par l'action antagoniste des différents membres impliqués dans les voies de signalisation éthylène/acide jasmonique (AJ), et de l'ABA. Lors d'un stress abiotique, l'éthylène et l'AJ seraient produits en réponse à ces stress, stimulant ainsi l'expression des transcrits d'*ERF1* (Cela *et al.,* 2011; Cheng *et al.,* 2013). Etant donné l'inhibition de l'expression de ce gène face à l'ABA, l'étude de Cheng et ses collaborateurs (2013) suggère que les voies éthylène/AJ peuvent contrecarrer l'effet négatif de l'ABA sur l'expression d'*ERF1*. Le rôle intégrateur d'ERF1 résiderait dans sa capacité à répondre de manière spécifique aux différents signaux en se fixant préférentiellement sur des boîtes de réponse conservées dans les promoteurs de gènes de réponses en fonction de la nature du stress (éléments DRE pour stress abiotiques ; boîtes "GCC" pour stress biotiques). Le recrutement du facteur de transcription au niveau de ces boîtes de réponse peut être géré par des interactions avec des protéines spécifiques d'un signal donné.

Relation CK/stress abiotiques

Il est clairement établi que les CK jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'adaptation des plantes face aux facteurs environnementaux, impliquant des interactions et des interconnexions avec la voie de signalisation de l'ABA (Ha *et al.,* 2012). Compte tenu des rôles physiologiques des CK généralement consommateur d'énergie, on comprend que lorsque les conditions environnementales sont défavorables, la plante ait tout intérêt à réguler négativement les voies de signalisation CK. Elle réduit ainsi sa croissance et utilise les dernières ressources d'énergie pour élaborer sa réponse face aux stress.

Il a été observé que lors d'un stress abiotique prolongé, le contenu en CK diminuait, ce qui permettait à la plante d'être plus tolérante au stress en question, qualifiant les CK de régulateurs négatifs des stress abiotiques (Werner *et al.,* 2010; Ha *et al.,* 2012; Nishiyama *et al.,* 2011). Des mutants déficients en CK ont montré que cette tolérance à la sécheresse serait liée à une meilleure protection des structures membranaires, et non aux effets physiologiques orchestrés par l'ABA (Nishiyama *et al.,* 2011). En plus des modulations des contenus en CK, les plantes inactiveraient également la voie de signalisation CK, notamment les récepteurs CK, certains RR-A (ARR5, 6, 7) et RR-B (ARR1, 12) considérés respectivement comme des régulateurs négatifs des stress abiotiques et de l'ABA (Tran *et al.,* 2007), du stress froid (Jeon *et al.,* 2010) et du stress salin (Mason *et al.,* 2010) respectivement.

Il est généralement avancé que les CK et l'ABA agissent comme antagonistes dans de nombreux processus de développement de la plante, incluant les réponses aux contraintes

environnementales. L'hypersensibilité à l'ABA retrouvée chez les mutants déficients en CK serait également favorable à l'adaptation des plantes face à ces stress (Werner *et al.*, 2010; Nishiyama *et al.*, 2011). L'induction de l'ABA suite à une exposition de la plante à un stress hydrique permet des réponses rapides et efficaces par activation de la voie de réponse "ABA dépendante" (élément de réponse ABRE), responsable en grande partie de l'expression des gènes de réponse (Ha *et al.*, 2011). De plus, l'ABA induit est impliqué dans la répression des gènes majeurs du métabolisme des CK, ce qui conduit à une régulation négative de celle-ci (Vaseva *et al.*, 2008).

Cependant, dans certains cas, les CK et l'ABA peuvent agir en synergie pour un même processus biologique. En effet, le développement de racines latérales nécessitant l'intervention de l'auxine est supprimée lors d'une sécheresse afin de privilégier le développement des racines primaires. L'ABA et les CK vont alors empêcher l'initiation du développement des racines latérales en favorisant l'expression d'*ABI4* capable de réprimer le transport polarisé de l'auxine (Shkolnik-Inbar and Bar-Zvi, 2010).

II.2.b.5 *Spécificité des voies de signalisation des phosphorelais multiples*

En général, les mutations entrainant une perte de fonction d'un seul gène d'une famille de molécule impliquée dans les voies de signalisation (HK, HPt, RR) conduisent seulement à un changement subtil du phénotype. Afin d'observer un phénotype plus marqué, il est nécessaire de muter la plupart des membres d'une même famille, ce qui montre déjà leur redondance fonctionnelle. De plus, l'analyse des interactions protéine-protéine par diverses techniques a révélé que les AHP interagissent avec les HK qui pourtant détectent des signaux différents et également avec différents RR, ce qui suggère encore que les voies de signalisation sont hautement redondantes. Compte tenu de ces propriétés des phosphorelais multiples et des nombreuses interconnexions de ces voies, la question qui se pose alors est : comment la plante parvient à décrypter l'origine et la nature d'un *stimulus* donné parmi tous les *stimuli* possibles pour y répondre spécifiquement et de la manière la plus appropriée ?

Plusieurs mécanismes moléculaires peuvent être mis en place afin de permettre une spécificité significative des voies de signalisation.

- Premièrement, ces voies reposent sur le transfert du groupement phosphate qui passe par des interactions entre les protéines. La reconnaissance moléculaire entre les molécules de signalisation des différentes familles est primordiale, afin d'exercer leur fonction (kinase, phosphatase, transfert de phosphate) sur le partenaire requis. L'analyse de la structure de certains partenaires en interaction notamment SpoOB/SpoOF chez les bactéries (Xu *et al.*, 2003; Varughese, 2005) et Sln1p/Ypd1p chez la levure (Zhao *et al.*, 2008), a permis de cibler les résidus essentiels à

une reconnaissance des partenaires au niveau des surfaces d'interaction. Récemment, une analyse statistique a identifié des paires d'acides aminés qui ont co-varié au cours de l'évolution afin de maintenir les contacts intra- ou inter-moléculaires des protéines dans les systèmes bactériens (Ashenberg & Laub, 2013). Dans certains cas, ces paires seraient localisées dans la même protéine, pour maintenir une intégrité structurale ou préserver une certaine conformation. Dans d'autres cas, ces acides aminés seraient localisés dans des protéines différentes, et auraient co-évolué afin de préserver l'interaction entre l'HK et son RR associé. Des substitutions au niveau de ces résidus spécifiques de l'HK bactérienne EnvZ, par des résidus conservés d'autres HK, sont suffisantes pour induire la capacité d'EnvZ à phosphoryler spécifiquement des RR différents de son RR associé (Skerker *et al.,* 2008). On comprend donc bien que de petites différences au niveau de la séquence en acides aminés ou de la structure entre membres d'une même famille puissent induire des différences d'affinité d'interaction participant à la spécificité d'interaction entre les partenaires (Koretke *et al.,* 2000). A titre d'exemple, chez les plantes, les deux HK, CKI1 (Pekárová *et al.,* 2011), et AHK5 (Mira-Rodado *et al.,* 2012) présentent des préférences d'interaction avec certaines AHP.
En plus de leur reconnaissance moléculaire, certains mécanismes cinétiques régissent la préférence cinétique d'une HK pour son substrat RR (Skerker *et al.,* 2005) et entrent en ligne de compte pour conserver un certain degré de spécificité des voies. En effet, certaines protéines HK bactériennes seront plus efficaces à phosphoryler leur RR partenaire plutôt qu'un autre appartenant à une autre voie de signalisation. C'est le cas d'EnvZ, qui est capable *in vitro* de phosphoryler 16 RR différents non affiliés à sa voie de transduction. Cependant, l'étape de phosphorylation de ces RR est réalisée en 60 minutes, alors que 10 secondes suffisent pour transférer le phosphate à son RR partenaire, OmpR (Skerker *et al.,* 2005). Pour le moment, aucun de ces mécanismes n'a été étudié chez les plantes.

- Deuxièmement, une activité phosphatase peut prévenir des interconnexions indésirables entre les voies, et déterminer ainsi à la fois la spécificité du signal et les réponses des voies de signalisation. Cette stratégie est utilisée par les bactéries qui possèdent des HK bifonctionnelles, capables de supprimer le phosphate de leur RR en absence de signal, et également de supprimer les effets d'une activation non spécifique (Laub & Goulian, 2007). Chez les plantes, l'activité phosphatase de deux HK, AHK4 et CKI1 a été rapportée (Mähönen et al., 2006a; Nakamura *et al.,* 1999). Une autre molécule signal d'*Arabidopsis,* l'ARR22, serait également capable d'exercer une activité phosphatase, (Kiba *et al.,* 2004). Ce type de protéine est qualifié de protéine auxiliaire chez les bactéries et la levure. Elles influencent les voies de signalisation en exerçant leur activité phosphatase ou en contrôlant les transports des molécules signal (Horák *et al.,* 2011). Cependant, les trois protéines AHK4, CKI1 et ARR22 exercent leur fonction phosphatase avec leur domaine receveur, ainsi il n'est pas encore clairement établi si elles exercent réellement une activité phosphatase ou si elles subissent une phosphorylation de courte durée (Horák *et al.,* 2008). Enfin,

nous pouvons également classer les RR-A comme des participants à la spécificité de voie puisqu'ils régulent négativement la voie CK par régulation des flux de phosphate ou par interaction spécifique avec les partenaires de cette voie (To *et al.*, 2007).

- Troisièmement, le temps de phosphorylation, constituant un niveau de contrôle supplémentaire de la spécificité, varie de quelques secondes à plusieurs heures et est influencé par de nombreux acides aminés positionnés à des endroits bien définis dans la structure du domaine receveur bactérien (Pazy *et al.*, 2010). Chez la levure, comme discuté précédemment, la phosphorylation de Ssk1p permettrait la formation d'un complexe stable avec Ypd1p, stabilisant la protéine pendant au moins deux jours (Janiak-Spens *et al.*, 1999; 2000). Chez les plantes, aucune information à ce sujet n'est mentionnée et seule la stabilisation protéique des RR-A est reconnue comme étant dépendante de la phosphorylation (To *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2009).

- Quatrièmement, les processus de régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle sont des éléments influençant également la spécificité de ces voies. La transduction du signal passant par des interactions protéine-protéine, on comprend que la quantité de protéine, possédant une faible affinité pour un partenaire donné, est décisive pour la formation de leur complexe. En effet, si cette protéine est très exprimée et devient abondante dans un tissu ou à un stade de développement donné, cette faible affinité avec le partenaire sera compensée et l'abondance du complexe sera augmentée.

- En dernier lieu, la régulation spatio-temporelle de l'expression de ces gènes est également un élément régulateur. Nous avons vu que la co-localisation d'expression des membres d'une même famille des phosphorelais multiple est récurrente, néanmoins dans certains cas des spécificités spatiales et temporelles d'expression sont observées, menant ainsi à des spécificités d'interaction et donc de réponse.

III. LE PEUPLIER : PLANTE LIGNEUSE MODÈLE

III.1 Caractéristiques botaniques et préférences écologiques

Les peupliers sont des plantes pérennes appartenant au groupe des Angiospermes Eucotylédones (pollen triaperturé) et à la famille des Salicacées. Cette famille est composée de deux genres : le genre *Salix* représenté par plus de 350 espèces de saules et d'osiers, et le genre *Populus* regroupant une trentaine d'espèces réparties en six sections botaniques définies par des critères écologiques et morphologiques (FIGURE 13) (Dickmann & Kuzovkina, 2008).

Malgré leur grande variabilité morphologique, les représentants du genre *Populus* sont des arbres dioïques à feuilles caduques, à pollinisation anémophile et producteurs de graines à fibres cotonneuses (Dickmann & Kuzovkina, 2008). Leur capacité à croître rapidement en fait des espèces pionnières (Dickmann & Kuzovkina, 2008). En plus, de leur reproduction naturelle *via* une fécondation classique, la quasi-totalité des peupliers peut également se propager par multiplication végétative par drageonnage ou par bouturage. L'aire de répartition naturelle des peupliers est vaste, se situant principalement dans l'hémisphère nord (FIGURE 14) (FAO, 2008). Les différentes espèces sont retrouvées dans des régions du globe présentant des climats variés, de l'Amérique du Nord à l'Asie en passant par l'Europe et, depuis des zones très froides (Alaska, Fédération de Russie…) jusqu'à des régions chaudes voire désertiques (Asie centrale, ou pourtour méditerranéen). Néanmoins, ces espèces restent globalement inféodées aux zones humides, notamment aux abords de rivières ou de fleuves. Les plaines alluviales constituent également des zones idéales pour la croissance des peupliers. Ils peuvent toutefois être retrouvés dans des régions hors vallée à condition que des précipitations élevées et des réserves suffisantes en eau du sol soient caractéristiques de ces zones. Les peupliers vivant dans les zones désertiques peuvent s'y développer grâce à un système racinaire profond pouvant atteindre les nappes phréatiques présentent dans le sous-sol (*Populus euphratica* Oliv.). En France, seules trois espèces de peupliers occupent naturellement le territoire, le peuplier noir (*Populus nigra L.*), le peuplier blanc (*Populus alba* L.), et le peuplier tremble (*Populus tremula* L.).

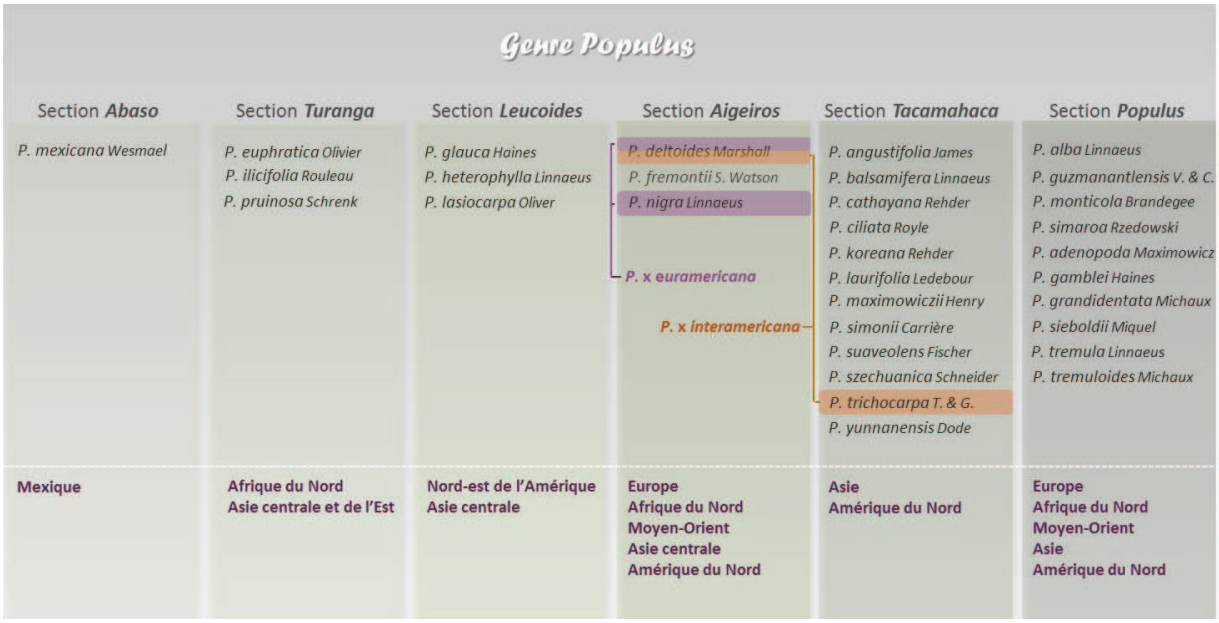


FIGURE 13 – Classification des espèces du genre *Populus* regroupées en six sections botaniques

D'après Dickmann & Kuzovkina (2008)

III.2 Une plante ligneuse d'intérêt agronomique

En France, le peuplier constitue un élément essentiel du paysage et est présent au sein de deux compartiments distincts, le "compartiment sauvage" et le "compartiment cultivé". La populiculture, qui couvre 85% de la surface totale occupée par les peuplements de peupliers en France (FIGURE 14) (FAO, 2008), se concentre principalement sur trois zones géographiques du territoire : la Picardie et le Bassin Parisien, la région Poitou-Charentes et le bassin Aquitain, et la région Centre et la basse vallée de la Loire (source Cadastre, 2003). La productivité du peuplier (liée à leur rapidité de croissance) est un atout pour la production industrielle de bois, expliquant l'engouement de la plantation de peupliers en France et dans le monde entier (FIGURE 14). En France, le bois de peuplier est destiné à plusieurs filières, notamment le déroulage (emballages légers, panneaux contre-plaqués…), le sciage (palettes, caisses, menuiserie…), la production de pâte à papier, le bois-énergie et la construction (bardages extérieurs et aménagements intérieurs) (www.peupliersdefrance.org).

Au vu de leur intérêt économique, les peupliers sont ainsi sélectionnés, multipliés (bouturage), plantés et cultivés comme certaines plantes de grandes cultures. Une des particularités naturelles du peuplier est l'hybridation interspécifique entre espèces sympatriques appartenant à des sections botaniques identiques ou différentes (Eckenwalder, 1996). Toutefois, certaines hybridations sont impossibles ou unidirectionnelles, telles que l'hybridation *P. deltoïdes* (♀) × *P. nigra* (♂) possible uniquement dans ce sens de croisement (Dillen *et al.*, 2011). L'Homme a su exploiter cette caractéristique pour développer la populiculture en réalisant des hybridations artificielles. Elles visent à créer et sélectionner des génotypes essentiellement sur des critères centrés sur la productivité et la résistance aux pathogènes (Berthelot *et al.*, 2005; Stanton, 2009). En Europe, depuis le début du 20ème siècle, la majorité des génotypes commercialisés sont issus de croisements soit entre une espèce nord-américaine et une espèce européenne (*P. deltoides* × *P. nigra* syn. P. ×*euramericana*, *i.e.* hybrides euraméricains), soit entre deux espèces nord-américaines (*P. deltoides* × *P. trichocarpa* syn. *P.* × *interamericana*, *i.e.* hybrides interaméricains) (FIGURE 13). Actuellement, une dizaine de génotypes sont principalement utilisés en France (Paillassa, 2013), la plupart étant des hybrides euraméricains moins sensibles aux rouilles foliaires (Thivolle-Cazat, 2003).

III.3 Une plante ligneuse d'intérêt scientifique

Le peuplier offre la possibilité d'étudier des processus biologiques originaux, absents ou difficilement étudiables chez le modèle des plantes herbacées, *Arabidopsis* tels que la formation du bois, la sénescence automnale et d'autres caractéristiques comme la détermination du sexe (Jansson & Douglas, 2007).

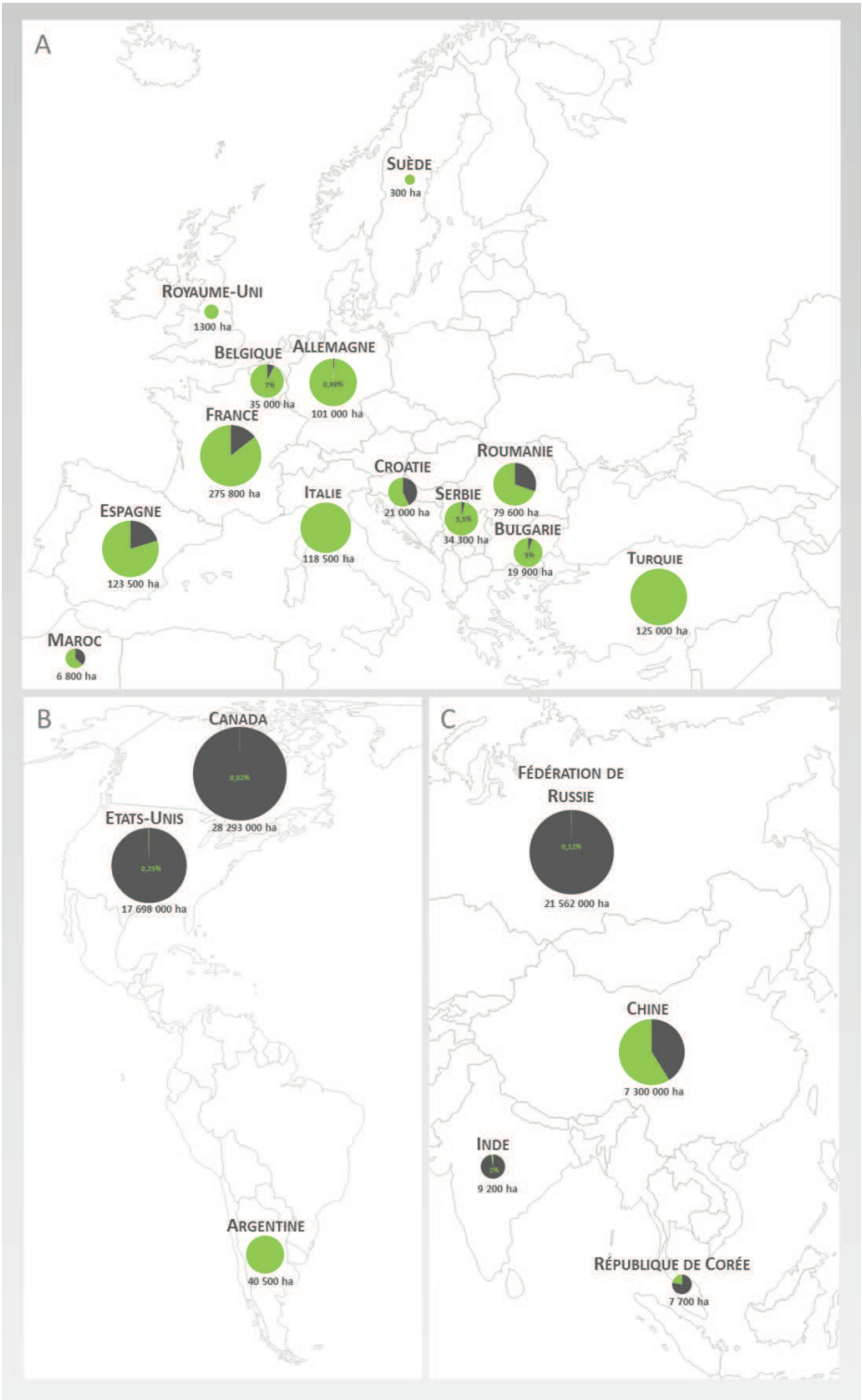


FIGURE 14 – Répartition mondiale des peuplements naturels et artificiels de peupliers

D'après les données de la FAO (2008)

Les cartes A, B, C représentent respectivement l'Europe, l'Amérique et l'Asie. La taille des cercles est proportionnelle à la superficie totale occupée par les populations naturelles et artificielles des peupliers, et sa valeur en hectare est indiquée pour chaque pays. Les surfaces de couleur grise des cercles présentent les peuplements naturels, alors que les peuplements de peupliers plantés sont visualisés par la couleur verte des cercles. Pour une meilleure visualisation, les pourcentages représentant les peuplements soit naturels soit artificiels sont indiqués lorsqu'ils sont faibles.

D'autres caractéristiques inhérentes au genre *Populus* ont également contribué à faire du peuplier l'arbre modèle pour l'étude des ligneux :

- Sa croissance rapide et de façon générale la facilité de propagation par multiplication végétative en font un bon sujet d'étude pour la compréhension du développement et du fonctionnement des arbres. De plus, les études génétiques et de croisements sont également facilitées par sa maturité sexuelle relativement précoce pour une espèce ligneuse (5 à 10 ans).
- Les peupliers (notamment les espèces de la section *Populus*) sont facilement transformables par *Agrobacterium*, offrant de nombreuses possibilités notamment d'études de mutants révélant les conséquences phénotypiques d'une telle inactivation de gène (Busov *et al.*, 2005). La régénération *in vitro* (Busov *et al.*, 2005) et les capacités de croissance de boutures de peuplier en hydroponie sont également des avantages non négligeables (Morabito *et al.*, 2006).
- Enfin, le séquençage du génome et le développement d'outils génomique, génétique et biochimique représentent un réel atout dans la conduite d'études réalisées sur le peuplier (Jansson & Douglas, 2007). Le séquençage complet du génome a été réalisé à partir du clone « Nisqually-1 » de *Populus trichocarpa* en 2006 (Tuskan *et al.*, 2006), dont l'obtention a été facilitée par la taille de génome relativement faible (423 million de paires de base) pour une espèce ligneuse. Le peuplier est donc le premier arbre séquencé et la troisième espèce végétale après *Arabidopsis* et *Oryza sativa*. Finalement, le séquençage du génome fournit des perspectives considérables afin de comprendre les mécanismes moléculaires mis en place et d'identifier les réseaux de gènes impliqués dans le fonctionnement et le développement de cet arbre.

IV. PROBLÉMATIQUES ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE

La structure intergouvernementale d'étude de l'évolution du climat (IPCC, **I**ntergovernmental **P**anel on **C**limate **C**hange) observe depuis quelques années des changements climatiques majeurs, marqués notamment par l'augmentation des températures moyennes mondiales de l'air et des océans (IPCC, 2013 ; http://www.ipcc.ch). A l'avenir, de nombreuses modifications du climat sont attendues à l'échelle mondiale et régionale, et celles-ci risquent notamment de banaliser les périodes de canicule qui seront plus régulières et de plus fortes intensités. En France, plusieurs simulations prévoient de 10 à 50 jours de canicule par an d'ici la fin du siècle contre 5 jours actuellement (http://climat.meteofrance.com/). Ces modifications climatiques ont probablement d'ores et déjà bouleversé le cycle hydrologique mondial, notamment avec des changements du niveau des précipitations et avec l'augmentation d'événements extrêmes tels que la sécheresse (Sun *et al.*, 2007).

Aux étés 2003 et 2005, la France a connu un épisode de sécheresse et un épisode de canicule, au cours desquels les peupleraies se situant sur des terrains bien alimentés en eau ont montré un retard de croissance ainsi qu'un affaiblissement général des arbres (Belrose *et al.,* 2004). Dans ce contexte, les peupleraies étant naturellement associées aux terrains où la ressource en eau n'est pas un facteur limitant, on peut s'interroger sur l'impact de l'augmentation d'évènements climatiques extrêmes de ce type sur la productivité des plantations futures.

La thématique de recherche de l'équipe "Arbres et Réponses aux Contraintes Hydrique et Environnementales" du Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures de l'Université d'Orléans (LBLGC, UPRES-EA 1207 – INRA USC1328) concerne essentiellement la réponse des arbres aux variations de disponibilité en eau. Les études sont développées sur un modèle d'étude unique, le peuplier, au travers d'approches complémentaires allant de l'écophysiologie et à la physiologie moléculaire. Les travaux de l'axe écophysiologie portent sur les principaux génotypes hybrides commercialisés en Europe (hybrides inter-spécifiques *P.* × *euramericana* et *P.* ×*interamericana*) ainsi que sur les populations naturelles d'espèces comme le peuplier noir (*P. nigra L.*). Ils visent notamment à comprendre les bases fonctionnelles à l'origine des variations génétiques et phénotypiques de caractères d'intérêt tels que la croissance, l'efficience d'utilisation de l'eau et la tolérance à la sécheresse (Monclus *et al.,* 2006; Marron *et al.,* 2006; Fichot *et al.,* 2010; Chamaillard *et al.,* 2011; Toillon *et al.,* 2013). Les travaux menés en physiologie moléculaire, sont quant à eux structurés autour de trois axes de recherche. L'axe épigénétique porte sur le rôle de la méthylation de l'ADN dans le contrôle de la plasticité développementale en réponse à des variations de disponibilité en eau (Lafon-Placette *et al.,* 2013). L'axe protéomique vise à rechercher des marqueurs protéiques liés à l'efficience d'utilisation de l'eau et à la tolérance à différentes contraintes abiotiques (Bonhomme *et al.,* 2009a; b). Enfin, l'axe signalisation vise à caractériser la voie de signalisation de la contrainte hydrique chez le peuplier (Caruso *et al.,* 2002; Chefdor *et al.,* 2006).

Chez le peuplier, une étude *in silico* a montré l'existence, de 12 récepteurs histidine kinase dont 8 sont des récepteurs non éthylène, et 12 HPt (Singh & Kumar, 2012). Nieminen et collaborateurs (2008) ont isolé cinq gènes (*PtCRE1a, PtCRE1b, PtHK2, PtHK3a, et PtHK3b*) partageant de fortes similarités avec la famille de récepteurs cytokinines chez *Arabidopsis* : PtHK2 avec AHK2, PtHK3a et PtHK3b avec AHK3, et PtCRE1a et PtCRE1b avec AHK4. Cependant, le nombre de RR n'est pas encore clairement défini. Ramírez-Carvajal et collaborateurs (2008) ont montré la probable existence de 33 RR (11 RR-A, 11 RR-B et 11 pseudo-RR) alors que Singh & Kumar (2012) ont comptabilisé 25 RR (9 RR-A, 11 RR-B et 5 pseudo-RR). Des études d'expression ont montré que les transcrits des RR-A et RR-B étaient localisés dans les tissus des tiges principalement au niveau des bourgeons et dans le phloème. De plus, plusieurs membres appartenant aux RR-A et RR-B voient une

augmentation du taux de leurs transcrits lors d'un traitement aux cytokinines (Ramírez-Carvajal *et al.*, 2008). Le rôle du PtRR13 dans la voie de transduction des cytokinines chez le peuplier a été montré. En effet, ce RR-B serait un régulateur négatif du développement des racines adventives chez le peuplier *via* le signal cytokinine par activation ou répression de la transcription de différentes cibles. Les transcriptions de *COV1* (**CO**NTINUOUS **V**ASCULAR RING **1**), régulateur négatif de la vascularisation, et de *PDR9* (**P**LEIOTROPIC **D**RUG **R**ESISTANCE TRANSPORTER **9**), transporteur permettant un efflux d'auxine sont activées sous l'action du PtRR13. Au contraire, l'expression de deux facteurs de transcription AP2/ERF (**A**PETALA2/**E**THYLENE RESPONSE FACTORY) de type TINY inductibles face au stress et à l'éthylène, phytohormone qui coordonne les premières réponses face à une blessure d'un tissu, est réprimé par le PtRR13 (Ramírez-Carvajal *et al.*, 2009).

Au sein du laboratoire, HK1, présentant une séquence protéique très proche de celle d'AHK1 d'*Arabidopsis* (pourcentage d'identité : domaine donneur 83% ; domaine receveur 73% ; domaine extra-cellulaire 72%) a été isolée à partir du génotype Dorskamp (*Populus deltoïdes* (Bartr.) Marsh x *P nigra* L.) (Chefdor *et al.*, 2006). Sur la base des similitudes de séquences, l'hypothèse d'une similitude fonctionnelle entre HK1 et AHK1 a été avancée, HK1 étant ainsi susceptible d'être impliquée dans la perception d'un déficit hydrique chez le peuplier. De plus, l'étude de l'expression du gène *HK1* a montré une expression constitutive dans les feuilles et les racines en condition osmotique normale, permettant à ce récepteur putatif d'être effectif au moment du stress. Cependant, sous contrainte hyper-osmotique, une augmentation du taux de transcrits de *HK1* dans les racines (24%) dès cinq minutes de stress a également été observée, traduisant un besoin potentiel des cellules à disposer d'un nombre plus important de récepteur. Par ailleurs, la recherche de protéines HPt, second protagoniste de la voie du phosphorelais, a révélé l'existence de quatre HPt qui ont également été isolées (HPt1, HPt2, HPt3a et HPt3b) en se basant sur les séquences d'AHP2 et AHP3 d'*Arabidopsis*. Les HPt3a et HPt3b présentent 99% d'identité laissant supposer que ces deux protéines seraient les produits de deux formes alléliques d'un même gène. Les interactions entre HK1 et HPt1/2 ont été testées dans la levure par le système double-hydride, montrant une interaction entre le récepteur et HPt2 mais pas avec HPt1. Le domaine receveur de HK1 serait suffisant pour permettre l'interaction avec les HPt (Chefdor *et al.*, 2006). Ainsi, l'identification de protéines similaires à AHK1 et aux AHP chez le peuplier, HK1 et HPt2, et de leur interaction ainsi que la régulation transcriptionnelle de *HK1* face à une contrainte osmotique sont en faveur de l'implication d'un phosphorelais multiple dans la perception et la transduction du signal stress osmotique chez le peuplier.

L'objectif général de cette thèse visait à caractériser l'implication d'un phosphorelais multiple de type histidine-aspartate dans la transduction du signal de la contrainte osmotique chez le peuplier. Afin d'apporter des éléments de réponse à cet objectif, ce travail de thèse reposait sur deux objectifs spécifiques majeurs :

- Identifier le partenariat interactionnel parmi les membres HPt (Histidine containing Phosphotransfer protein) et RR (Régulateurs de Réponse), agissant en aval de HK1, potentiellement impliqué dans la transduction de la contrainte osmotique.

- Dégager un mode de fonctionnement des RR de type-B et caractériser leur implication dans la voie de transduction du signal de cette contrainte.

Ce manuscrit de thèse s'organise sous la forme de deux parties. La première partie est composée de trois chapitres correspondant tous à un article publié. La deuxième partie est composée de deux chapitres correspondant à deux articles en préparation.

Matériels et Méthodes

I. MATÉRIELS

I.1 Matériels biologiques

I.1.a *Matériel végétal*

I.1.a.1 *Peuplier*

Le génotype Dorskamp, *Populus deltoïdes* (Bartr.) Marsh x *P. nigra* L., a été retenu pour cette étude. Obtenu en 1952 à l'institut de Dorskamp de Wageningen aux Pays-Bas, il est issu d'un croisement euraméricain entre un peuplier femelle deltoïde des Etats-Unis (Mississipi) et un peuplier mâle noir d'Italie (vallée du Pô). Ce génotype est utilisé actuellement en France dans la populiculture de par sa facilité à être bouturé.

Dans le cadre de notre étude, sa capacité à croître facilement en hydroponie (Caruso *et al.*, 2002) et sa tolérance à la sécheresse (Brignolas *et al.*, 2000; Marron *et al.*, 2002) sont des atouts pour faciliter nos expériences. Elles ont été réalisées à partir de boutures qui proviennent de tiges lignifiées d'environ 15 cm prélevées sur des plants mères cultivés en pleine terre. Elles sont ensuite placées durant une quinzaine de jours dans du sable afin d'obtenir un système racinaire complet. Pendant cette période, les bourgeons surnuméraires sont éliminés pour ne conserver qu'un seul rameau par bouture.

I.1.a.2 *Pervenche de Madagascar*

Catharanthus roseus (L.) G. Don ou Pervenche de Madagascar appartient à la famille des Apocynacées. Cette espèce présente un fort intérêt pharmacologique en produisant plus de 130 alcaloïdes suscitant ainsi un engouement de la recherche scientifique pour comprendre son métabolisme.

Dans cette étude, des suspensions cellulaires non chlorophylliennes C20D et C20A de *C. roseus* sont utilisées. Elles dérivent de la souche C20, entretenue dans un milieu de Gamborg (1968), supplémenté en saccharose (58 mM), en acide 2,4-dichlorophénoxy-acétique (2,4-D, 4,5 µM) et en kinétine (0,28 µM). La souche C20A présente une croissance normale dans un milieu dépourvu de kinétine et de 2,4D. La souche C20D, elle, présente une croissance normale seulement en absence de kinétine dans le milieu de culture (Mérillon *et al.*, 1989), et lors d'un apport de cytokinines, elle répond et active les voies de réponses à cette phytohormone.

I.1.b *Souches bactériennes*

Les différentes souches d'*Escherichia coli* utilisées dans ce travail ainsi que leurs génotypes sont listées dans le TABLEAU 8 suivant :

TABLEAU 8 – Souches utilisées d'*E. coli*

Souches	Fournisseurs	Génotypes
DH5α	New England Biolabs	*fhu*A2 Δ(*argF-lacZ*)U169 *pho*A *gln*V44 Φ80Δ (*lacZ*)M15 *gyr*A96 *rec*A1 *rel*A1 *end*A1 *thi*-1 *hsdR*17
BL21		F^- *ompT*, *hsdS*$_B$, (r_B^-, m_B^-), *dcm*, *gal*, λ(DE3)

I.1.c *Souches de levures*

La souche de *Saccharomyces cerevisiae* L40Δ a été utilisée dans les expériences de double-hydride. Son génotype est le suivant : MATa ade2-101 his3-200 leu2-3,112 trp1-901 ura3-52 LYS2::(lexA op)x4-HIS3 URA3::(lexA op)x8-lacZ gal4Δ.

I.2 Milieux de culture

I.2.a *Milieu de culture hydroponique*

Le milieu de culture pour les boutures en hydroponie est une solution nutritive dont la composition de base est celle du milieu de Murashige & Skoog (1962) modifiée et adaptée aux besoins des peupliers du génotype Dorskamp (Morabito *et al.*, 2006) (TABLEAU 9).

TABLEAU 9 – Composition de la solution nutritive utilisée pour la culture en hydroponie des boutures

Macroéléments		Microéléments			
	mM		µM	Solution de fer	µM
NH_4NO_3	5,15	$MnSO_4$, H_2O	3,64	$FeSO_4$, $7H_2O$	2,5
KNO_3	9,4	$ZnSO_4$, $7H_2O$	3,06	EDTA, Na_2	2,5
$CaCl_2$, $2H_2O$	1,5	H_3BO_3	9,12		
$MgSO_4$, $7H_2O$	0,75	$CuSO_4$, $5H_2O$	0,78		
KH_2PO_4	0,62	$Mo_7O_{24}(NH_4)_6$, $4H_2O$	0,25		

I.2.b *Milieu de culture des bactéries*

Les compositions des différents milieux de culture bactériennes utilisés sont résumées dans le TABLEAU 10. Les milieux LB sélectifs ont été supplémentés par des antibiotiques en fonction du vecteur plasmidique utilisé (Ampicilline : 50 µg/mL, Kanamycine : 50 µg/mL).

TABLEAU 10 – Composition des milieux de culture bactérienne

Milieu LB	Milieu SOC	Milieu 2YT
5 g/L Extrait de levure	5 g/L Extrait de levure	10 g/L Extrait de levure
10 g/L Tryptone	20 g/L Tryptone	16 g/L Tryptone
10 g/L NaCl	10 mM NaCl	5 g/L NaCl
1,5% Agar (milieux solides)	2,5 mM KCl	pH 7,5
	10 mM $MgCl_2$	
	10 mM $MgSO_4$	

I.2.c *Milieu de culture des levures*

Les compositions des différents milieux utilisés pour les cultures de levures sont résumées dans le TABLEAU 11.

TABLEAU 11 – Composition des milieux de culture levure

Milieu de croissance YPD	Milieu sélectif de croissance –LW	Milieu sélectif de croissance –LWH
10 g/L Extrait de levure	6,7 g/L Yeast nitrogen base (sans aa)	6,7 g/L Yeast nitrogen base (sans aa)
20 g/L Peptone	0,52 g/L Do –LW	0,48 g/L Do –LWH
20 g/L Glucose	20 g/L Glucose	20 g/L Glucose
2% Agar (milieux solides)	2% Agar (milieux solides)	2% Agar (milieux solides)

aa : acides aminés

II. MÉTHODES

II.1 Conditions de culture et des traitements appliqués

II.1.a *Culture des boutures de peuplier*

II.1.a.1 *Culture en hydroponie*

La culture en hydroponie est un réel atout pour les études transcriptomiques. Effectivement, nous pouvons contrôler efficacement les conditions d'application de la contrainte hydrique

notamment son application et sa durée. De plus, ce dispositif nous permet de conserver un système racinaire propre et donc contraint à moins de blessure contrairement à une culture en terre.
En chambre de culture, les boutures pourvues de racines et ne présentant qu'une seule tige feuillée, ont été placées dans des bacs de 30 litres contenant de la solution nutritive (TABLEAU 9). La croissance s'effectue pendant un mois (FIGURE 15) à une température de 21°C, une humidité relative de 70%, sous un éclairage aux néons (134 µmol/sec/m) assuré 16 heures par jour. Le niveau de la solution nutritive est toujours maintenu à 30 litres pour permettre une croissance optimale des boutures.

FIGURE 15 – Photographies des boutures de peuplier durant la croissance en hydroponie

A-Les boutures de peuplier au moment de la mise en culture en hydroponie,
B-Les racines des boutures de peuplier au moment de la mise en culture en hydroponie,
C-Les boutures de peuplier après un mois de culture en hydroponie,
D-Les racines des boutures de peuplier après un mois de culture en hydroponie.

II.1.a.2 *Application d'une contrainte osmotique au PEG_{6000} et suivi des paramètres physiologiques*

Le PEG (**P**oly**E**thylene **G**lycol) est un agent non ionique, hydrosoluble, et non perméant pour les cellules de par son haut poids moléculaire, l'empêchant de franchir à la fois la paroi et la membrane plasmique. Son utilisation mime donc la sécheresse du sol en causant une déshydratation des cellules suivie d'une réduction du volume du protoplaste mais également de la paroi cellulaire,

plutôt qu'une plasmolyse (Verslues *et al.,* 2006). De plus, contrairement aux autres agents osmotiques, il n'altère pas le métabolisme des cellules (Wormit *et al.,* 2012). Au cours de ce travail, deux concentrations de PEG ont été utilisées. Une première concentration de PEG à 50 g/L a été utilisée durant une cinétique courte (5, 10, 20 minutes), basée sur des études précédentes montrant qu'à cette concentration le PEG provoque bien un stress osmotique dans les cinq minutes suivant l'application de la contrainte (Caruso *et al.,* 2002; Chefdor *et al.,* 2006). Une deuxième concentration de PEG à 100 g/L a été utilisée durant une cinétique longues (5, 10, 20, 40, 60, 120, 180, 360 minutes).

Pour cette nouvelle expérience biologique, afin de s'assurer que les boutures subissent bien la contrainte osmotique, les conductances stomatiques des feuilles ont été mesurées à l'aide d'un poromètre (Leaf Porometer Steady State Diffusion Porometer, Modèle SC-1, Decagon Devices, Pullman, Washington, Etats-Unis). Les mesures de conductance stomatique ont été réalisées sur trois plants indépendants au niveau de leurs faces supérieures et inférieures. Au temps zéro, une première mesure a été prise à partir d'une bouture dans un bac de culture contenant de la solution nutritive témoin. Par la suite, ces mêmes boutures transvasées dans un autre bac de culture contenant la solution nutritive additionnée de PEG, ont servi à réaliser les autres mesures effectuées à différents points de cinétique. L'effet potentiel du transvasement d'une bouture d'un bac à un autre a été suivi et s'est révélé sans incidence sur la conductance stomatique (données non présentées). Les mesures ont été réalisées à partir de deux expériences biologiques. Ainsi, les moyennes des conductances stomatiques (± erreurs standards) de six plants en conditions témoin et stressée ont été calculées. Une analyse statistique a ensuite été réalisée (MATÉRIELS ET MÉTHODES, II.15), afin de mettre en évidence d'éventuelles différences entre les moyennes des conductances stomatiques de chaque temps de la cinétique et celles au temps 0.

II.1.a.3 *Prélèvement des échantillons*

Les prélèvements des différents organes (racines, tiges, pétioles, feuilles) de deux boutures, de même âge physiologique mais indépendantes de celles utilisées pour les mesures des conductances stomatiques, ont été réalisés. Ces boutures correspondent soit à des boutures témoins soit à des boutures transvasées et traitées durant les différents temps. Tous les échantillons ont été congelés dès la récolte dans l'azote liquide et les racines ont été au préalable rincées à l'eau distillée. Les échantillons sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

II.1.b *Culture des suspensions cellulaires de C. roseus*

La culture des lignées C20D et C20A s'effectue à l'obscurité sous agitation permanente (100 rpm) à 25°C. Les cellules sont repiquées toutes les semaines : 50 mL ou 100 mL d'inoculum C20D ou C20A respectivement, sont dilués dans 450 mL ou 400 mL de milieu de culture, et sont ainsi répartis dans différentes fioles à raison de 50 mL par fiole.

II.1.c *Culture des bactéries et des levures*

II.1.c.1 *E. coli*

Les souches d'*E. coli* poussent à 37°C sous agitation (250 rpm) pendant une nuit. Les cultures bactériennes croissent dans du milieu LB liquide (TABLEAU 3) contenant les antibiotiques appropriés.

II.1.c.2 *S. cerevisiae*

Les souches de *S. cerevisiae* poussent à 30°C pendant 3 à 4 jours. Les composants sélectifs des milieux de croissances (TABLEAU 4) sont ajoutés en fonction du type de plasmide introduit dans la souche.

II.2 Méthodes de transformation du matériel biologique

II.2.a *Préparation et transformation des bactéries*

II.2.a.1 *Préparation des bactéries compétentes*

Les bactéries (*E. coli*) de la souche BL21 sont rendues compétentes par utilisation de $CaCl_2$ (Chlorure de calcium) rendant la paroi bactérienne perméable (Sambrook *et al.,* 1989). Une pré-culture est réalisée en inoculant quelques colonies de la souche dans 2 mL de milieu liquide LB, et incubée une nuit à 37°C sous agitation (250 rpm). Le lendemain, 500 µL de culture dilués dans 50 mL de milieu LB sont incubés à 37°C jusqu'à obtention d'une absorbance à 600 nm comprise entre 0,3 et 0,5. Après centrifugation (10 min, 4°C, 5000 rpm), les cellules sont reprises dans une solution de $CaCl_2$ à 50 mM. Après une incubation de 20 minutes à 4°C, la culture bactérienne est centrifugée et le culot de bactérie est repris dans une solution de $CaCl_2$ 50 mM / glycérol 20%. Des aliquotes de 50 µL sont ensuite réalisées et sont stockées à -80°C avant utilisation.

II.2.a.2 *Transformation par choc thermique*

Les transformations sont réalisées avec 50 µL de bactéries compétentes pour la souche DH5α (New England Biolabs) ou 100 µL de bactéries compétentes pour la souche BL21, mélangés avec 5 µL de ligation ou 1 µg de plasmides respectivement. Ce mix de transformation est chauffé à 42°C pendant 40 secondes, puis placé dans la glace pendant 2 minutes avant d'ajouter 950 ou 900 µl de milieu SOC. Les bactéries transformées sont ensuite incubées à 37°C pendant une heure sous agitation (250 rpm). Le volume approprié de transformation est étalé sur boîte de sélection LB avec un antibiotique approprié. Quand un criblage blanc/bleu est possible (cas du vecteur pGEM-T easy), le milieu est fraichement supplémenté par de l'IPTG (Isopropyl-1-thio-ß-D-galactopyranoside) 0,5 mM et du X-gal 0,2 mM. Les bactéries sont ensuite incubées durant une nuit à 37°C.

II.2.b *Préparation et transformation des levures*

Les transformations de levure sont réalisées d'après (Gietz *et al.*, 1995). Une pré-culture de la souche de levure L40Δ est réalisée dans du milieu YPD (**Y**east **P**eptone **D**extrose), et mise à agiter durant une nuit à 30°C. Une culture de 50 mL est préparée à partir de la pré-culture dont l'absorbance à 600 nm est de 0,25, mise à agiter pendant 7 heures à 30°C jusqu'à obtention d'une absorbance à 600 mm de 1. Après centrifugation (3000 rpm) et lavage à l'eau distillée, le culot est repris dans de l'acétate de lithium (LiAc) 80 mM. Pour chaque transformation, un mix est préparé contenant du PEG_{3350} 35%, LiAC 80 mM, ADN carrier (2 mg/mL) et 300 ng à 1 µg de plasmide, auquel on ajoute les 100 µl levures précédemment préparées. L'ADN et la suspension de levures sont ensuite incubés à 30°C pendant 30 minutes puis à 42°C pendant 20 minutes. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 30 secondes à 7000 rpm, et le culot est repris dans 200 µL d'eau stérile. Les suspensions de levures transformées sont étalées sur boîtes –LW et laissées à 30 °C pendant 3 à 4 jours.

II.2.c *Transformation transitoire des cellules de C. roseus par biolistique*

Le protocole de transformation par biolistique des cellules de *C. roseus* a été mis au point au laboratoire de Biochimie et Biotechnologies Végétales, Université de Tours (Guirimand *et al.*, 2009).

II.2.c.1 *Préparation des tapis cellulaires*

Au 3ème jour de culture, 4 mL de suspensions cellulaires C20D ou C20A (cultivées en absence de 2,4D) sont filtrés sous vide partiel sur un disque de papier Whatman stérile (cat No. 1001917)

afin d'obtenir un tapis cellulaire homogène. Les tapis cellulaires sont ensuite déposés sur boîtes de Pétri (45 mm) sur du milieu de Gamborg gélosé (agar 0,8%) contenant de la céfotaxime (200 µg/mL) et du saccharose (58 mM). Les boîtes sont incubées 48h à 28°C à l'obscurité.

II.2.c.2 *Protocole de transformation transitoire par biolistique*

Les cellules sont transformées par bombardement de microbilles d'or de 1 µm de diamètre (1.0 Micron Gold, Bio-Rad), à l'aide d'un canon à particules PDS-1000/He Biolistic (Bio-Rad).

Préparation des microbilles et adsorption des plasmides aux microbilles

Pour 5 répétitions, 5 g de chaque construction plasmidique utilisée selon le type de transformation réalisée sont mis au contact de 3 mg de microbilles d'or. L'adsorption se fait en présence de 20 µL de spermidine (0,1 M) et de $CaCl_2$ (2,5 M). Ce mélange est incubé pendant 15 minutes à température ambiante sous agitation douce, centrifugé puis le surnageant est éliminé. Les microbilles sont ensuite lavées et mises en suspension dans de l'éthanol pur (48 µL).

Bombardement des cellules à l'aide du canon à particules

Pour chaque transformation, 8 µL de la solution de microbilles (500 µg) sont déposés sur le disque porteur et, après évaporation de l'éthanol, le disque est placé dans son support. Le tapis cellulaire est placé à une distance de 6 cm du dispositif de projection. Le bombardement de microbilles est réalisé à une pression d'hélium de 1100 psi, sous vide partiel de 28 in.Hg. Les tapis cellulaires transformés sont ensuite incubés à 25°C à l'obscurité pendant 24 heures.

II.3 Extraction, purification et analyse des acides nucléiques

II.3.a *Extraction des acides nucléiques*

II.3.a.1 *Extraction d'ARN totaux*

Extractions d'ARN totaux des racines de peuplier

Ces extractions ont été réalisées d'après Chang et collaborateurs (1993) et Claudot et collaborateurs (1999). Après broyage de 5 g de racines (matière fraîche) dans l'azote liquide avec 2,5 g de polyvinylpolypyrrolidone (0,5 fois MF), la poudre fine est déposée dans le tampon d'extraction (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8, 25 mM EDTA pH 8, 2 M NaCl, 0,5 g/L spermidine) chauffé à 65°C. Un volume égal d'une solution chloroforme:alcool isoamylique (C:I) 24 :1 (v/v) est ajouté, le mélange est ensuite homogénéisé par agitation au vortex pendant 10 minutes. La phase

aqueuse est ensuite récupérée après centrifugation de 15 minutes à 10 000 rpm et une nouvelle extraction C:I est réalisée. Après ajout de Chlorure de Lithium (LiCl, 2 M) à la phase aqueuse récupérée, les ARN sont précipités sur la nuit à 4°C. Le lendemain, les culots d'ARN sont repris dans 500 µL d'un tampon SSTE (1 M NaCl, 0,5% SDS (dodécylsulfate de sodium), 10 mM Tris-HCl pH 8,1 mM EDTA pH 8) après centrifugation de 20 minutes à 10 000 rpm à 4°C. Une nouvelle extraction C:I est réalisée et la phase aqueuse est précipitée pendant 2 heures à -20°C par deux volumes d'éthanol absolu. Le culot est enfin récupéré et séché après centrifugation de 20 minutes à 12 000 rpm à 4°C. Il est ensuite repris dans 15 µL d'eau ultra pure traitée au DEPC (diéthylpyrocarbonate).

Extraction d'ARN totaux des autres organes de peuplier par le kit NucleoSpin RNA Plant (Magerey-Nagel)

Nous avons suivi le protocole préconisé par le fournisseur. Les organes ont été au préalable broyés en poudre fine dans l'azote liquide, et 100 mg ont été utilisés pour réaliser les extractions. Les ARN ont été élués dans 40 µL d'eau pure traitée au DEPC.

II.3.a.2 *Extraction d'ADN plasmidique à partir de bactéries E. coli*

Les extractions d'ADN plasmidiques peuvent être réalisées à partir de petites ou de grandes quantités de culture (minipréparation : 3 mL ou maxipréparation : 50 mL). Les cultures sont ensemencées le soir, et mises à agiter (250 rpm) une nuit à 37°C.

Minipréparations

Après centrifugation (2 minutes, 13 000 rpm), le culot bactérien est resuspendu dans 200 µL de solution I (25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 0,1 mg/mL RNase). Par ajout de 200 µL de solution II (0,2 mM NaOH, 1% SDS) puis de 200 µL de solution III (11,5% Acide acétique, 3 M Acétate de potassium) nous procédons successivement à la lyse alcaline et à la séparation des ADN génomique et plasmidique. Les débris cellulaires sont ensuite éliminés par centrifugation (10 minutes, 13 000 rpm, 4°C), et le surnageant contenant l'ADN plasmidique est précipité par addition de 500 µL d'isopropanol. Après centrifugation (15 minutes, 13 000 rpm, 4°C), les culots sont lavés à l'éthanol 70%, séchés et repris dans 50 µL d'eau.

Minipréparations par le kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel)

Nous avons suivi le protocole préconisé par le fournisseur. Ce kit nous permet d'obtenir un ADN plasmidique de bonne qualité.

Maxipréparation par le kit NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel)

Nous avons suivi le protocole préconisé par le fournisseur. Ce kit nous permet d'obtenir un ADN plasmidique en grande quantité et de bonne qualité.

II.3.b *Purification d'ADN en solution ou à partir de gel d'agarose*

La purification des produits ADN issus d'amplification par PCR ou de digestion enzymatique est effectuée à l'aide du kit NucleoSpin gel and PCR clean-up (Macherey-Nagel) soit directement soit après excision de la bande d'interêt à partir d'un gel d'agarose. Nous avons suivi les instructions recommandées par le fournisseur.

II.3.c *Déphosphorylation*

La Shrimp Alkaline Phosphatase (Promega) déphosphoryle les extrémités 5' des ADN pour prévenir la re-circularisation d'un vecteur linéarisé à la suite d'une digestion simple pour réaliser un clonage. Après digestion du plasmide, 6 unités d'enzyme sont directement ajoutées (sans changer de tampon au préalable) dans son tampon de réaction. Le mélange réactionnel est laissé pendant 30 minutes à 37°C et l'enzyme est ensuite désactivée à 65°C pendant 15 minutes.

II.3.d *Analyse des acides nucléiques*

II.3.d.1 *Electrophorèse sur gel d'agarose*

La séparation de plusieurs fragments d'ADN, la détermination de la taille et de la pureté d'un fragment d'ADN, mais également la vérification de l'intégrité des ARN ont été réalisés par électrophorèse en gel d'agarose de 0,8 à 1,2% dans un tampon TAE 1x (40 mM Tris-Acétate, 1 mM EDTA). La révélation des acides nucléiques s'effectue sous Ultraviolets (UV) après immersion du gel dans une solution de Bromure d'Ethidium (BET, 0,1 µg/mL) pendant 15 minutes.

II.3.d.2 *Digestions enzymatiques*

Toutes les enzymes de restriction proviennent de New England Biolabs. Les objectifs des digestions enzymatiques sont multiples : libération d'un insert pour sous-clonage dans un autre vecteur, vérification de l'orientation de l'insert et du profil de restriction, ou vérification de l'intégrité des sites de restriction. L'ADN plasmidique (500 ng à 6 µg) est donc digéré par ajout de 5 à 10 unités d'enzyme. Les digestions s'effectuent dans un volume total de 20 à 50 µL, pendant 1 à 3 heures voire durant une nuit à 37°C.

II.3.d.3 *Dosage des acides nucléiques*

La concentration des acides nucléiques a été déterminée par dosage spectrophotométrique à 260 nm en utilisant le NanoDrop® (ND 1000, Thermo Scientific).

II.4 Réactions de polymérisation en chaîne (PCR) et ses méthodes dérivées

II.4.a *PCR*

Le fragment d'ADN désiré a été amplifié à partir d'une matrice plasmidique par PCR en utilisant soit une ADN polymérase basse-fidélité (GoTaq®DNA Polymerase, Promega) soit une ADN polymérase haute-fidélité (Phusion High Fidelity DNA Polymerase, Finnzyme). Le protocole (TABLEAU 12) et les programmes PCR (TABLEAU 13) suivants ont été utilisés pour les amplifications.

TABLEAU 12 – Composants d'une PCR

Composants	Volumes	Concentration finale
ADN matrice (50-70 ng/µL)	1 µL	50-70 ng
Tampon 5X	10 µL	1x
Mix dNTP (10 mM)	1 µL	0,2 mM
Amorce forward (10 µM)	1 µL	0,2 µM
Amorce reverse (10 µM)	1 µL	0,2 µM
GoTaq (5U/µl) ou Phusion (2U/µL) polymérase	0,3 ou 0.5 µL	1,5 ou 1 U
H_2O	qsp 50 µL	

TABLEAU 13 – Programme d'une PCR

Réaction PCR	GoTaq			Phusion		
	température	*temps*	*Nb cycles*	*température*	*temps*	*Nb cycles*
Dénaturation initiale	94°C	2 min	1	98°C	30 sec	1
Dénaturation	94°C	1 min		98°C	10 sec	
Hybridation	*	1 min	25-35	*	30 sec	25-35
Elongation	72°C	1 kb/min		72°C	1 kb/30 sec	
élongation finale	72°C	5 min	1	72°C	5 min	1

*La température d'hybridation dépend de la composition en base de chaque amorce utilisée.

Pour vérifier la présence de l'ADN recombinant après transformation, les bactéries ou les levures peuvent être analysées par PCR.

Concernant les bactéries, l'amplification est effectuée à partir d'une colonie déposée dans un microtube en utilisant soit un couple d'amorces universelles situées de part et d'autre du site de

clonage du vecteur, soit avec une amorce sens sur le vecteur et une antisens dans l'insert afin de réaliser une PCR orientée. Ce type de PCR est réalisé avec la GoTaq® et le programme d'amplification est le même que précédemment, mise à part l'étape de dénaturation initiale réalisée à 98°C afin de lyser les bactéries.

Concernant les levures, au préalable un traitement supplémentaire afin de lyser les cellules est nécessaire. Dans un microtube, une pointe de cône d'une colonie re-suspendue dans 10 µL de soude (NaOH, 0,02 M) est incubé pendant 5 minutes à 95°C puis mis dans la glace. L'amplification est réalisée avec 2 µL du mélange préparé précédemment comme matrice, en utilisant les amorces spécifiques (ANNEXE 2) des vecteurs pLex (LexA5 et LexA3) et pGAD (T7 prom et ACT3). Ce type de PCR est réalisé avec la GoTaq® en utilisant le programme d'amplification classique.

II.4.b *RT-PCR*

Les analyses transcriptionnelles par RT-PCR relative ont été réalisées à partir d'1 µg d'ARN contrairement à celle réalisées par RT-PCR en temps réel réalisée à partir de 2 µg.

II.4.b.1 *Traitement à la désoxyribonucléase I (DNase I) des ARN*

Afin de réaliser des PCR en temps réel, un traitement supplémentaire à la DNase I est nécessaire afin de dégrader l'ADN éventuellement encore présent dans les échantillons et qui pourrait être considéré comme matrice par l'enzyme de transcription inverse. Le mélange réactionnel (VF = 10 µL) comprend 2 µg d'ARN totaux, 1 µL de tampon 10x DNase I RNase free et 1 unité de DNase I RNase free (Thermo Scientific). Ce mélange est incubé 30 minutes à 37°C. La réaction est stoppée par ajout d'éthylene diamine tetra-acetic acid (EDTA, 2,5 mM), et l'enzyme est inactivée à 65°C pendant 10 minutes.

II.4.b.2 *Transcription inverse des ARN*

La synthèse d'ADNc est réalisée dans un volume réactionnel de 20 µL contenant 1 µg d'ARN total ou 2 µg d'ARN traités à la DNase I, 4,25 µM d'oligodT modifié (Carpin *et al.*, 1998), 0,5 mM de dNTP, 200 unités d'enzyme M-MuLV Reverse Transcriptase RNase H- (Finnzyme), du tampon de réaction 1x fourni avec l'enzyme (500 mM Tris-HCL pH 8,3, 30 mM $MgCl_2$, 750 mM KCl, 100 mM DTT). Le mélange comprenant les ARN et les oligodT est mis à 70°C pendant 10 minutes. Les tubes de réaction sont ensuite placés dans la glace durant 2 minutes, puis le mélange réactionnel (dNTP et tampon) est ajouté. Les tubes sont remis pendant 2 minutes à 62°C et au terme de ce temps, l'enzyme est rajoutée. La réaction est alors réalisée durant une heure à 42°C puis arrêtée par une incubation de 15 minutes à 70°C. Les ADNc ainsi obtenus sont conservés à -20°C.

II.4.b.3 *RT-PCR relative*

Cette technique a été utilisée pour vérifier la co-expression des transcrits des gènes *HPt* et *RR*, dans les différents organes de boutures de peuplier (racines, tiges, pétioles, feuilles) en condition témoin et stressée par une contrainte osmotique (PEG 50 g/L, pendant 10 min). Un microlitre d'ADNc obtenu à partir de 1 µg d'ARN totaux a été utilisé pour réaliser avec des amorces spécifiques (0,2 µM), des amplifications (30 ou 40 cycles) des gènes *HPt* et des *RR*. Le gène de la *clathrine* a été utilisé comme contrôle interne. Les PCR ont été réalisées en triple exemplaires à partir d'échantillons provenant de deux expériences différentes. Les séquences des amorces utilisées pour cette étude concernant les *HPt* sont répertoriées dans le TABLEAU 14, les *RR* et la *clathrine* dans l'ARTICLE III (Données supplémentaires).

TABLEAU 14 – Séquences des amorces utilisées pour la RT-PCR relative

Gènes	Amorces	Séquence 5'-3'	Tm
HPt2	HPt2-5'	ATGGAGGTTGGCCAGATGC	58°C
	HPt2-3'	AGAACTCAATTCTTCCATAGG	
HPt6	HPt6-5'	ATGGAGGTTGTTCAGATGCAGAG	66°C
	HPt6-3'	TTAACAACTCAATTCTTCCATAGG	
HPt7	HPt7-5'	ATGGATAGTGTGGTTCAGTTGC	64°C
	HPt7-3'	TCACATTGGCCAAGGAATTGAC	
HPt9	HPt9-5'	ATGGACAGTGTAGTTCAGTTGC	65°C
	HPt9-3'	TTACATTGGCCAAGGAATTGACC	
HPt10	HPt10-5'	ATGGACAGAAAACAATTGCAACACC	67°C
	HPt10-3'	TCAGGCACTCTCGGCTAGTCC	

II.4.b.4 *RT-PCR en temps réel*

Cette technique a été utilisée pour analyser l'expression de *HK1*, *RR13* et *18*, et un gène de la *déhydrine* dans les différents organes des boutures de peuplier en condition témoin et de contrainte osmotique (PEG 100 g/L).

Ces expériences ont été réalisées au laboratoire BBV de Tours, utilisant la technologie du SYBR-green®, un agent intercalant non spécifique capable d'émettre de la fluorescence. Chaque réaction PCR est réalisée en triplicat pour chaque gène et modalité, dans un volume final de 15 µL (en plaque 96 puits). Le mélange réactionnel contient 160 ng d'ADNc (6 µl d'ADNc dilué 12 fois), les amorces spécifiques des séquences cibles sens et antisens à 0,5 µM (TABLEAU 15) et 7,5 µL de SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad). L'amplification est réalisée selon le programme suivant : 1 cycle de 30 sec à 95°C, suivi de 40 cycles de 5 sec à 95°C, puis 20 sec à 60°C grâce au thermocycleur CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). A la fin de chaque PCR, la

vérification de la spécificité de l'amplification est effectuée par réalisation d'une courbe de dissociation (65°C à 95°C ; incrément de 0,5°C toutes les secondes). De plus, afin de s'assurer de l'absence de contaminations, un contrôle négatif sans ADNc est réalisé pour chaque combinaison d'amorces. Les résultats sont ensuite analysés grâce au logiciel Bio-Rad CFX Manager 3.0.

La valeur moyenne des Ct (threshold Cycle, qui est le nombre de cycles PCR réalisés à partir duquel un certain seuil de fluorescence est détecté) a été considérée pour calculer l'expression relative des gènes. La méthode utilisée ici est donc celle de la quantification relative reposant sur l'analyse des $2^{-\Delta\Delta Ct}$ traduisant des facteurs d'induction. Cette méthode fait intervenir d'une part un gène de référence dont l'expression est constitutive quelque soit les modalités testées, permettant de normaliser les résultats entre les différentes conditions testées. Pour cette étude, le gène YLS8 (**Y**ELLOW **L**EAF **S**PECIFIC GENE **8**, numéro d'accession AT5g08290) a été choisi. D'autre part, une condition de référence (calibrateur) est à définir et sert de point de comparaison pour le calcul d'expression relative. Deux analyses statistiques différentes ont été réalisées (MATÉRIELS ET MÉTHODES, II.15). Une première permettant de comparer l'ensemble des organes en condition témoin dans laquelle les racines au temps 0 ont été choisies comme calibrateur d'expression, et une deuxième considérant chaque organe séparément dans laquelle chaque nature d'organe au temps 0 a servi de calibrateur.

TABLEAU 15- Séquences des amorces utilisées pour la RT-PCR en temps réel

Gènes	Amorces	Séquence 5'-3'	Tm
HK1	HK1a&b-F	GCTTGGAGGTTGGCATGGATGC	60°C
	HK1a-R	CGAAAGAAAATCCATGGGTATTAC	
RR13	Q-RR13-F	TTAGTTTTTGACTCTTTTATGGA	
	Q-RR13-R	GAACTGATCTGAAACACCACCAGAAC	
RR18	Q-RR18-F	TTGGATCCAAAAATGAGGTCTAAC	
	Q-RR18-R	TGAAAAGAACGCATATGAAGTTTG	
Déhydrine	Q-déhyd-F	CCTCCAGCTCCTGAACATGTTTCC	
	Q-déhyd-R	GAGTGCTTCCCAGTAGGGCAGCAG	
YLS8	5'YLS8	GGGTGCCCTGGTTAATTCAAAATCTC	
	3'YLS8	CATGGAACTGGTTATCCACACCAACC	

II.4.b.5 *Mutagénèse dirigée par PCR*

Au préalable, la phosphorylation des amorces est réalisée dans un volume de 50 µL, comprenant 8,34 µM d'amorce oligonucléotidique, 10 unités de T4 polynucléotide kinase (New England Biolabs) dans son tampon fourni, 1 mM d'ATP. Le mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 30 minutes et l'enzyme est inactivée à 65°C pendant 20 minutes. Ensuite, une PCR est réalisée et nous permet dans ce cas d'introduire une substitution de bases à l'intérieur d'une

séquence d'ADN à amplifier. La matrice utilisée est le vecteur plasmidique définitif portant l'insert d'intérêt. L'amplification est réalisée par un couple d'amorces phosphorylées complémentaires de l'insert d'ADN, en orientation inverse afin d'amplifier la totalité du plasmide. La mutation est placée au centre de l'amorce "forward" (FIGURE 16). La PCR est réalisée avec l'ADN polymérase Phusion (Finnzyme) suivant le programme et les conditions présentés en TABLEAU 13 et en TABLEAU 16. Elle est suivie d'une ligation des produits PCR (25 ng) par l'ADN ligase T4 (New England Biolabs), pendant 1 heure à 25°C selon les recommandations du fournisseur.

La mutagénèse dirigée par PCR a été utilisée dans le cadre de cette étude afin de générer divers mutants utilisés notamment en double-hybride, en BiFC, en *trans*-activation, et également dans la production de protéines recombinantes. Afin d'obtenir des combinaisons de mutants, une succession de différentes réactions PCR en utilisant les amorces mutées a été réalisée. Toutes les constructions, les amorces ainsi que les matrices utilisées sont résumés dans le TABLEAU 17.

TABLEAU 16 – Conditions PCR pour la mutagénèse dirigée

Composants	Volumes	Concentration finale
ADN matrice (1 ng/µL)	1 µL	1 ng
Tampon 5X	10 µL	1x
Mix dNTP (10 mM)	1 µL	0,2 mM
Amorce forward (8,34 µM)	1 µL	0,7 µM
Amorce reverse (8,34 µM)	1 µL	0,7 µM
Phusion polymérase	0,5 µL	1 U
H_2O	qsp 50 µL	

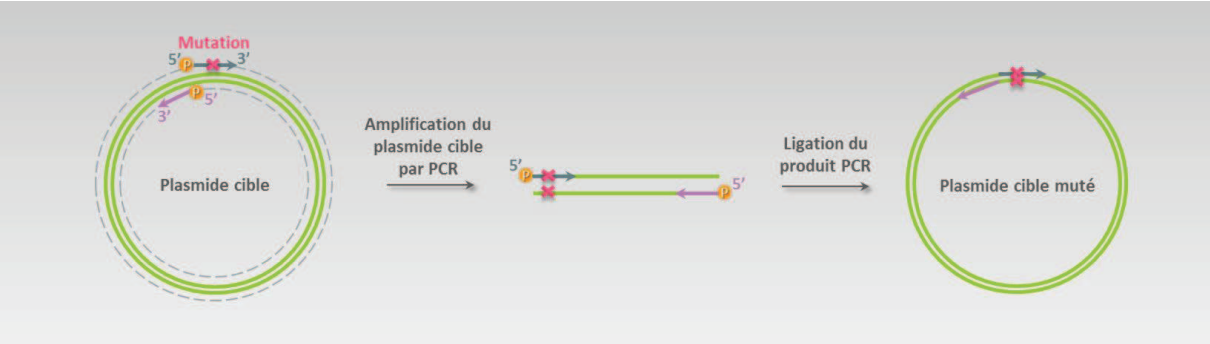


FIGURE 16 – Schéma du principe de la mutagénèse dirigée par PCR

II.4.b.6 *PCR pour réaction de séquençage et précipitation des séquences*

Le séquençage est basé sur la méthode de Sanger qui, sommairement, consiste en une réaction d'amplification utilisant une amorce unique et 4 terminateurs de la réaction de

polymérisation marqués par des fluorochromes spécifiques. L'amplification est réalisée à l'aide du kit Big Dye®Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems) selon les instructions du fournisseur en utilisant les amorces universelles (ANNEXE 2) et/ou spécifiques à une concentration de 250 nM et 1 µL de minipreparation de plasmides recombinants comme matrice. Le protocole thermique est le suivant : 2 minutes à 95°C, 10 secondes à 96°C, 15 secondes à la température d'hybridation des amorces, 4 minutes à 60°C, répétés sur 30 cycles. Les ADN sont ensuite précipités par ajout d'éthanol à 80%. Après centrifugation (13 000 rpm, 15 minutes, 4°C) et élimination des surnageants, les culots sont lavés à l'éthanol 70% et centrifugés de nouveau avant d'être repris dans 20 µL d'eau pure. La lecture des séquences est réalisée à l'aide du séquenceur automatique ABI 3500 Genetic Analyzer disponible à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) d'Orléans. L'analyse des chromatogrammes obtenus est effectuée à l'aide du logiciel BioEdit®.

II.5 Clonages dans les vecteurs plasmidiques

II.5.a *Clonage dans le vecteur pGEM®-T Easy et A-tailing*

Le vecteur pGEM®-T Easy (Promega) possède une thymine supplémentaire saillante en 3', permettant ainsi un clonage rapide des fragments d'ADN issu de PCR possédant une adénine à son extrémité. Les PCR réalisées avec la *Taq* polymérase possédant une activité déoxynucléotidyl terminal transférase, confèrent aux produits PCR cette particularité. Par contre, concernant les produits PCR amplifiés par la Phusion, il est nécessaire d'ajouter des adénines à leurs extrémités avant la ligation. Cette étape est réalisée dans un volume réactionnel de 10 µl, comprenant 6,8 µl de produit PCR purifiés, de dATP (0,2 mM) et 5 unités de GoTaq® (Promega) dans son tampon de réaction spécifique. Le mélange est incubé pendant 30 min à 70°C, et pourra être directement utilisé pour la ligation selon les recommandations du fournisseur.

II.5.b *Clonage dans les vecteurs pGAD et pLex*

Les vecteurs pGAD et pLex (ANNEXE 1) ont été utilisés pour la technique du double-hydride afin de tester d'une part les interactions entre HPt2, 7 et 9 et l'ensemble des RR-B, et d'autre part les interactions du RR13-DDK et de ces différents mutants (RR13-DDK^{E123K}, RR13-DDK^{M105K}, RR13-DDK$^{E123K-M105K}$) générés par mutagénèse sur eux-mêmes.

TABLEAU 17 – Résumé des matrices plasmidiques et amorces utilisées pour la mutagénèse

Mutant	Amorces	Séquences 5'-3'	Technique	Vecteur matrice	Tm
DDK^{E123K}	DDK-RR13-E123K-F	CCGATTCGCATTAAGGCACTTAAGAAC	Double-hybride	RR13-DDK-pLex ; RR13-DDK-pGAD	68°C
	DDK-RR13-E123K-R	TTTAATCAGGTAATCACAAGCACCATG	BiFC	RR13-pSPYCE(MR) ; RR13-pSPYNE(R)173	
DDK^{M105K}	DDK-RR13-M105K-F	AAAAATGTGGTCAAGAAAGGTGTAACT	*Trans*-activation	RR13-pRT104	
	DDK-RR13-M105K-R	CCCATCATCAGCTGACATCATGATAAC	Production protéine	RR13-DDK-pET15b	
DDK^{D69E}	RR13-D69E-F	ATTGTTATAAGTGAAGTCCACATGCCA	*Trans*-activation	RR13-pRT104	68°C
DDK^{D68N}	RR13-D69EouN-R	ATCGTACCCGTTTCTGTTCTCTCGAAG			
	RR13-D69N-F	ATTGTTATAAGTAATGTCCACATGCCA			
DDK^{E58K}	DDK-RR13-E58K-F	TCTTTGCTTCGAAAGAACAGAAACGGG	Production protéine	RR13-DDK-pET15b	68°C
	DDK-RR13-E58KouA-R	CAACGCAATCTCTGCTCGGTTACACTT			

Afin de cloner un ADNc en aval soit du domaine de liaison à l'ADN (DBD) soit du domaine de *trans*-activation (AD), des amorces oligonucléotidiques ont été conçues de façon à ajouter deux sites de restrictions différents en 5' et 3' de l'ADN à amplifier par PCR classique avec la Phusion (TABLEAU 18). Par la suite, les produits PCR et les deux plasmides pLex et pGAD ont été digérés par les enzymes de restrictions adéquates. Concernant le clonage des HPt (2, 7 et 9), les plasmides pGAD-HPt étaient disponibles au laboratoire. Les inserts ont donc été libérés par digestion en utilisant les enzymes de restrictions correspondantes. Les ADNc ou produits de digestion ont été ensuite insérés dans les plasmides par action de l'ADN ligase T4 (New England Biolabs) en suivant les recommandations du fournisseur. Les plasmides ont ensuite été directement utilisés pour les transformations des levures (MATÉRIELS ET MÉTHODES, II.2.b).

TABLEAU 18 – Résumé des clonages réalisés dans pLex et pGAD

Constructions et site de clonage			Amorces	Séquences 5'-3'	Tm
	pLex	**pGAD**			
HPt2	*Eco*R1/*Sal1*	Ø			
HPt7	*Eco*R1/*Bam*H1	Ø			
HPt9	*Eco*R1/*Bam*H1	Ø			
RR12	Ø	*Xma*1/*Sal*1	RR12-*Xma*5	CGCGCCCGGGGATGATGAATCTTGCTAACTGC	60°C
			RR12-*Sal*3	ATCGCGTCGACTACACAGGAATATTATCCAGG	
RR13	Ø	*Xma*1/*Sal*1	RR13-*Xma*5	CGCGCCCGGGGATGTCAACGGCTAGTTCTGG	55°c
			RR13-*Sal*3	ATCGCGTCGACTACACAGGAATATTATCCA	
RR13-DDK	*Xma*1/*Sal*1	*Xma*1/*Xho*1	RR13-*Xma*5	CGCGCCCGGGGATGTCAACGGCTAGTTCTGG	60°C
			RR13-DDK-*Sal*N	ATCGCGTCGACTTATTGTTCCAAATCCTTCCACTCG	
RR14	Ø	*Xma*1/*Sal*1	RR14-*Xma*5	CGCGCCCGGGGATGGAAAATAATGGTTTCTCTTCTCC	60°C
			RR14-*Sal*3	ATCGCGTCGACTCATGCTATAAACAAGCTTTC	
RR15	Ø	*Cla*1/*Xho*1	RR15N-*Cla*5	CGCGATCGATGGATGGCTGCTTTGCAGCGAGT	55°C
			RR15N-*Xho*3	ATCGCCTCGAGCTATTCTTTGAAAACACTCA	
RR16	Ø	*Xma*1/*Sal*1	RR16-*Xma*5	CGCGCCCGGGGATGGCTGCTTTGCAGCGAGTGG	68°C
			RR16-*Sal*3	ATCGCGTCGACTATTCTGTGAAAACACTCATAAG	
RR18	Ø	*Xma*1 / *Bgl*II	*Xma*RR18	TCCCCCGGGGATGGCTGTAGACGACCAAAG	60°C
			RR18*Bgl*II	GAAGATCTTTAGAGCACGAAAACTTGAAATG	
RR19	Ø	*Cla*1/*Sal*1	RR19-*Cla*5	CGCGATCGATGGATGACCGTAGAGGACCAAAG	60°C
			RR19-*Sal*3+	TGCGCGTCGACTCATACCCGTTTGATCATTGC	
RR21	Ø	*Xma*1/*Sal*1	RR21-*Xma*5	CGCGCCCGGGGATGGAGAATGGTTTCTCCTCTCC	68°C
			RR21-*Sal*3	ATCGCGTCGACTCATATAAACAAGCTTTGATCTATTAG	
RR22	Ø	*Xma1/Sal1*	RR22-*Xma*5	CGCGCCCGGGGATGACTGTAGAACAGGGGAT	55°C
			RR22-*Sal*3	ATCGCGTCGACTAACCAAGAATGGTTGGCA	

Ø : construction non réalisée dans cette étude

II.5.c *Clonage dans les vecteurs pSCA-SPYNE173, pSCA-SPYCE(M), pSPYNE(R)173 et pSPYCE(MR)*

Les vecteurs pSCA-SPYNE173, pSCA-SPYCE(M), pSPYNE(R)173 et pSPYCE(MR) (ANNEXE 1) ont été utilisés pour la technique du BiFC (**Bi**molecular **F**luorescence **C**omplementation) afin de tester d'une part les interactions *in planta* entre HPt2, 7, 9 et HK1-CP puis HPt2, 7, 9 et RR13, 16, 18 et 19 et d'autre part les interactions du RR13 avec lui-même et avec ses formes mutées (RR13$^{E123K-M105K}$-pSPYCE(MR) ; RR13$^{E123K-M105K}$-pSPYNE(R)137) générées par mutagenèse.

Pour cette étude d'interaction protéique, les séquences codantes des protéines d'intérêt doivent être intégrées en 5' ou en 3' de chacune des deux séquences codant les sous-domaines de la protéine YFP (YFP^N, aa 1 à 173 et YFP^C, aa 156 à 239), afin de produire les protéines de fusion "protéine-YFP^{NouC}" ou "YFP^{NouC}-protéine". Les ADNc des protéines étudiées ont été amplifiés selon un protocole classique (Phusion) à l'aide d'amorces spécifiques (TABLEAU 19) permettant la création de deux sites de restriction *Spe*I ou *Bam*HI en 5' et en 3', et la conservation du site d'initiation et en fonction des cas, l'élimination ou non du codon stop. Après une étape de sous-clonage dans un pGEM-T et vérification de la séquence de l'insert d'intérêt, les ADNc ont tout d'abord été digérés par les enzymes de restrictions appropriées (*Spe*I ou *Bam*HI) et intégrés dans les vecteurs BiFC préalablement digérés et déphosphorylés. Les vecteurs pSCA-SPYNE173 et pSCA-SPYCE(M) (Guirimand *et al.*, 2010) dérivant des vecteurs pSPYNE73 et pSPYCE(M) (Waadt *et al.*, 2008) et les vecteurs pSPYNE(R)173 et pSPYCE(MR) (Waadt *et al.*, 2008) permettent l'expression de la protéine d'intérêt fusionnée respectivement en N-terminal ou C-terminal à deux hémi-YFP. Les protéines de fusion sont exprimées sous le contrôle du promoteur constitutif CaMV35S.

TABLEAU 19 – Résumé des clonages effectués pour le BiFC

Constructions	Vecteurs et sites de clonage		Amorces	Séquences 5'-3'	Tm
	pSCA-pSPYNE173 **pSCA-pSPYCE(M)**	**pSPYNE(R)173** **pSPYCE(MR)**			
HK1-CP	*Spe*1	*Spe*1	HK1-CP	ACTAGT**ATG**CATCTTGATGCAAGGAGAAGGG	66°C
			*Spe*1-HK1-YFP	CGTGATCAGGCTTTTCTTCTGG	
HPt2	Ø	*Spe*1	5-*Spe*HPt2	ACTAGT**ATG**GAGGTTGGCCAGATGC	52°C
			3-*Spe*HPt2	ACTAGTAGAACTCAATTCTTCCATAGG	
HPt7	Ø	*Spe*1	5-*Spe*HPt7	CGCGACTAGT**ATG**GATAGTGTGGTTCAGTTGC	62°C
			3-*Spe*HPt7	ATCGCACTAGTCATTGGCCAAGGAATTGACC	
HPt9	Ø	*Spe*1	5-*Spe*HPt9	ACTAGT**ATG**GACAGTGTAGTTCAGTTGC	64°C
			3-*Spe*HPt9	ACTAGTCATTGGCCAAGGAATTGACCCT	
RR13	Ø	*Bam*H1	5-*Bam*HIRR13	GGATCC**ATG**TCAACGGCTAGTTCTGG	55°C
			3-*Bam*HIRR13	GGATCCCACAGGAATATTATCCAGG	
RR16	Ø	*Spe*1	5-*Spe*RR16	ACTAGT**ATG**GCTGCTTTGCAGCGAGTGG	68°C
			3-*Spe*RR16	ACTAGTTTCTGTGAAAACACTCATAAGATCG	
RR18	Ø	*Spe*1	RR18-*Spe*5	CGCGACTAGT**ATG**GCTGTAGACGACCAAAGG	58°C
			RR18-*Spe*3	ATCGCACTAGTGAGCACGAAAACTTGAAATG	
RR19	Ø	*Spe*1	RR19-*Spe*5	CGCGACTAGT**ATG**ACCGTAGAGGACCAAAGG	60°C
			RR19-*Spe*3	ATCGCACTAGT**TCA**TACCCGTTTGATCATTGC	

II.5.d *Clonage dans les vecteurs pSCA-cassette YFP et pSCA-cassette GFP*

Les vecteurs pSCA-cassette YFPi et pSCA-cassette GFP (ANNEXE 1) ont été utilisés pour des études de localisation cellulaire pour plusieurs protéines : HK1, HPt2 et 9, et RR13 et 16.

Pour cette étude, les ADNc des protéines d'intérêt doivent être intégrés en 5' ou en 3' de la séquence codant la protéine fluorescente (YFP ou GFP), afin de générer deux types de configurations de protéine de fusion "protéine-YFP^{ou}GFP" ou "YFP^{ou}GFP-protéine".

Les ADNc (HPt2, 7 et 9 ; RR16) ont été en partie récupérés par digestion des constructions plasmidiques pGEM-T obtenues précédemment (pour le BiFC) par *Spe*I. Cependant, de nouvelles amorces spécifiques (TABLEAU 20) ont été choisies pour HKI pleine longueur et RR13, de sorte à conserver le codon d'initiation et à éliminer le codon stop des séquences codantes. Les sites de restrictions *Spe*I (HK1) ou *Xba*I (RR13) ont été introduits en 5' et 3' dans les ADNc à amplifier. Les produits PCR ont d'abord été clonés dans pGEM-T, puis séquencés.

Les produits de digestion (*Spe*I et *Xba*I) ont été clonés au niveau des sites *Spe*I ou *Nhe*I du vecteur pSCA-cassette GFP ou pSCA-cassette YFP déphosphorylés respectivement en phase avec l'extrémité 5' ou 3' de la séquence codant les protéines fluorescentes GFP ou YFP. Ces deux vecteurs ont été construits et décrits par Guirimand et collaborateurs (2009). Ils dérivent du vecteur pSC-A et possède un promoteur CaMV35S en amont de la séquence codante de la protéine GFP ou YFP (ANNEXE 1). Toutes les protéines de fusion ont été générées dans les deux configurations sauf pour HK1 (HK1-YFP).

TABLEAU 20 – Résumé des clonages effectués pour la localisation cellulaire

Constructions	Vecteurs et sites de clonage		Amorces	Séquences 5'-3'	Tm
	pSCA-cassette YFP	**pSCA-cassette GFP**			
HK1	*Spe*1	Ø	5-*Spe*HK1YFP	GCACTAGTATGGCTGAGGAAGGACG	56°C
			3-*Spe*HK1YFP	CGTGATCAGGCTTTTCTTCTGG	
HPt2	Ø	*Spe*1			
HPt9	Ø	*Spe*1			
RR13	Ø	*Xba*1	5-*Xba*-RR13	TCTAGAATGTCAACGGCTAGTTCTGG	60°C
			3-*Xba*-RR13	TCTAGACACAGGAATATTATCCAGGGA	
RR16	Ø	*Spe*1			

II.5.e *Clonage dans le vecteur pSCA-cassette GUS*

Ce vecteur a été utilisé dans le cadre de l'étude de l'activité des promoteurs *HK1* et *Déhydrine*. Les séquences promotrices orientées ont été clonées en amont du gène *gus* et en phase avec le cadre de lecture afin que l'enzyme ß-glucuronidase soit fonctionnelle. Afin de cloner les régions promotrices, des amorces oligonucléotidiques (TABLEAU 21) portant deux sites de restrictions

différents *Pst*I en 5' et *Bgl*II en 3' ont été utilisées pour l'amplification par PCR à partir d'ADN génomique (obtenu au préalable au laboratoire). Une matrice de 200 ng d'ADN génomique a été utilisée, le promoteur *déhydrine* a été amplifié avec la GoTaq® contrairement au promoteur *HK1* amplifié avec la Phusion avec des conditions et programmes classiques. Après le sous clonage des promoteurs dans le vecteur pGEM-T, les ADN plasmidiques contenant les séquences promotrices et le vecteur pSCA-cassette GUS ont été digérés par les enzymes de restriction *Pst*I et *Bgl*II. Ce vecteur est composé d'une cassette (environ 3000 pb) contenant le gène *gus*, le promoteur constitutif CaMV35S et le terminateur NOS, amplifiée à partir du vecteur pCambia1305.1 et clonée dans le vecteur pSCA. La double digestion libère donc le promoteur CaMV35S, permettant ainsi le clonage par ligation des séquences promotrices en amont du gène rapporteur *gus*.

TABLEAU 21- Résumé des conditions de clonage dans le pSCA-cassette GUS

Constructions	Vecteurs et sites de clonage	Amorces	Séquences 5'-3'	Tm
	pSCA-cassette GUS			
HK1	*Pst*I/*Bgl*II	5*Pst*I-HK1A-prom	ACCTGCAGTGGTAACCCTACAATATTTTATTGG	56°C
		3*Bgl*II-HK1A-prom	GCAGATCTACGTCCTTCCTCAGCCATTTCC	
Déhydrine	*Pst*I/*Bgl*II	5*Pst*I-Déhydprom	GCCTGCAGTAATCTCACCCTCTCGTATTTT	60°C
		3*Bgl*II-Déhydprom	GCAGATCTCTTGTTTTCCTCAGCCATACT	

II.5.f *Clonage dans les vecteurs pGEX-5X-1 et pET15b*

Ces vecteurs ont été utilisés pour l'expression de protéines de fusion notamment les domaines GARP et DDK du RR13 (ANNEXE 3), mais également les mutants DDK du RR13 (RR13-DDK$^{E123K-M105K}$, RR13-DDK^{E58K}) afin de les purifier et de les utiliser dans des expériences *in vitro* et biophysiques comme le dichroïsme circulaire. Le pGEX-5X-1 (GE healthcare) et le pET15b (Novagen) (ANNEXE 1) sont des vecteurs permettant d'exprimer un ADN recombinant en fusion respectivement avec la Glutathion S-transférase (GST) ou avec un tag contenant 6 résidus histidine (Tag-6xHis), après induction par l'IPTG (ß-D-isopropyl-thiogalactopyranoside) dans la souche de bactérie BL21 possédant le gène *lacI*.

II.5.f.1 *pGEX-5X-1*

L'ADN codant le domaine de liaison à l'ADN (domaine GARP, aa 178 à 261, ANNEXE 3) du RR13 a été amplifié par un couple d'amorces spécifiques (TABLEAU 22) permettant d'introduire en 5' le site de restriction *Eco*RI et en 3' un codon stop suivi du site *Not*I. Une étape de sous-clonage dans le pGEM-T a été réalisée au préalable, et la séquence du RR13-GARP a pu être vérifiée. Après digestion du vecteur pGEX-5X-1, l'ADNc est inséré aux sites *Eco*RI/*Not*I du vecteur en aval et en phase avec la séquence codant la GST. Les bactéries BL21 sont ensuite co-transformées avec le

plasmide RR13-GARP-pGEX-5X-1 et le vecteur pUBS520, codant l'ARN-t arginine rare dans le système bactérien. Les deux vecteurs confèrent une résistance à l'ampicilline et à la kanamycine permettant ainsi de sélectionner les clones bactériens recombinants.

II.5.f.2 *pET15b*

Des amorces spécifiques (TABLEAU 22) délimitant le domaine DDK (aa 1-145, ANNEXE 3) du RR13 ont été créées afin de cloner cet ADN dans le site de restriction *Bam*H1 du vecteur pET15b. Après digestion du plasmide RR13-DDK pGEM-T, l'insert généré a ensuite été cloné dans le vecteur pET15b digéré par *BamH*I et déphosphorylé. Après obtention du plasmide RR13-DDK-pET15b, cette matrice a été utilisée pour la mutagénèse dirigée en générant ainsi les mutants RR13-DDK$^{E123K-M105K}$ pET15b, et RR13-DDK^{E58K} pET15b. Les bactéries BL21 ont été co-transformées avec les plasmides pET15b et pUBS520, et sélectionnées sur milieu LB Ampicilline/Kanamycine.

TABLEAU 22 – Résumé des conditions de clonage dans les plasmides pGEX-5X-1 et pET15b

Constructions	Vecteurs et sites de clonage		Amorces	Séquences 5'-3'	Tm
	pGEX-5X-1	**pET15b**			
RR13-GARP	*EcoR*I/*Not*I	Ø	5*EcoR*I-RR13GARP	GCGAATTCAAGAGGAGAAAAG**ATG**AGGAAGAAGA	60°C
			3*Not*I-RR13GARP	GCGCGGCCGCTTT**TCA**CTGTGAAACCCCACTTAACC TTCTAAG	
RR13-DDK	Ø	*Bam*HI	DDK-RR13-5*Bam*pET	ATCCGGGATCCG**ATG**TCAACGGCTAGTTCTGG	56°C
			DDK-RR13-3*Bam*pET	ATCCGGGATCC**TTA**TTGTTCCAAATCCTTCC	

II.5.g *Clonage dans le vecteur pRT104*

Afin d'étudier les capacités de fixation et de *trans*-activation des RR-B sur différents promoteurs, le vecteur pRT104 a été utilisé (ANNEXE 1). Ce vecteur a été utilisé pour la surexpression des RR13 et RR18, de ces mêmes protéines dépourvues de leur domaine régulateur DDK (RR13-ΔDDK, et RR18-ΔDDK), et des différents mutants du RR13 (RR13$^{E123K-M105K}$; RR13^{D69N} ; RR13^{D69E}, RR13$^{E123K-M105K-D69N}$, RR13$^{E123K-M105K-D69E}$).

Les séquences des RR13, RR13-ΔDDK, RR18 et RR18-ΔDDK ont été amplifiées avec leurs amorces spécifiques respectives (TABLEAU 23) permettant d'introduire aux extrémités 5' et 3' leurs sites de restrictions respectifs, afin de les cloner en aval du promoteur constitutif CaMV35S du vecteur pRT104. Après un sous-clonage dans le pGEM-T, les inserts digérés par leurs enzymes respectives ont été insérés dans le vecteur définitif. Le plasmide RR13-pRT104 a servi de matrice pour générer les mutants (RR13$^{E123K-M105K}$; RR13^{D69N} ; RR13^{D69E}, RR13$^{E123K-M105K-D69N}$, RR13$^{E123K-M105K-D69E}$).

TABLEAU 23 – **Résumé des conditions de clonage dans le plasmide pRT104**

Constructions	Vecteurs et sites de clonage	Amorces	Séquences 5'-3'	Tm
	pRT104			
RR13	*Bam*H1	5*Bam*HI-RR13	ATGGATCCATGTCAACGGCTAGTTCTGG	60°C
		3*Bam*HI-RR13	ATGGATCCCTACACAGGAATATTATCCAGG	
RR13-ΔDDK	*Xho*1/*Bam*H1	5*Xho*-RR13-ΔDDK	ATCCGCTCGAGATGTCAGGGAGTGTAGAAG AGG	58°C
RR18	*Nco*1/*Xba*1	5*Nco*I-RR18	ATCCGCCATGGATGGCTGTAGACGACCAAA GG	65°C
		3*Xba*I-RR18	ATCCGTCTAGATTAGAGCACGAAAACTTGAA ATGG	
RR18- ΔDDK	*Nco*1/*Xba*1	5*Nco*I-RR18-ΔDDK	ATCCGCCATGGATGTCCCCAAATCAAGACAA GG	65°C

II.6 Double-hybride

Afin de tester les interactions potentielles entre protéines, nous avons utilisé le système double-hybride basé sur la *trans*-activation de gènes rapporteurs chez *Saccharomyces cerevisiae*. Le système utilisé dans cette étude utilise la reconstitution d'un facteur de transcription actif par interaction entre deux protéines couplées l'une avec un domaine de liaison à l'ADN (LexA, exprimé dans le vecteur pLex), et l'autre avec un domaine d'activation de la transcription (Gal4, exprimé dans pGAD). Les clonages ainsi que les plasmides utilisés sont présentés en section II.5.b. Une première sélection d'autotrophie vis-à-vis de l'histidine (gène rapporteur *HIS3*) est couplée à une deuxième sélection réalisée grâce à l'expression d'un second gène rapporteur *LacZ* (activité ß-galactosidase) permettant ainsi d'identifier les interactions positives.

II.6.a *Tests qualitatifs de sélection d'interaction protéique*

II.6.a.1 *Test de croissance sur le milieu –LWH*

Les levures co-transformées, c'est-à-dire exprimant les protéines de fusion "BD-protéine" (pLex) et "AD-protéine" (pGAD), sont sélectionnées sur un milieu –LW après 4 jours de croissance à 30°C. Afin d'éviter les faux positifs, une PCR sur colonie peut être réalisée. Les colonies positives sont ensuite striées sur des boîtes contenant le milieu –LWH (dépourvu d'histidine), et incubées pendant 3 à 4 jours à 30°C, constituant ainsi le premier test de sélection de l'interaction. En effet, si les deux protéines d'intérêt interagissent, le domaine AD est mis à proximité du domaine BD reconstituant ainsi le facteur de transcription qui va orchestrer la transcription du 1er gène rapporteur *HIS3*, codant pour l'Imidazoleglycérol phosphate déshydratase, enzyme clé impliquée dans la biosynthèse

de l'histidine. Au préalable, au vue des capacités de certaines protéines à *trans*-activer seule un gène rapporteur, un test d'auto-activation du contrôle négatif ("protéine-pLex/pGAD") est incontournable. Dans le cas d'une auto-activation faible, l'addition de 3 amino-1,2,4-triazole (3AT), inhibiteur de l'enzyme codée par *HIS3*, dans le milieu de croissance, en effectuant une gamme de concentration, peut permettre d'éliminer les croissances résiduelles. Les RR-B étant des facteurs de transcription, ont été systématiquement clonés dans pGAD. Les HPt, elles, ont été clonées dans pLex et étant auto-activatrices, l'addition de 3AT a été nécessaire (HPt2 : 60 mM, HPt7 et 9 : 20 mM). Cependant, il n'a pas été nécessaire d'ajouter du 3AT pour les tests d'interaction RR13-DDK.

II.6.a.2 *Test de sélection X-Gal*

Ces tests ont été réalisés selon Fromont-Racine et collaborateurs (1997) en coulant directement sur les levures ayant poussées sur le milieu –LWH, le milieu réactionnel contenant du X-Gal (0,04%), du SDS (0,1%), du tampon phosphate (0,25 M // Solution stock : 0,5 M Na_2HPO_4, 0,4% H_3PO_4) et de l'agar (0,5%). Les levures sont ensuite incubées à 30°C pendant 3 à 5 heures, constituant ainsi le deuxième test de sélection d'interaction. En effet, si les deux protéines d'intérêt interagissent, le 2ème gène rapporteur *LacZ* va produire la protéine ß-Galactosidase qui hydrolyse le X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) incolore et libère le chromophore X qui précipite en un composé bleu.

II.6.b *Test quantitatif de sélection d'interaction protéique par dosage de l'activité ß-Galactosidase*

Les levures, poussant sur le milieu –LW, ont été resuspendues dans du tampon Z (50 mM Na_2HPO_4, 50 mM NaH_2PO_4, 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$) à une absorbance de 600 comprise entre 0,5 et 0,7. Après concentration des cellules dans un volume de 300 µL, 3 cycles de congélation (azote liquide)/décongélation (37°C) sont réalisés afin de les lyser. Dans 3 tubes différents, 100 µL y sont répartis afin d'effectuer des répétitions d'expérience, puis 200 µL d'ONPG (Orthonitrophenyl-β-D-galactopyranoside) (4 mg/mL dans du tampon Z) sont ajoutés dans chaque tube, y compris dans les tubes contrôles contenant 100 µL de tampon Z. Après 5 minutes d'incubation à 37°C, la réaction est stoppée par du carbonate de sodium (Na_2CO_3, 1M). Après centrifugation (10 minutes, 13 000 g), 100 µL de surnageant sont transférés dans une microplaque afin de lire l'absorbance à 420 nm. A cette longueur d'onde, on mesure l'absorbance de l'ONP (Orthonitrophenol) qui est l'un des produits hydrolysée à partir de l'ONPG par la ß-galactosidase. Les unités ß-galactosidase sont exprimées en unités Miller : une unité correspond à la quantité de ß-galactosidase qui hydrolyse 1 µmol d'ONPG en ONP et D-galactose par minute et par cellule.

$$Unités\ ß - Gal\ =\ 1000\ \times \frac{DO420}{t \times v \times DO600}$$

t : temps d'incubation (minute)

v : volume = 0,1 mL x facteur de concentration (x5)

DO_{600} : DO de la culture initiale

DO_{420} : DO après réaction

II.6.c *Extraction protéique à partir de levure et analyse par western-blot*

Les protéines sont extraites à partir d'une quantité de culture de levures (en milieu –LW) dont la densité correspond à une absorbance à 600 nm de 4 unités. Le culot de culture est ensuite repris dans 100 µL d'un mix composé de tampon « Cracking » (10% SDS, 6 M Urée, 40 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 0,04% bleu de bromophénol), de cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich, dilution au 1/500), de DTT (dithiothréitol, 1/100) et de PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride, 1/100). Pendant 5 minutes, les tubes sont chauffés à 100°C et sont mis ensuite dans la glace. Ensuite, trois séries de sonication de 5 minutes chacune (30 secondes ON/ 1 minute OFF) sont effectuées à l'aide du Bioruptor® (Diagenode).

Vingt microlitres sont ensuite utilisés afin d'effectuer une séparation électrophorétique des protéines en gel polyacrylamide (gel de concentration : 4 % d'acrylamide-bisacrylamide [T 40% ; C 3,3%], 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS (m/v), 0,1% APS (Ammonium persulfate), 3 µL TEMED) / gel de séparation : 10% d'acrylamide-bisacrylamide [T 40% ; C 3,3%], 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS (m/v), 0,1% APS, 3,2 µL TEMED) à l'aide du système Mini-PROTEAN® 3 Electrophosis Cell (Bio-rad) dans des tampons de migration différents en fonction de la nature de l'électrode (Cathode 10X : 1M Tris, 1M Tricine, 1% SDS / Anode 10X pH 8,9 : 1M Tris, 35% HCl).

La présence de protéines de fusion est ensuite vérifiée par western-blot. Après séparation électrophorétique, les protéines sont transférées pendant 20 minutes (5 mA/cm2) sur membrane de PVDF (Millipore) trempée au préalable dans l'éthanol absolu, à l'aide de l'appareil de tranfert Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) et du tampon de transfert 1X (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20 % éthanol, 0,1% SDS ; pH 8,4). Les membranes sont ensuite saturées dans du PBS 1X (**P**hosphate **B**uffered **S**aline, 2,7 mM KCl, 140 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1,8 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4) additionné de 5% de lait ½ écrémé pendant 1 heure sous agitation douce, et incubées, pendant une nuit à 4°C sous agitation douce, avec les anticorps primaires : anti-Gal4 (anticorps de lapin anti-AD, Sigma-Aldrich, utilisés à une dilution de 1/2000 dans du PBS/Lait) et anti-LexA (anticorps de lapin anti-BD, Millipore, utilisés en dilution de 1/1000 dans du PBS/Lait).

Après 3 lavages de 5 minutes au PBS, les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire IgG de chèvre anti-lapin (Sigma-Aldrich, utilisés en dilution de 1/30000) pendant 1 heure à 4°C. La membrane a subi 3 nouveaux lavages au PBS et la présence d'anticorps secondaires, couplés à la phosphatase alcaline, est ensuite révélée par addition des réactifs BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphate) / NBT (bleu de nitrotetrazolium) en suivant les recommandations du fabricant (Promega).

II.7 Mesure d'interaction Protéine-Protéine par reconstitution de fluorophore (BiFC)

La technique du BiFC a été utilisée pour tester les interactions subcellulaires entre HK1-CP et les HPt (2, 7, 9), ces mêmes HPt et les RR-B (13, 16, 18, 19), mais aussi pour la capacité de la protéine RR13 et de son double mutant $RR13^{E123K-M105K}$ à dimériser. Les clonages ainsi que les plasmides utilisés sont présentés dans la section II.5.c. Cette technique étant compatible avec l'utilisation de marqueurs protéiques, permet également de localiser le compartiment subcellulaire dans lequel ont lieu les interactions. La technique du BiFC repose sur la reconstitution d'un fluorophore, ici l'YFP (**Y**ellow **F**luorescent **P**rotein), fonctionnel suite à l'interaction de protéines d'intérêt auxquelles est fusionnée l'une des deux parties du fluorophore. Les deux hémi YFP, YFP^N (aa 1 à 173) et YFP^C (aa 156 à 239) sont non fluorescentes et ne s'associent pas spontanément dans un système *in vivo*.

Les cellules C20A de *C. roseus* sont co-transformées par biolistique (section II.2.c) avec deux vecteurs, un codant la partie N-terminale de la YFP fusionnée à la protéine d'intérêt et un codant la partie C-terminale de la YFP fusionnée à l'autre protéine d'intérêt, mais également une construction permettant l'expression de marqueur protéique de compartiments cellulaires. Un marqueur nucléaire "nucleus CFP" (CFP ou Cyan Fluorescent Protein, protéine fluorescente bleue fusionnée avec une séquence de localisation nucléaire bipartite) a été utilisé et mis au point au BBV de Tours par G. Guirimand et V. Courdavault. Les cellules sont observées 15 heures après la transformation à l'aide d'un microscope optique à épifluorescence (Olympus®BX51) muni d'une caméra Olympus® DP50, d'un logiciel d'acquisition et d'analyse d'image $Cell^D$ Imaging (Soft Imaging System, Olympus), et de cubes de fluorescence destinés à l'observation des différents fluorochromes (TABLEAU 24)

Premièrement, l'efficacité de la co-transformation des cellules est estimée visuellement par observation de la totalité du tapis cellulaire au grossissement x4. Après le montage entre lame et lamelle des cellules co-transformées avec 100 µl de milieu de culture, une observation au

grossissement x40 est réalisée. Systématiquement, une observation en contraste interférentiel différentiel (DIC) est réalisée afin de visualiser la morphologie des cellules en champ clair.

Deuxièmement, la capture d'images numériques et leur traitement sont réalisés à l'aide du logiciel Cell^{D}. Pour une même cellule, les canaux de couleur des images sont séparés pour les différents fluorochromes. Ainsi, les signaux YFP et CFP sont traités dans les canaux vert et rouge respectivement. Une combinaison en une image recomposée des signaux YFP et CFP est également réalisée, et la couleur jaune utilisée permet de définir les zones de co-localisation des deux signaux initiaux. Les figures de fluorescence présentées sont représentatives de plusieurs dizaines de cellules observées.

TABLEAU 24 – Détails des cubes de fluorescence utilisés pour les différents fluorochromes

Fluorochromes	Cubes de fluorescence	Filtre d'excitation (nm)	Filtre d'émission (nm)
GFP	GFP (JP1, Chroma#31039	460-480	500-520 à bande passante
YFP	YFP (JP2, Chroma#31040)	500-520	540-580 à bande passante
CFP	CFP (Cyan GFP, Chroma#31044v2)	426-446	460-500 à bande passante
mCherry	Texas Red (Olympus U-MWIY2)	545-580	610 spectre large

II.8 Localisation subcellulaire des protéines

L'utilisation de techniques d'imagerie GFP ou YFP a permis d'étudier les localisations subcellulaires des protéines HK1, HPt (2 et 9) et RR-B (13, 16) dans les cellules de *C. roseus*. Les clonages ainsi que les plasmides utilisés sont présentés en section II.5.d. Les cellules C20A ont été co-transformées (section II.2.c) avec un vecteur codant la GFP ou la YFP fusionnée à la protéine d'intérêt et une construction permettant l'expression de marqueur protéique de compartiments cellulaires. Pour cette étude, plusieurs marqueurs ont été utilisés (mis au point par G. Guirimand et V. Courdavault) : un marqueur nucléaire « nuclear m-Cherry » (m-Cherry, protéine fluorescente rouge fusionnée avec la protéine GUS et à une séquence de localisation nucléaire bipartite), un marqueur nucléo-cytosolique « nucléocytosolique m-Cherry » (m-Cherry seule), un marqueur cytoplasmique « CFP-GUS-cytoplasme » (CFP fusionnée à la protéine GUS permettant une exclusion nucléaire), un marqueur de la membrane plasmique « AP-CFP(pm) » (CFP fusionnée à une aquaporine). De plus, une coloration de la paroi au calcofluore « Calco (cw) » a permis d'identifier la paroi cellulaire. Les cellules ont été observées 24 à 48 heures après la transformation et l'analyse s'effectue par imagerie à l'aide d'un microscope à épifluorescence comme décrit ci-dessus (section II.7, TABLEAU 24).

II.9 Expériences d'expression transitoire dans les cellules de *C. roseus*

La caractérisation fonctionnelle du RR13 dans les cellules de *C. roseus* a été réalisée en mesurant l'activité de l'enzyme codée par le gène rapporteur *Luc*, la luciférase, sous le contrôle du promoteur du *RR-A* d'*Arabidopsis*, *ARR6*. Les clonages ainsi que les plasmides utilisés sont présentés en section II.5.g. Les cellules C20D ont donc été co-transformées par biolistique (section II.2.c) par un vecteur effecteur permettant la surexpression de la protéine RR13 (pRT104 contenant promoteur 35S), par le vecteur rapporteur pARR6:LUC (ABRC) contenant le promoteur fonctionnel d'*ARR6*, et par un vecteur servant de contrôle interne d'efficacité de transformation, pUBI:GUS, permettant une fusion transcriptionnelle du promoteur ubiquitine avec le gène rapporteur *gus*. Les cellules ont été récupérées 24h après la transformation. A partir d'extrait de protéines totales, les activités enzymatiques de la ß-glucuronidase et de la luciférase ont été mesurées respectivement par fluorimétrie et par mesure de la luminescence.

II.9.a *Extraction protéique à partir de cellules de C. roseus*

Après récolte, les cellules sont été broyées avec une pincée de sable de Fontainebleau et 1 mL par mg de cellules de tampon CCLR (**C**ell **C**ulture **L**ysis **R**eagent : 25 mM Tris-phosphate, 2 mM EDTA pH 8, 2 mM DTT, 10% glycérol, 1% triton X-100 ; d'après le kit Luciférase assay system (Promega)). Après centrifugation des lysats (10 minutes, 12 000 rpm, 4°C), les surnageants contenant les protéines totales sont conservés à 4°C.

II.9.b *Dosage fluorimétrique*

Les extraits protéiques bruts (20 µL) ont été dilués dans le tampon CCLR (25 µL de tampon 1x). Les dilutions sont ensuite incubées en présence de 5 µL de MUG (4-méthylumbelliferyl-ß-D-glucuronide, 10 mM) à 37°C pendant 2 heures. Un témoin est réalisé avec 45 µL de tampon CCLR et 5 µL de MUG. Au terme de l'incubation 450 µL de Na_2CO_3 (0,2 M) sont ajoutés afin de stopper chaque réaction. La concentration du 4-Méthyl-Umbelliferone (4-MU) ainsi produit est mesurée à partir de 150 µL de ce mélange dilué dans 2,5 mL de Na_2CO_3 (0,2 M) par fluorimétrie (λEx = 365 nm ; λEm = 455 mm) à l'aide du spectrophotomètre à fluorescence (F-4500, Hitachi). L'activité relative de GUS est exprimée en quantité totale de MU (pmole) produite dans l'essai enzymatique, par mg de protéines totales et par minutes d'incubation (pmole/mg/min). Le gène *gus* étant sous contrôle du promoteur *ubiquitine*, la mesure de l'activité enzymatique constitue le contrôle interne.

II.9.c *Dosage de l'activité luciférase*

Les mesures sont réalisées à raison de 3 répétitions par échantillon à l'aide d'un luminomètre en plaque (Mithras LB940 piloté par le logiciel Mikro win 2000, Berthold). Vingt microlitres d'extrait protéique non dilué sont transférés dans un tube de luminomètre, et 50 µL d'une solution de LAR (**L**uciferase **A**ssay **R**eagent, Promega) contenant de la luciférine sont déposés. Le produit de la réaction enzymatique l'oxyluciférine émet une fluorescence qui est mesurée 10 secondes après ajout du substrat. La mesure d'une même condition est doublée. Le gène *luc* étant sous le contrôle du promoteur *ARR6*, la mesure de l'activité enzymatique reflète la capacité du RR-B à activer la transcription du gène rapporteur.

II.9.d *Détermination de la concentration en protéines*

A l'aide du kit Bio-Rad Protein Assay, le dosage des protéines est effectué selon la méthode de Bradford (1976). Une solution de BSA est utilisée afin de générer une courbe étalon.

II.10 Production et purification de protéines recombinantes

II.10.a *Expression des protéines RR13-GARP, RR13-DDK, RR13-DDK$^{E123\text{-}M105K}$, RR13-DDK^{E58K}*

II.10.a.1 *Culture bactérienne*

Les bactéries recombinantes BL21 sont cultivées dans un milieu 2YT (800 mL) (TABLEAU 10) contenant de l'ampicilline (50 µg/mL) et de la kanamycine (50 µg/mL) à 37°C jusqu'à obtention d'une absorbance à 600 nm comprise entre 0,6 et 1. L'induction des protéines de fusion est réalisée par ajout d'IPTG (0,5 mM) pendant 3 heures à 37°C. Le profil d'induction est analysé par SDS-PAGE avec un gel polyacrylamide de 14%. Les échantillons sont chargés sur gel à l'aide d'un tampon de charge (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 100 mM DTT, 2% SDS (m/v), 10% glycérol (v/v), 0,04% bleu de bromophénol). Après vérification du profil, les cultures bactériennes ont ensuite été culottées par centrifugation (10 minutes, 5 500 g).

II.10.a.2 *Lyse bactérienne*

Chaque culot (environ 4 g) a été resuspendu dans 28 mL de tampon de lyse hypotonique (50 mM Tris-HCl pH 8,2, 5 mM ß-mercaptoéthanol, 2 mM benzamidine) suivi de 3

congélations/décongélations successives provoquant un début de lyse mécanique. Après ajout de lysozyme (1 mg/mL), les culots sont incubés pendant 30 minutes à température ambiante, fragilisant ainsi la paroi bactérienne en digérant en partie les peptidoglycanes. L'échantillon est ensuite soniqué dans la glace en fusion à 4 reprises par 3 cycles de 30 secondes d'impulsions on/off (1 sec à une fréquence de 20 kHz à environ 60 watts).

Afin d'éviter des interactions non spécifiques de la protéine d'intérêt GST-RR13-GARP (hautement basique) avec les débris d'acides nucléiques, mais également pour la maintenir en solution, la force ionique est élevée à environ 1,6 M NaCl (ajout de 15 mL NaCl à 5M).

Les débris ont ensuite été culottés par centrifugation (40 minutes, 16 000 g, 4°C). La concentration en NaCl des surnageants concernant GST-RR13-GARP et 6xHIS-RR13-DDK (et ses mutants) est ramenée à 300 mM afin d'effectuer les chromatographies d'affinité.

II.10.b *Chromatographie d'affinité*

II.10.b.1 *Purification de la protéine 6xHIS-DDK (non muté et muté $DDK^{E123K-M105}$, DDK^{E58K})*

Le surnageant est filtré à 0,22 µm avant d'être passé à 1 mL/min sur colonne Ni-NTA (cartouche de 1mL, capacité de fixation 30 mg, GE-Healthcare) montée sur une Äkta-prime plus (GE-Healthcare Life Sciences) et pré-équilibrée avec un tampon dit "d'équilibration" contenant : 50 mM Tris-HCl à pH 7,4, 300 mM NaCl, 0,01 mM Benzamidine en présence de 10 mM imidazole sur l'entrée A. Une fois le tampon passé au travers de la colonne ("flow through"), un lavage est effectué avec la solution d'équilibration (entrée A), puis avec une solution de lavage (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 M NaCl, 0,01 mM Benzamidine, 10 mM imidazole) sur l'entrée B qui est utilisée afin de s'affranchir d'interactions non spécifiques de protéines annexes avec la phase *via* un gradient de NaCl. Le suivi est fait en direct avec les mesures de conductimétrie et d'absorbance à 280 nm représentées par des courbes rouges et bleues respectivement sur les chromatogrammes. Après avoir progressivement redescendu la concentration de NaCl à 300 mM du système, la colonne est retirée pour apprêter l'entrée B avec un tampon d'élution (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,01 mM Benzamidine, 400 mM imidazole). La cartouche est alors replacée et l'élution réalisée. Un pic d'élution témoigne du décrochage de la protéine d'intérêt.

II.10.b.2 *Purification de la protéine GST-GARP*

Le surnageant filtré (0,22 µm) est passé à 0,4 mL/min sur une colonne de Glutathion-Sépharose (cartouche de 1 mL, capacité de fixation 10 mg, GE-Healthcare) pré-équilibrée avec une solution d'équilibration (50 mM Tris-HCl pH 8,2, 300 mM NaCl, 1 mM

EDTA, 1 mM Benzamidine), montée sur une Äkta-prime plus (GE-Healthcare). Une fois l'échantillon passé, la colonne est lavée avec la solution d'équilibration, puis une solution de NaCl (1 M) est ajoutée afin de décrocher toute protéine en interaction non spécifique avec la phase ou la protéine d'intérêt. Un suivi identique au précédent est réalisé en direct avec les mesures de conductimétrie et d'absorbance à 280 nm. L'élution s'effectue dans une solution de Tris-HCl (10 mM, pH 8,2), de NaCl (150 mM), d'EDTA (1 mM), de Benzamidine (0,01 mM) et de Glutathion réduit (150 mM). Un pic d'élution témoigne du décrochage de la protéine d'intérêt. Un pic est également observé.

II.10.b.3 *Suivi des purifications et analyse de la pureté des protéines par SDS-PAGE*

Le suivi de purification (et le contrôle de la pureté) est effectué par analyse SDS-PAGE 14%. Après concentration, les échantillons ont été dosés par spectrophotométrie au NanoDrop® (ND 1000, Thermo Scientific) en utilisant les coefficients d'extinctions molaires respectifs obtenus avec Protparam tools (Expasy.ch).

II.11 Expériences de retard sur gel ou EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assays)

La capacité de la protéine recombinante GST-RR13-GARP à se fixer sur des sondes d'ADN possèdant des motifs de reconnaissance des RR-B (Sakai *et al.*, 2000) 5'-NGATT-3' ou 5'-NGATV-3' a été testée par des expériences de retard sur gel selon Huang & Wu (2004). Les deux sondes nucléotidiques, possédant ces motifs, ont été générées par PCR classique avec la GoTaq® en utilisant comme matrice la séquence du promoteur du gène *HMBPP synthase ou 4-hydroxy-3-méthylbut-2-enyl diphosphate synthase* (*hds*) de *C. roseus* et les couples d'amorces spécifiques (0,25 µM) (TABLEAU 24). Le programme PCR utilisé est le suivant : 1 cycle de 2 min à 94°C, suivi de 25 cycles de 20 sec à 94°C, 20 sec à 50°C, puis 25 sec à 72°C, et 1 cycle de 5 min à 72°C. Il a été montré que les sondes amplifiées à partir de ce promoteur sont reconnues par le domaine GARP d'un RR-B de *C. roseus*, le CrRR5 (Ginis *et al.*, 2012) homologue du RR13 de peuplier.

L'interaction ADN-protéine est testée par incubation de 100 ng de sonde testée en présence de 2 µg de protéines reprises dans un tampon Tris-HCl (50 mM, pH 8) en présence d'EDTA (1 mM), de KCl (150 mM) et de DTT (1 mM), à 25°C pendant 20 min. Les échantillons sont ensuite chargés avec du tampon de charge en condition non-dénaturante (0,04% bleu de bromophénol (m/v), 6% glycérol (v/v)) sur gel polyacrylamide 6% (Acrylamide-bisacrylamide [T 40% ; C 3,3%], 89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA, 0,07% APS (m/v), 0,3% TEMED (v/v)). La migration a été effectuée pendant 2 heures 45 à 70 V dans du tampon de migration TBE 1X (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA). Le gel est ensuite incubé pendant 30 minutes dans une solution de BET (1 µg/mL) afin de visualiser les

acides nucléiques. La présence des protéines est vérifiée par coloration d'une heure au bleu de Coomassie (0,1% bleu de Coomassie G-250 (m/v), 20% éthanol (v/v), 10% acide acétique (v/v)). La décoloration est réalisée par lavages successifs dans une solution de décoloration (20% éthanol (v/v), 10% acide acétique (v/v)).

TABLEAU 25 – Séquences des amorces utilisées et des sondes ADN

Sondes	Amorces	Séquences 5'-3'	Tm	Séquences amplifiées 5'-3'
AV0	prbhAvi0S prbhAvi0AS	GCAAGAACAGCCAACGTTAA AAGCCCCGAACTACAGAAGAG	50°C	GCAAGAACAGCCAACGTTAACAACTTAAATGG AATTTGCATGACCACTAATATTAGAGATGAAAA CAAAAAGATGTTGGAAATCGTAATTTGTCGTCT CTTCTGTAGTTCGGGGCTT
AV2	Hssi2S Hssi2AS	CTGCGAATTTGATGGAATTGACC AAGAACCCATGAACTTCGTC	50°C	CTGCGAATTTGATGGAATTGACCTCAATTCTTG ATGCATGATTGAGTTTTGAATTGTCATTTTTTGA CGAAGTTCATGGGTTCTT

5'-NGATT-3', 5'-NGATV-3'

II.12 Expériences de "GST ou 6xHis pull-down"

Les interactions des protéines recombinantes précédemment produites et purifiées, GST-RR13-GARP, 6xHIS-RR13-DDK, 6xHIS-DDK$^{E123K-M105K}$ et 6xHIS-DDK^{E58K} ont été testées *in vitro* par des expériences de "GST ou 6xHIS pull-down".

Un premier test d'interaction a été réalisé pour déterminer les capacités de liaison du domaine DDK avec le domaine GARP. Les phases de sépharose-glutathion (SG) et de Ni-NTA (Nickel chélaté par de l'acide nitrilo-triacétique) ont été dans un premier temps lavées après centrifugation (4 minutes, 4°C, 500 g) de 200 µL de chacune des deux phases (4 tubes), par 800 µL de tampon PBS 1X (pH 7,5). Après centrifugation (4 minutes, 4°C, 500 g), 100 µL (5 mg/mL) de chaque protéine ont été ajoutées : phase SG / DDK et phase Ni-NTA / GARP (contrôles négatifs), phase SG / GARP et phase Ni-NTA / DDK, complété par 700 µL de PBS 1X. Ces tubes ont été agités pendant 30 minutes sous agitation douce à 4°C. Après centrifugation (4 minutes, 4°C, 500 g), le surnageant a été enlevé et le culot a été lavé avec 700 µL de PBS 1X. Une nouvelle centrifugation a été réalisée (5 minutes, 4°C, 500 g), et les surnageants ont été recupérés et testés sur gel (dépôts 1 à 4). Afin de tester l'interaction la deuxième protéine d'intérêt a été ajoutée (100 µL, 5 mg/mL) dans chaque tube avec 700 µL de PBS 1X : phase SG / GARP / DDK et phase Ni-NTA / DDK /GARP. Après agitation douce des tubes pendant 30 minutes à 4°C, une centrifugation a été réalisée (5 minutes, 4°C, 500 g), et les surnageants ont été récupérés et testées sur gel (dépôts 5 et 6). A cette étape, les phases ont également été testées sur gel (dépôts 7 et 8). L'élution a été réalisée avec 200 µL de glutathion (20 mM, pH 8) et 200 µL

d'imidazole (400 mM, pH 8) respectivement. Des aliquotes d'élution ont été prélevées et testées sur gel (dépôts 9 et 10). Les échantillons ont ensuite migré dans un gel polyacrylamide 14%.

Un deuxième test "GST pull-down", permettant d'évaluer qualitativement l'interaction putative du domaine GARP avec les deux formes mutées du domaine DDK, a été réalisé à partir des différents échantillons de protéines prépurifiés (GST-RR13-GARP, 6xHIS-RR13-DDK$^{E123K-M105K}$, 6xHIS-RR13-DDK^{E58K}). La composition du tampon utilisé pour réaliser ces différents tests est la suivante : 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM DTT. La forme fusion GST a d'abord été immobilisée sur 100 µL de phase équilibrée avec le tampon. L'opération de fixation par affinité a été réalisée sous agitation à 8°C pendant une heure (sur une roue). Passé ce délai, la phase a été culottée par centrifugation (5 minutes, 500 g, 4°C). Le surnageant correspondant au "Flow Through" a été mis de côté et aliquoté (dépôt de 5 µL sur gel) pour contrôle sur SDS-PAGE. Deux lavages successifs ont été ensuite réalisés avec le même tampon (l'interaction attendue étant prédite comme étant due majoritairement à des interactions électrostatiques, la force ionique n'a pas été changée lors des lavages) sous agitation deux fois à 8°C pendant 30 minutes et contrôlés sur SDS-PAGE. La phase a été à chaque étape reculottée comme précédemment (5 minutes, 500 g, 4°C). Une solution contenant 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM DTT et 80 mM glutathion réduit a été utilisée pour décrocher par compétition la fusion GST-GARP du support. La phase est restée en contact avec le tampon sous agitation pendant une heure à 8°C. Les élutions ont été récupérées par centrifugation (5 minutes, 500 g, 4°C). Les tests d'interaction potentielle ont été comparés et analysés sur SDS-PAGE.

II.13 Dichroïsme circulaire

Les mesures de dichroïsme circulaire (CD) ont été enregistrées sur un spectromètre Jasco J810 (Jasco international) dans une cuve en quartz QS de 1 mm de trajet optique. La plage de longueurs d'ondes parcourue s'étend de 260 nm et à 185 nm. Les enregistrements ont consisté en 4 acquisitions successives avec un pas de 1 nm sur 0,5 secondes par point. Les solutions ont été dialysées par dilution/concentration pour échanger le tampon de conditionnement (Tris-HCl, NaCl, ß-mercaptoéthanol) avec un plus transparent dans l'UV lointain : le NaCl a été remplacé par du florure de sodium (NaF, 150 mM) et le Tris-HCl par du phosphate (20 mM, pH 7,2). Les données ont été retraitées par la suite avec le logiciel pro-Data Viewer d'AppliedPhotophysics pour soustraire la ligne de base obtenue avec le tampon de référence et normaliser les spectres. Les spectres ont été analysés sur Dichroweb pour prédire la proposition de structuration des protéines observées.

II.14 Analyse phylogénétique

Une analyse phylogénétique a été menée afin de valider dans un premier temps si les séquences obtenues pour l'ensemble des RR-B de peuplier sont bien des représentants de cette famille de RR, puis de replacer phylogénétiquement l'ensemble de ces protéines au sein d'autres RR-B déjà identifiés de différentes espèces de plantes clés.

Pour réaliser cette étude, les séquences entières des protéines RR-B de peuplier, d'*Arabidospis*, du riz *Oryza sativa,* du maïs *Zea mays* et du soja *Glycine max* (numéros d'accession : TABLEAU S2 CHAPITRE 3) ont été utilisées. Seules les séquences de RR-B contenant le domaine receveur typique (DDK) des RR-B et le domaine GARP de fixation à l'ADN ont été prises en compte. Toutes ces séquences d'acides aminés ont ainsi été alignées à l'aide de MUSCLE (Edgar, 2004) intégré dans le logiciel Mega5 (Tamura *et al.,* 2011). La reconstruction d'arbres phylogénétiques basée sur la méthode du maximum de vraisemblance a ensuite été réalisée avec Mega5 en appliquant le modèle Jones-Taylor-Thornton (JTT) (Jones *et al.,* 1992). La robustesse de l'arbre phylogénétique a été testée avec des techniques de bootstrap (1000 répétitions). La séquence RR de type-C d'*Arabidopsis* ARR22 (EMBL : AT3G04280.1) a été utilisée comme groupe extérieur.

II.15 Analyses statistiques

Le traitement des données ainsi que les tests statistiques ont été réalisés par le logiciel SPPS 11.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Pour chaque variable, la distribution normale a été testée par un test Shapiro-Wilk. Les moyennes, données avec leurs erreurs standards, sont comparées, en fonction des études, par un test STUDENT (ou test-t) ou une ANOVA suivie d'un test Scheffe. L'ensemble des tests est considéré comme significatif avec une P value < 0,05.

Partie I

Identification des partenaires de HK1 dans la transduction du signal de la contrainte osmotique

Chez de nombreuses plantes, les réseaux d'interactions qui mettent en relation des membres du phosphorelais multiple impliqué dans la voie de signalisation "osmosensing" sont actuellement mal connus.

Au sein de cette première partie, nous nous sommes intéressés à l'identification des partenaires agissant en aval de HK1 pouvant jouer un rôle dans la réponse du peuplier face aux contraintes osmotiques et hydriques.

Dans un premier temps, après la caractérisation fonctionnelle de HK1 comme osmosenseur, nous nous sommes focalisés sur la recherche d'interacteurs de HK1 parmi les membres HPt. Les résultats ont fait l'objet de l'Article I intitulé : "Characterisation of histidine-aspartate kinase HK1 and identification of histidine phosphotransfer proteins as potential partners in a *Populus* multistep phosphorelay" présenté dans le chapitre I.

Le partenariat interactionnel HK1/HPt préférentiel observé a été validé *in planta,* et a fait l'objet de l'Article II intitulé : "*In planta* validation of HK1 homodimerization and recruitment of preferential HPt downstream partners involved in poplar multistep phosphorelay systems" présenté dans le chapitre II.

Dans un deuxième temps, la recherche de régulateurs de réponse de type-B partenaires des protéines HPt mises en lumière précédemment comme étant des interacteurs de HK1 a également été menée. Les résultats ont fait l'objet de l'Article III intitulé : "Identification of five B-type response regulators as members of the multistep phosphorelay system interacting with histidine-containing phosphotransfer partners of *Populus* osmosensor" présenté dans le chapitre III.

L'existence d'un réseau d'interaction de protéines en aval de HK1 pouvant être éventuellement impliqué dans la transduction du signal de la contrainte osmotique a donc été avancé.

Chapitre I

Caractérisation fonctionnelle de HK1 et Recherche d'interacteurs spécifiques parmi les membres de la famille HPt

I. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE

Chez le peuplier, l'identification préalable d'une histidine-aspartate kinase, HK1, et de trois protéines HPt, HPt1, 2 et 3, ainsi que la mise en évidence de l'interaction entre HK1 et HPt2 a conduit à spéculer sur l'existence et l'implication d'un phosphorelais multiple dans la perception et la transduction du signal stress osmotique chez cet arbre (Chefdor *et al.*, 2006).

Dans le cadre de ce premier article, nous nous sommes focalisés sur les deux premiers protagonistes qui prennent potentiellement part à cette voie de signalisation. Ce travail présente deux objectifs majeurs.

Premièrement, à la suite de l'isolement de HK1 il convenait de caractériser fonctionnellement cette protéine, ce qui revenait à répondre à plusieurs questions parmi lesquelles :

- HK1 possède-t-elle les caractéristiques communes aux HK, à savoir une activité histidine kinase et la capacité de dimériser requise pour cette activité ?
- HK1 est-elle un osmosenseur ?
- La localisation cellulaire de HK1 est-elle en accord avec cette fonction potentielle ?

Deuxièmement, la recherche de la totalité des protéines HPt nous a mené à nous poser plusieurs interrogations à savoir :

- Ces protéines HPt interagissent-elles toutes de manière identique avec HK1 ?
- Quel est le rôle de la phosphorylation dans cette interaction ?

Ce travail avait donc comme second objectif de caractériser les interactions des HPt avec la protéine HK1.

II. PRINCIPAUX RÉSULTATS

La capacité de HK1 à homodimériser a été montrée par l'utilisation du système double-hybride dans la levure. Seule la partie cytoplasmique de HK1 (HK1-CP) a été testée dans cette étude étant donné que l'utilisation de protéine membranaire est incompatible avec le système doublehybride utilisé. En effet, dans ce système, les interactions entre les protéines testées sont ciblées dans le noyau des cellules.

De plus, des expériences de complémentation fonctionnelle de la souche mutée *sln1*Δ *sho1*Δ dépourvue de leurs propres osmosenseurs (Sln1p, Sho1p), ont permis de démontrer d'une part qu'HK1 possède bien une activité histidine kinase. En effet, les formes mutantes de HK1, générées par substitution du résidu histidine conservé dans le domaine donneur, ne sont pas capables de complémenter le phénotype létal de la souche mutée en conditions normales de croissance. D'autre part, en condition de stress osmotique (NaCl, 0,9 M), la capacité de HK1 à complémenter les

fonctions d'osmosenseur de Sln1p et Sho1p par activation de la voie HOG a également été démontrée dans la levure. Sa localisation membranaire *in planta* a été visualisée et corrobore cette fonction putative d'osmosenseur au sein de la cellule.

Concernant les HPt, sept nouveaux ADNc ont été isolés amenant à considérer un total de 10 HPt différentes chez le peuplier. Une étude complète d'interaction entre l'ensemble des HPt et HK1-CP a été menée par utilisation du système double-hydride. La totalité des HPt (à l'exception d'HPt8) est capable d'interagir avec HK1. Cependant, des différences quant à leur intensité d'interaction, reflétées par le niveau d'activation d'un gène rapporteur (ß-galactosidase), ont été mises en évidence, dégageant ainsi cinq HPt, HPt2, 6, 7, 9 et 10. Afin de valider *in planta* la pertinence de ces interactions, une analyse de co-expression des transcrits des gènes codant ces partenaires potentiels, HK1 et ces cinq HPt, a été réalisée révélant que seulement trois HPt (HPt2, 7 et 9) sont co-exprimées avec HK1 dans les quatre organes étudiés.

Ce résultat mène donc à l'hypothèse de l'existence d'un partenariat d'interactions préférentielles entre HK1 et HPt2, 7 et 9 *in planta*.

En outre, l'importance de l'état de phosphorylation de HK1 dans ces interactions HK1/HPt a également été montrée par tests d'interaction en levure en utilisant des formes mutées de HK1 au niveau du résidu aspartate receveur de phosphate (D/E et D/N), suggérant que ces interactions sont moins importantes lorsque HK1 est phosphorylée.

L'ensemble de ce travail est présenté dans l'ARTICLE I. Ma contribution dans ce travail a consisté à réaliser les études de localisation de HK1 et de co-expression des transcrits HK1/HPt.

ARTICLE I

Characterisation of histidine-aspartate kinase HK1 and identification of histidine phosphotranfer proteins as potential partners in a *Populus* multistep phosphorelay

Publié dans Physiologia Plantarum (149:188-199) : F. Héricourt, F. Chefdor, L. Bertheau, M. Tanigawa, T. Maeda, G. Guirimand, V. Courdavault, M. Larcher, C. Depierreux, H. Bénédetti, D. Morabito, F. Brignolas, S. Carpin (2013)

Physiologia Plantarum
An International Journal for Plant Biology

Physiologia Plantarum 149: 188–199. 2013
© 2013 Scandinavian Plant Physiology Society, ISSN 0031-9317

Characterization of histidine-aspartate kinase HK1 and identification of histidine phosphotransfer proteins as potential partners in a *Populus* multistep phosphorelay

François Héricourt[a,b,†], Françoise Chefdor[a,b,†], Lucie Bertheau[a,b], Mirai Tanigawa[c], Tatsuya Maeda[c], Grégory Guirimand[d], Vincent Courdavault[d], Mélanie Larcher[a,b], Christiane Depierreux[a,b], Hélène Bénédetti[e], Domenico Morabito[a,b], Franck Brignolas[a,b] and Sabine Carpin[a,b,*]

[a] Université d'Orléans, UPRES EA 1207, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures (LBLGC), 45067 Orléans Cedex 2, France
[b] INRA, USC1328, Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales (ARCHE), 45067 Orléans Cedex 2, France
[c] Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, 113-0032 Tokyo, Japan
[d] Université François Rabelais de Tours, EA 2106, Biomolécules et Biotechnologies Végétales (BBV), 37200 Tours, France
[e] Centre de Biophysique Moléculaire, 45071 Orléans Cedex 2, France

Correspondence
*Corresponding author,
e-mail: sabine.carpin@univ-orleans.fr

Received 2 October 2012;
revised 18 December 2012

doi:10.1111/ppl.12024

In poplar, we identified proteins homologous to yeast proteins involved in osmosensing multistep phosphorelay Sln1p-Ypd1p-Ssk1p. This finding led us to speculate that *Populus* cells could sense osmotic stress by a similar mechanism. This study focuses on first and second protagonists of this possible pathway: a histidine-aspartate kinase (HK1), putative osmosensor and histidine phosphotransfer proteins (HPt1 to 10), potential partners of this HK. Characterization of HK1 showed its ability to homodimerize in two-hybrid tests and to act as an osmosensor with a kinase activity in yeast, by functional complementation of *sln1*Δ *sho1*Δ strain. Moreover, in plant cells, plasma membrane localization of HK1 is shown. Further analysis on HPts allowed us to isolate seven new cDNAs, leading to a total of 10 different HPts identified in poplar. Interaction tests showed that almost all HPts can interact with HK1, but two of them exhibit stronger interactions, suggesting a preferential partnership in poplar. The importance of the phosphorylation status in these interactions has been investigated with two-hybrid tests carried out with mutated HK1 forms. Finally, in planta co-expression analysis of genes encoding these potential partners revealed that only three HPts are co-expressed with HK1 in different poplar organs. This result reinforces the hypothesis of a partnership between HK1 and these three preferential HPts in planta. Taken together, these results shed some light on proteins partnerships that could be involved in the osmosensing pathway in *Populus*.

Abbreviations – CP, cytoplasmic part; HK, histidine-aspartate kinase; HOG, high-osmolarity glycerol response; HPt, histidine phosphotransfer protein; −LW, leucine-tryptophan lacking medium; −LWH, leucine-tryptophan-histidine lacking medium; MAPK, mitogen activated protein kinase; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; PEG, polyethylene glycol; PVDF, polyvinylidene difluoride; RD, receiver domain; TD, transmitter domain; YFP, yellow fluorescent protein.

[†] These authors equally contributed to this work.

Introduction

Water deficit is one of the most important environmental stresses affecting plant growth. At cellular level, this stress generally leads to an increase in osmotic potential (Bray 1997). Although there have been numerous studies of genes induced by water deficit and osmotic stress, the understanding of plant osmosensing pathway is still very limited. In *Saccharomyces cerevisiae*, osmosensing involves two osmosensors, Sln1p and Sho1p, which are specialized in detecting modifications of the external osmotic pressure, with a preponderant role for Sln1p. This protein is a histidine-aspartate kinase (HK) receptor involved in a multistep phosphorelay system, with functionality dependent on its dimerization (Tao et al. 2002). Under normal osmotic conditions, i.e. physiological conditions for yeast growth, Sln1p autophosphorylates and transfers the phosphoryl group to its own C-terminal receiver domain (RD). This phosphoryl group is then transferred to Ypd1p and finally to Ssk1p, leading to the inactivation of the HOG (high-osmolarity glycerol response) MAP kinase pathway. On the other hand, under high-osmolarity conditions, Sln1p is inactive and the HOG MAP kinase cascade is active (Maeda et al. 1994, Posas et al. 1996, Lu et al. 2003). Activated Hog1p is essential for survival of yeast cells under high osmolarity. However, under normal osmolarity conditions, *Sln1* deletion leads to a lethal increase of phosphorylated Hog1p (Maeda et al. 1994). This lethality is suppressed by overexpression of the phosphotyrosine phosphatase Ptp2p which dephosphorylates Hog1p (Jacoby et al. 1997, Wurgler-Murphy et al. 1997).

In *Arabidopsis thaliana*, the osmosensing pathway seems to involve AHK1 which belongs to the HK family (Urao et al. 1999). This HK has the capacity to replace the function of Sln1p in yeast and could act as a positive regulator in osmotic stress signaling (Tran et al. 2007, Wohlbach et al. 2008). It also has been demonstrated that AHK1 interacts with AHP2 and that the RD alone is able to retain interaction with this histidine phosphotransfer protein (HPt) (Urao et al. 2000). The *Arabidopsis* genome encodes five authentic HPts (AHP1 to AHP5, Suzuki et al. 2000) and at least four of them are able to interact with HK receptors involved in different signaling pathways (Urao et al. 2000, Dortay et al. 2006, Pekárová et al. 2011). In *Zea mays*, three HPts have been characterized (Asakura et al. 2003). More recently, genome-wide analyses revealed that only 2 authentic HPts are present in *Oryza sativa* (Ito and Kurata 2006, Pareek et al. 2006, Du et al. 2007), 4 in *Lotus japonicus* (Ishida et al. 2009) and 10 in *Glycine max* (Mochida et al. 2010). However, no information is available about interaction between these HPts and potential osmosensor in these plants.

In *Populus*, a protein homologous to AHK1, HK1, has been identified (Chefdor et al. 2006). Four cDNAs encoding HPts (HPt1, HPt2, HPt3a and HPt3b) have been characterized and an interaction between HK1 and HPt2, but not between HK1 and HPt1, was shown by a yeast two-hybrid analysis. The RD of HK1 was demonstrated to be sufficient for this interaction (Chefdor et al. 2006).

In this work, homodimerization of the cytoplasmic part (CP) of HK1 using two-hybrid assays and functional complementation of *sln1*Δ *sho1*Δ yeast deletion mutant with full-length HK1 in normal and in high-osmolarity conditions are shown, establishing that this protein can function as a HK and as an osmosensor. This result is confirmed by the inability of HK1 mutants to complement *sln1*Δ *sho1*Δ yeast in normal growth conditions. The HK1 capacity to activate the HOG MAPK (mitogen-activated protein kinase) cascade as does Sln1p with the Hog1p phosphorylation in stress condition confirms this osmosensor function in yeast. Also in favor of an osmosensor function, the plasma membrane localization of HK1 in plant cells has been established.

Beside this HK1 characterization, the identification of seven new poplar sequences encoding HPts (HPt4 to HPt10) is described. Using a measurable yeast two-hybrid system, all 10 HPts were tested and interaction previously observed was confirmed and new ones were revealed. This quantitative approach highlighted that five HPts interact significantly with HK1, and that among them, HPt2 and HPt9 were predominant interacting partners of HK1. Moreover, in order to understand the effect of HK1 phosphorylation on the HPt interaction, mutated HK1-RD forms affecting the putative phospho-accepting aspartate residue were realized and tested for interaction with HPt2. The results showed the importance of the Asp residue phosphorylation in this interaction. Finally, for the five interacting HPts and HK1, gene expression in *Populus* was monitored in four different organs, in normal and hyperosmotic conditions. This analysis showed a co-expression for *HK1* and *HPt2*, *HPt7* and *HPt9* in all organs and conditions tested, reinforcing a possibility of interaction between these proteins in planta.

Materials and methods

Isolation of HPt cDNAs

Polymerase chain reactions (PCRs) were performed with an iCycler (BioRad, Hercules, CA) using primers at a final concentration of 0.2 μM and Taq Advantage polymerase (Clontech, Montain View, CA). HPt5 was isolated as described in Chefdor et al. (2006). To identify gene models corresponding to *HPt* cDNAs, we made an Advanced Search for HPts in JGI *Populus trichocarpa*

(v1.1). We compared the deduced protein sequences with our five HPts using CLUSTALW, selected new ones and designed specific primers for each cDNA. PCRs were performed using *Populus deltoides* (Bartr.) Marsh × *Populus nigra* L. Dorskamp roots cDNAs library, leaves or petioles cDNAs.

Amino acid sequences of all poplar HPts were aligned with authentic HPts of *A. thaliana*, *Z. mays*, *O. sativa* and *G. max* by CLUSTALW and the alignment was represented by a phylogram constructed with the neighbor-joining method in the phylogenetic software MEGA5 (v 5.05).

Yeast two-hybrid tests

The two-hybrid assays were performed using a LexA DNA-binding domain encoding bait vector (pBTM116 referred as pLex) and a Gal4 activation domain encoding prey vector (pGADT7; Clontech). The *HK1* CP sequence (amino acids 490–1249), transmitter domain (TD) sequence (amino acids 490–1088) and RD (amino acids 1089–1249) were cloned into pLex vector as *Eco*RI-*Sal*I fragments and into pGAD vector as *Eco*RI-*Xho*I fragments derived from PCR-amplified pGEMT-HK1 clone. HPts CDS were cloned into the pGAD vector as *Eco*RI-*Xho*I (HPt1, HPt2 and HPt4), *Xma*I-*Xho*I (HPt5) or *Eco*RI-*Bam*HI (HPt3 and HPt6 to HPt10) fragments derived from PCR-amplified pGEMT-HPt clones. Mutations in HK1-RD were introduced directly into the two-hybrid constructs by PCR according to manufacturer's protocol (Phusion site-directed mutagenesis kit; Finnzymes, ThermoScientific, Waltham, MA).

The yeast strain L40D (*MATa ade2-101 his3-200 leu2-3,112 trp1-901 ura3-52 LYS2::(lexA op)x4-HIS3 URA3::(lexA op)x8-lacZ gal4*) was used for transformations according to Gietz and Schiestl (1995). Co-transformed yeasts were selected onto leucine-tryptophan lacking medium (−LW) for 4 days at 30°C and streaked onto leucine-tryptophan-histidine lacking medium (−LWH) for 4 days at 30°C. Due to weak autoactivation of hybrid proteins, −LWH medium was supplemented with 5 m*M* of 3-amino-1,2,4-triazole (3AT). X-Gal assays were performed according to Fromont-Racine et al. (1997). The blue color was allowed to appear for 3–5 h at 30°C. Interactions were tested using two different reporter genes (HIS3 and LacZ) and all interactions were tested at least twice.

Quantitative β-galactosidase assay

Yeast colonies grown onto −LW medium were suspended into Z buffer at an OD_{600} between 0.5 and 0.8 and concentrated in a final volume of 300 µl. Cells were lysed by three cycles of liquid nitrogen/37°C incubations and 100 µl was used for triplicate tests. Two hundred microliters of *ortho*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG, 4 mg ml^{-1}) into Z buffer were added to the cells and the reaction was incubated at 37°C for 20 min, then stopped with 200 µl of 1 *M* Na_2CO_3. Three hundred microliters of supernatant was transferred into a microplate for OD_{420} reading. Units of β-galactosidase were expressed as Miller units. For each interaction test, a minimum of four independent clones were used. The significant difference from interaction background control (pGAD vector) or wild-type RD of HK1 (RD wt) was estimated with a *U*-test of Mann–Whitney using the R statistical software (v 2.6.1).

Complementation analysis of the *sln1*Δ *sho1*Δ deletion mutant MH179

The full coding sequence of the *Populus* HK1 was amplified by PCR as *Nco*I-*Xho*I fragment and inserted into pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI). Then HK1 cDNA was cloned into the pYX212 vector (pYX-HK1) as *Nco*I-*Xho*I fragment for constitutive expression, with the *URA3* gene as selection marker.

Mutations in HK1 donor and RDs (H514Q and D1176N, respectively) were introduced by PCR from a pGEMT-HK1 clone, according to manufacturer's protocol (Phusion site-directed mutagenesis kit; Finnzymes). Mutated *HK1* sequences were then cloned into pYX212 (pYX-$HK1^{H514Q}$ and pYX-$HK1^{D1176N}$). The pPD2133 plasmid expressing the Sln1p osmosensor was used as positive control (pPD-Sln1). The yeast strain MH179 (*ura3 leu2 his3 sln1::LEU2 sho1::TRP1* + pGP22, with pGP22: *GALp-PTP2/pRS413 (HIS3, CEN)*) was used for transformation. Yeast cells were grown on galactose-containing medium lacking uracil (SG-Ura) for transformation control and streaked onto SD-Ura medium in presence or absence of 0.9 *M* NaCl for 4 days at 30°C for osmosensing complementation tests.

Western analysis of osmo-responsive Hog1 activation

The MH179 strain was transformed with either pYX-HK1 or pPD-Sln1. The transformants were precultured in the galactose-containing SG-Ura-His medium overnight, diluted into the glucose-containing SC-Ura medium and then cultured to mid-log phase at 30°C. For osmotic stress treatment, cells were treated with 0.4 *M* KCl for 5 min. Then cells treated with trichloroacetic acid (final 6% v/v) were collected by centrifugation and washed with 70% ethanol. The cell pellets were suspended in urea buffer [50 m*M* Tris–HCl pH 7.5, 5 m*M* EDTA, 6 *M* urea, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 50 m*M*

NaF, 1 m*M* PMSF] and disrupted with glass beads. Obtained cell lysates were incubated at 65°C for 10 min, cleared by centrifugation, mixed with Laemmli SDS sample buffer and then subjected to SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins transferred onto polyvinylidéne difluoride (PVDF) membrane were immunoblotted with anti-phospho-p38 antibody D3F9 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) plus horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG (NA934; GE Healthcare, Little Chalfont, UK) or anti-Hog1 antibody yC-20 (Santa Cruz Biotechnology) plus HRP-conjugated anti-goat IgG (sc-2020; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TE) and developed with ECL Plus (GE Healthcare).

HK1 subcellular localization

To express the HK1-YFP (yellow fluorescent protein) fusion protein, the full coding sequence of HK1 was amplified by PCR and cloned into the *Spe*I restriction site of the pSCA-cassette YFPi plasmid (Guirimand et al. 2009). Transient transformation of *Catharanthus roseus* cells by particle bombardment and YFP imaging were performed according to Guirimand et al. (2009), using the plasma membrane AP-CFP marker (CD3-1002) obtained from the ABRC (www.arabidopsis.org), the cytoplasm CFP-GUS marker and the procedure of cell wall staining using calcofluor was carried out as previously described (Guirimand et al. 2010).

Expression of HK1 and HPt genes

Cuttings of *P. deltoides* (Bartr.) Marsh × *P. nigra* L., clone Dorskamp, grown in hydroponic conditions were used. After cuttings collect for control conditions, osmotic stress was imposed to poplars by supplementing the medium with polyethylene glycol (PEG) 6000 at 50 g l^{-1} during 10 min. Roots, stems, petioles and leaves were then harvested and frozen in liquid nitrogen. Total RNAs were extracted using the NucleoSpin® RNA Plant mini kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to manufacturer's protocol, and reverse transcription was done with M-MuLV Reverse Transcriptase RNase H- (Finnzyme) using 1 µg of RNAs. Specific *HK1* or *HPt* primers were used at 0.2 µ*M* for amplification of 1 µl of cDNAs by PCR (30 or 40 cycles). *Clathrin* cDNA expression was used as amplification control and PCRs were done in triplicate, using cDNAs from three biological experiments.

Results

HK1 dimerization

To test the ability of HK1 to form homodimers, the interaction of HK1-CP with itself and also with the TD or RD was tested in a two-hybrid assay (Fig. 1A). All co-transformed cells were able to grow on non-selective

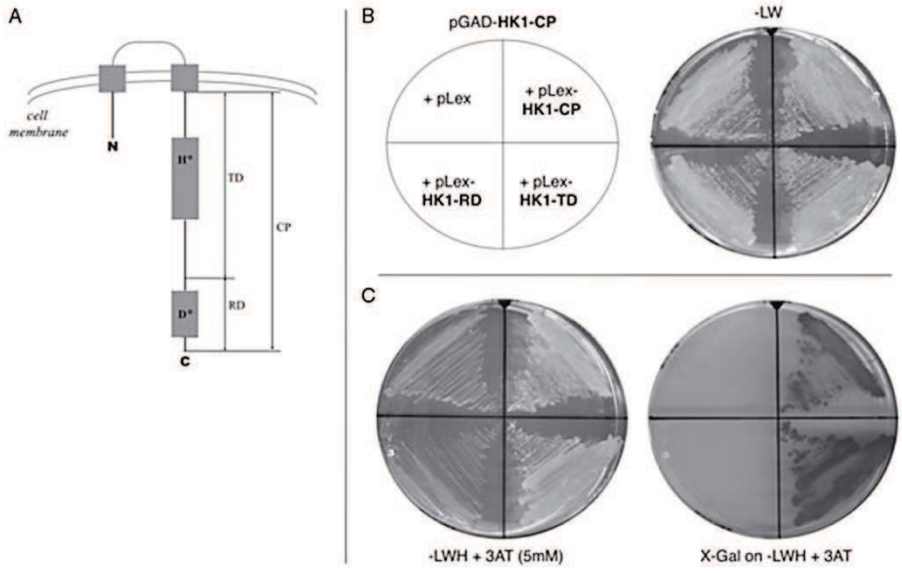


Fig. 1. Homodimerization of HK1. (A) Schematic representation of different HK1 parts used in this work. TD, transmitter domain; RD, receiver domain; CP, cytoplasmic part. H*, D*: histidine and aspartate residues mutated in this work (H514Q, D1176E/D1176N). (B) Two-hybrid interaction tests: HK1-CP was tested with different domains of the cytoplasmic part of HK1 as indicated. (C) Transformed yeasts were streaked onto selective medium supplemented with 5 m*M* 3AT (−LWH + 3AT) for growth test and X-Gal test.

medium (–LW, Fig. 1B). In selective conditions, the growth observed on histidine-lacking medium (–LWH) and strong color observed in the X-Gal test indicated that HK1-CP was able to self-interact (Fig. 1C). Moreover, interaction tests performed with the HK1-TD and –RD revealed that only TD was necessary for this interaction since no growth was observed in –LWH medium when RD alone was used (Fig. 1C). The same results were obtained when TD and RD were expressed using two-hybrid plasmid constructs in the opposite configuration (data not shown). These results showed that HK1 was able to form homodimers which imply the TD.

High-osmolarity tolerance of a *sln1*Δ *sho1*Δ deletion mutant expressing HK1

To show an osmosensor function of HK1 in yeast, a *S. cerevisiae sln1*Δ *sho1*Δ deletion mutant strain (MH179) was transformed with plasmids carrying the wild-type HK1 cDNA (pYX-HK1) or mutated HK1 cDNAs (pYX-HK1^{H514Q} or pYX-HK1^{D1176N}). The substitution of donor histidine residue or receiver aspartate residue of HK1 by a glutamine or an asparagine, respectively, impairs all possibilities of phosphorylation of HK1. These transformants were tested for their capacity to grow on normal or high-osmolarity medium. In parallel, the MH179 strain was transformed with a plasmid carrying the *SLN1* cDNA (pPD-Sln1) and with the empty pYX212 vector as positive and negative controls, respectively (Fig. 2A). In this strain, *PTP2* expression under the control of an inducible galactose promoter, allowed survival of all transformants on galactose medium (SG-Ura, Fig. 2B). On glucose medium (SD-Ura), HK1 and Sln1p expressing yeasts exhibited normal growth whereas cells transformed with the empty vector or with vectors carrying mutated *HK1* had very limited growth (Fig. 2C). This result indicated that wild-type HK1 was able to functionally replace Sln1p in yeast. On the other hand, when HK1 phosphorylation was abolished into the transmitter or RD, HK1 failed to complement the *sln1*Δ *sho1*Δ strain (Fig. 2C). These results showed that HK1 functions as a HK under normal osmotic conditions and that this function was necessary for the complementation and recovery of the lethal phenotype of the *sln1*Δ *sho1*Δ yeast strain. When transformed cells were streaked on the same medium, but in presence of 0.9 *M* NaCl, only Sln1p and wild-type HK1 expressing yeasts were able to grow (Fig. 2D). This result showed that HK1 was osmo-responsive and assumed a HK activity for carrying out this function, similar to the yeast osmosensor Sln1p.

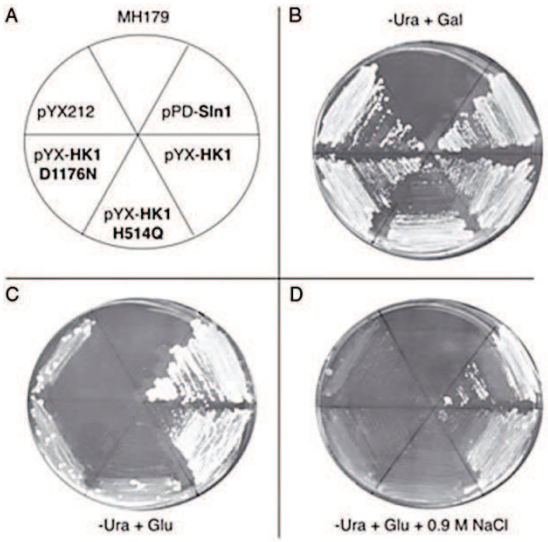


Fig. 2. Functional complementation test with HK1. (A) Uracil-borne constructs were used to transform the MH179 mutant strain as indicated. (B) The transformed yeasts were streaked onto galactose medium lacking uracil for growth control. (C) The same yeasts were streaked onto glucose medium lacking uracil for complementation assay under normal osmotic conditions. (D) These cells were streaked onto glucose and NaCl medium lacking uracil for functional complementation assay under high-osmotic conditions.

Implication of HK1 in HOG pathway regulation

To confirm that HK1 was acting as Sln1p, the phosphorylation of Hog1p in yeast producing HK1 was checked. MH179 *sln1*Δ *sho1*Δ strain was transformed with pYX-HK1 or pPD2133. Yeasts were treated or not by 0.4 *M* KCl and extracted proteins were analyzed on western blot. Anti-phosphoHog1 and anti-Hog1 antibodies were used to detect Hog1p phosphorylated forms and total Hog1p, respectively. The positive control 'total Hog1p' line showed that Hog1p is well expressed in cells (Fig. 3), and as expected, under osmotic stress

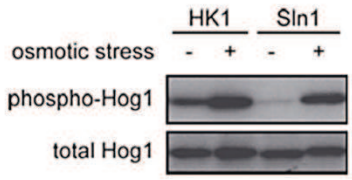


Fig. 3. Hog1 protein phosphorylation. MH179 strain transformed with either HK1 expressing plasmid (pYX-HK1) or Sln1p expressing plasmid (pPD-Sln1) was subjected to osmotic stress. Hog1p phosphorylation was monitored in control condition (–) and stressed condition (+) by western blotting with specific antibodies for phospho and total Hog1p immunodetection.

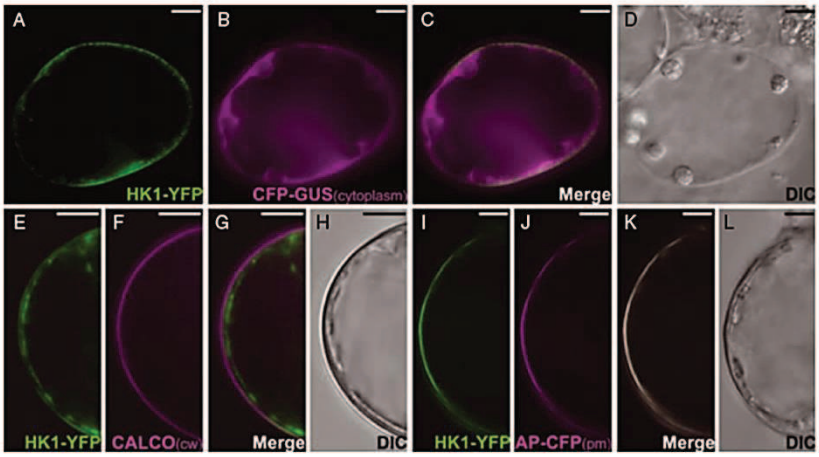


Fig. 4. HK1 localization. *Catharanthus roseus* cells were transformed with HK1-YFP in combination with the CFP-GUS cytoplasmic marker (A–D) or the AP-CFP plasma membrane (pm) marker (I–L), or stained with calcofluor (CALCO) to mark the cell wall (cw) (E–H). Co-localization of the two fluorescence signals can be seen on the merged image. The morphology is observed with differential interference contrast (DIC) microscopy. Bar: 10 μm.

condition, Hog1p was phosphorylated when Sln1p was expressed. This phosphorylation of Hog1p was also observed in hyperosmotic condition when HK1 was expressed in *sln1*Δ *sho1*Δ yeasts (Fig. 3). In both cases, a residual phosphorylation was observed in normal condition, although stronger in HK1 expressing yeast. These results showed that HK1 worked upstream to Hog1p as Sln1p.

Localization of HK1

The *Populus* HK1 protein sequence features two transmembrane domains, as the homologous yeast Sln1p and *Arabidopsis* AHK1 proteins, suggesting that it localizes to the membrane. In order to determine the precise localization of HK1 in plant cells, *C. roseus* cells were transformed transiently with constructs expressing full-length HK1 as YFP fusion. In these cells, the fluorescent signal emitted by the HK1-YFP fusion protein was totally absent from cytoplasm (Fig. 4A–D) and cell wall (Fig. 4E–H), but co-localized with the signal from the plasma membrane marker (Fig. 4I–L). These results showed that HK1 localized to the plasma membrane in plant cells.

Identification of seven new HPts

An *in silico* search was performed in the JGI *P. trichocarpa* databank and 16 gene models encoding putative HPts were obtained. Among them, five did not present the consensus sequence X*H*QXKGSSXS, the typical phosphotransfer intermediate motif with the conserved His phosphorylation site. These five proteins were identified as *pseudo*-HPts.

Among the 11 remaining predicted proteins, 7 were new potential HPts. Corresponding cDNAs were then isolated from leaves (*HPt4*) and petioles (*HPt10*) and from roots (*HPt5* to *HPt9*) cDNAs library. All deduced HPt sequences were aligned (Fig. S1) and their identities ranged from 37 to 97%. The relationship of these HPts with the authentic ones from *Arabidopsis* (AHPs), soybean (GmHPs), rice (OsAHPs) and maize (ZmHPs) is represented as an unrooted tree (Fig. 5). Branch lengths are proportional to sequence divergences, thus illustrating similarities between HPts sequences. It appeared that HPt1, HPt3 and 5 grouped together in a distinct cluster but branched on the same branch than AHP2, AHP3 and AHP5 cluster and GmHP6, GmHP9 and GmHP10 cluster. HPt2/HPt6 and HPt7/HPt9 pairs grouped with AHP1 and GmHP1 to GmHP5, HPt4 and HPt10/HPt8 pair with AHP4 and GmHP7/GmHP8 pair. HPts from monocots (maize and rice) grouped together on a branch separated from all other dicots HPts. These results indicated the absence of clustering among HPts from distinct species.

Interaction between HK1 and HPts

A global yeast two-hybrid analysis was conducted to study the interactions between HK1 and HPts. Since HPts expression in the bait configuration leaded to a strong autoactivation (data not shown), these proteins were tested in the prey configuration. Consequently,

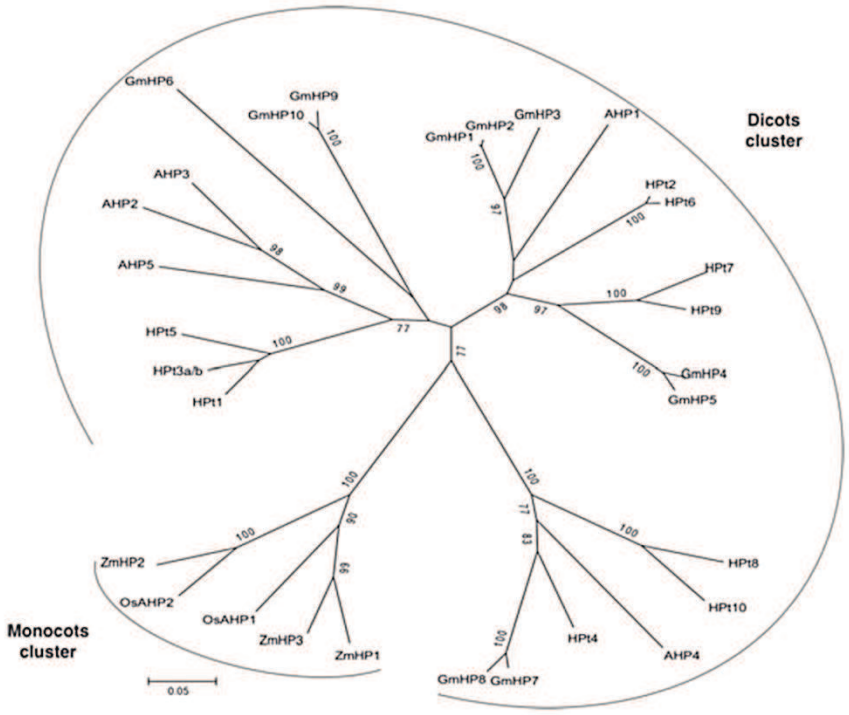


Fig. 5. Unrooted relationship tree of HPts from *Populus* and other plants. Amino acid sequence of all HPts deduced from cDNA sequences (Table S1) were aligned with authentic HPts of *Arabidopsis* (AHP1-5), maize (ZmHP1-3), rice (OsAHP1-2) and soybean (GmHP1-10) by CLUSTALW and represented as a phylogram constructed with the neighbor-joining method and 1000 bootstrapping replicates. The bootstrap values higher than 75% are indicated on the tree. Scale bar represents 0.05 amino acid substitution per site.

HK1 was tested in the bait configuration by expressing its complete CP (HK1-CP) containing the transmitter and the receiver domains.

This interaction analysis revealed reporter genes activation on interaction-selective medium for almost all HPts tested, although at different levels (Fig. S2A). Only HPt8 presented no growth at all, even though this fusion protein was expressed at comparable level to other proteins (Fig. S2B).

To refine those results, the strength of the detected interactions was quantified with a measurement of β-galactosidase activity for each pair of HK1/HPt (Fig. 6A). The pLex-HK1-CP with the empty pGAD vector was used as interaction background control. These quantifications showed that HPt1, HPt3, HPt4, HPt5 and HPt8 presented an interaction level similar to the control. Conversely, HPt2, HPt6, HPt7, HPt9 and HPt10 interacted in a significant way with HK1-CP and among them, HPt2, HPt6, HPt7 and HPt9 presented the strongest β-galactosidase activity. These results were in agreement with those obtained from qualitative assays (observed on –LWH medium). Moreover, among these last four HPts, it appears that HPt2 and HPt9 presented stronger affinities to HK1 than the others, with a β-galactosidase activity 13 times and 10 times higher than control, respectively.

Effect of HK1-RD phosphorylation in HK1/HPt2 interaction

The RD of HK1 contains a conserved Asp residue corresponding to the putative HK phospho-accepting amino acid. The effect of the phosphorylation of this residue in the interaction with HPts was tested by altering its capability to be phosphorylated. Therefore, this amino acid was substituted either by a glutamate residue (HK1-RD^{D1176E}) which mimics a constitutive phosphorylation or by an asparagine residue (HK1-RD^{D1176N}) which impairs all possibilities of phosphorylation at this position. These two mutants were tested in the two-hybrid system for their potential interaction with the most interacting HPt partner, HPt2, along with the wild-type sequence (HK1-RD) and empty vector (pLex) as positive and negative controls, respectively. All fusion

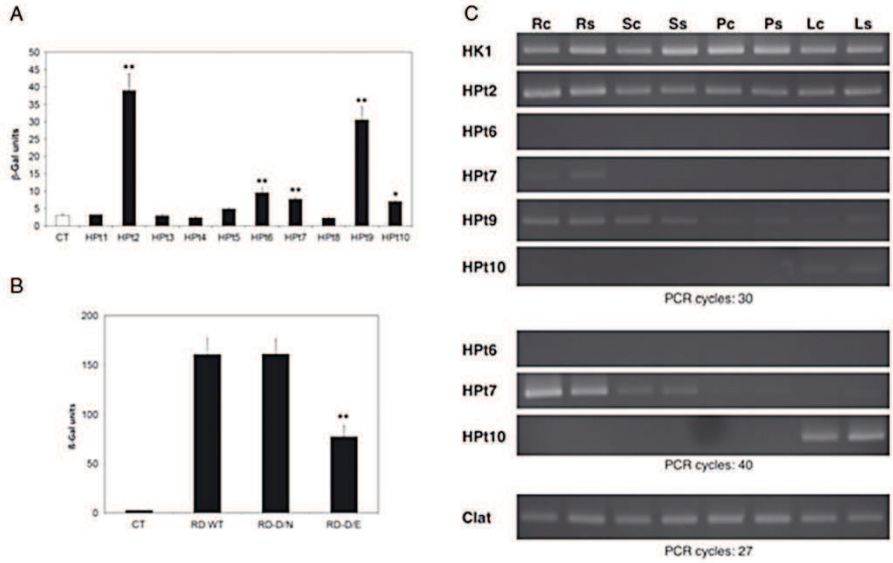


Fig. 6. Interactions between HK1 and HPts. (A) Two-hybrid quantitative tests: β-galactosidase activity for each HK1-CP/HPt interaction is plotted with mean values of at least four independent assays performed in triplicate and represented with standard error bars. Significant differences from empty vector interaction (pGAD) used as interaction background control (CT) are represented by $*P < 0.05$ and $**P < 0.01$. (B) β-Galactosidase activity for each HK1-RD/HPt2 interaction is plotted with mean values of at least six independent assays performed in triplicate and represented with standard error bars. Interaction background control (CT) was measured with empty vector interaction (pLex). Significant differences of two HK1-RD mutants from wild-type HK1-RD are represented by $**P < 0.01$. (C) Gene expression of interacting HPts and HK1: *HK1, HPt2, HPt6, HPt7, HPt9* and *HPt10* cDNAs amplification in roots (R), stems (S), petioles (P) and leaves (L) in control (c) and stress (s) conditions (PEG 50 gl^{-1}). *Clathrine* (Clat) gene was used as control.

proteins were expressed at comparable level (Fig. S2D). The results showed that the interaction between HK1-RD^{D1176N} and HPt2 was the same as the one observed with the wild-type HK1-RD (Fig. S2C). On the other hand, the substitution of the aspartate by a glutamate residue induced a strong decrease of the interaction between the RD and HPt2 since only few co-transformed yeasts were able to grow (Fig. S2C).

The effects of mutations were also reconfirmed by a quantification of these interactions. The four co-transformed yeasts were subjected to a β-galactosidase dosage experiment. The results showed that HK1-RD^{D1176N} mutant retained the same interaction level with HPt2 than wild-type HK1-RD whereas HK1-RD^{D1176E} mutant displayed only half (48%) of the wild-type (Fig. 6B). These results were consistent with those observed on plate and showed that the phosphorylation status of the RD was important for the interaction with HPt2.

Expression of HK1 and HPt genes

In order to substantiate characterized interactions, the potential co-expression of HK1 and interacting HPts was studied in planta. Expression was monitored in four organs by RT-PCR in control and hyperosmotic (PEG 50 gl^{-1}) conditions (Fig. 6C). Results showed that *HK1*, *HPt2* and *HPt9* have a constitutive expression since they were detected in all organs tested and in both conditions (upper panel). Whatever those conditions, *HPt2* has a more important expression level than *HPt9*, but both HPts are predominantly expressed in roots. *HPt7* and *HPt10* seem to be expressed only in roots and leaves, respectively (upper panel in Fig. 6C), but an extended PCR amplification analysis (40 cycles instead of 30) revealed a constitutive expression in all organs tested for *HPt7* whereas *HPt10* expression remains restricted to the leaves (middle panel). On the other hand, whatever organs, conditions or amplification cycles, no expression was detected for *HPt6*. *Clathrin* gene was used as amplification control (lower panel).

Discussion

In a previous work, a *Populus* cDNA encoding a histidine-aspartate kinase HK1 has been isolated (Chefdor et al. 2006). This protein presents 65% sequence identity with AHK1 but only 15–21% identity with the

other *Arabidopsis* HK proteins AHK2, AHK3, AHK4, AHK5 and CKI1. This strong sequence identity and the lack of CHASE domain, specific to cytokinin receptors, suggest that HK1 may be orthologous to AHK1 and therefore could be an osmosensor.

In this work, HK1 (CP) is demonstrated to be able to self-interact, strongly suggesting a potential homodimerization of the protein. Moreover, this self-interaction is mediated by the TD containing the histidine kinase domain. In bacterial HK, this domain contains the so-called DHp domain which has been shown to be involved in dimerization of HK monomers (Bilwes et al. 1999, Tomomori et al. 1999). The TD of the yeast Sln1p has only weak sequence similarity with the bacterial DHp domain but exhibits an upstream coiled-coil motif which is required for its dimerization (Tao et al. 2002). Bioinformatic analysis of the *Arabidopsis* AHK1 and *Populus* HK1 protein sequences using the LEARNCOIL program for the prediction of coiled-coil motifs in histidine kinase-type proteins (Singh et al. 1998) identified a possible coiled-coil motif in the region between the second transmembrane domain and the histidine kinase domain, at the same position in both proteins. An alignment of AHK1 and HK1 with the yeast Sln1p revealed conservation of position of the predicted coiled-coil motif, independently of sequence similarity (Fig. S3). This conservation suggests a functional importance of this motif and leads to speculate that it could be required for the dimerization of the HK1 protein as it is the case for Sln1p. In *Arabidopsis*, the ethylene receptor HK ETR1 has been shown to act as a dimer covalently linked by a disulfide bond (Schaller et al. 1995) as well as all other ethylene receptors (Grefen et al. 2008) and the HK CKI1 is able to form homodimers both in vitro and in planta (Hejátko et al. 2009). Our results show that HK1 is able to form a homodimer and this constitutes the first example of dimerization for a putative plant osmosensor.

In yeast, Sln1p is the main osmosensor and regulates HOG MAP kinase pathway via the multistep phosphorelay Sln1p-Ypd1p-Ssk1p (Maeda et al. 1994, Posas et al. 1996). In this study, the recovery of the lethal phenotype of the *sln1*Δ *sho1*Δ mutant growing in normal conditions shows that HK1 has a HK activity. This activity is confirmed by the inability of the unphosphorylated HK1 mutant forms ($HK1^{H514Q}$ and $HK1^{D1176N}$) to recover the yeast mutant lethality. In the same way, HK1 is able to act as an osmosensor by restoring the high-osmolarity tolerance of the *sln1*Δ *sho1*Δ yeast double mutant. Moreover, the *sln1*Δ *sho1*Δ mutant expressing HK1 responds to hyperosmotic stress as Sln1p, by acting upstream of Hog1p. The higher background signal observed in Fig. 3 for HK1 could be explained by the fact that HK1 only partially complements Sln1p deletion mutant. This explanation is supported by two-hybrid test showing only a weak interaction between HK1 and Ypd1p compared to Sln1p and Ypd1p (Fig. S4). The same osmosensing complementation was reported for the homologous *Arabidopsis* protein, AHK1 (Urao et al. 1999) and other non-ethylene HK receptors (Tran et al. 2007). Altogether, our results show that HK1 is able to control the yeast HOG MAP kinase cascade that allows cells metabolism adaptation to increasing osmotic potential.

Given that HK1 sequence presents two transmembrane domains, as the yeast osmosensor Sln1p and the *Arabidopsis* osmosensor AHK1, we speculate a plasma membrane localization for our protein. For Sln1p, plasma membrane localization has been demonstrated (Ostrander and Gorman 1999, Reiser et al. 2003). Surprisingly, AHK5, which is the only identified hybrid-type histidine-asparte kinase without transmembrane domain, was reported to localize to the cytoplasm but also to the plasma membrane (Desikan et al. 2008). Other recent data show that cytokinin receptors AHK2, AHK3 and AHK4 localized mainly to the endoplasmic reticulum membrane (Wulfetange et al. 2011, Caesar et al. 2011). In this work, the precise localization of HK1 was determined and the results showed a specific plasma membrane localization in plant cells, in accordance with an osmosensor function.

In a previous work, four different HPts corresponding to three different genes were identified (Chefdor et al. 2006). Among them, HPt3 and HPt4 were allelic forms and consequently renamed HPt3a and HPt3b. To complete this study, we decided to isolate all poplar HPts and this work allowed us to identify seven new proteins leading to a total of 10 different *HPt* genes in *Populus*. The comparison of their sequences with HPts from different plants showed a dicot plants cluster and a monocot plants branching apart. This observation is in agreement with a phylogenetic analysis of HPts from aqueous and land plants which show the same clear divide between HPts from dicot and monocot plants (Pils and Heyl 2009).

To identify HK1 partners, the potential interactions between these different HPts and the putative osmosensor HK1 were examined by two-hybrid tests. The results obtained confirm the interaction between HK1-CP and HPt2 previously observed in another two-hybrid system where the proteins were expressed from plasmid constructs in the opposite configuration (Chefdor et al. 2006). Here, qualitative but also quantitative approaches were used with another two-hybrid system that allows interaction measurement. The qualitative approach showed that all HPts can interact with HK1,

except HPt8. The quantitative approach shows that four HPts (HPt2, HPt6, HPt7 and HPt9) interact stronger than others and pinpoints HPt2 and HPt9 as HPts predominantly interacting with HK1. In *A. thaliana*, AHP2 is the only one HPt demonstrated to interact with AHK1 (Urao et al. 2000). It is interesting to note that, in the unrooted tree, AHP2 branches apart from HPt2 that interact the most with HK1, indicating they do not share a high degree of similarity, although they seem to have similar preferential partnership. This suggests that the osmosensing pathway could proceed through non-orthologous HPts in *Arabidopsis* and *Populus*, pinpointing a possible difference between these two model plants. A similar conclusion was reached in a recent review on cytokinin signaling, which shares common features and proteins with the osmosensing pathway. The authors highlight the differences between *Arabidopsis* and others plants in cytokinin pathway, arguing for a benefit to enlarge the range of plant species beyond *Arabidopsis* (Hellmann et al. 2010). Moreover, in *A. thaliana*, AHP2 has been demonstrated to interact with the osmosensor AHK1 as well as other HK receptors (Urao et al. 2000, Dortay et al. 2006, Pekárová et al. 2011) indicating that different signaling pathways can share same HPts. In our study, the numerous HK1 partners identified suggest a different functioning of osmosensing pathways between *Populus* and *Arabidopsis*. To elucidate whether HK1-interacting HPts are specific to the HK1 signaling pathway or not, interaction tests between our HPts and other HK receptors are currently under way.

To further characterize HK1 partners, an expression analysis in four different organs and two conditions was performed. The results showed that *HK1* and *HPt2*, *HPt7* and *HPt9* genes are co-expressed in all conditions and organs tested, with a more important expression level for *HPt2* than for *HPt7* and *HPt9*. This constitutive expression is in accordance with an early implication of the corresponding proteins in case of osmolarity change, especially for HK1 and HPt2. These results are also in agreement with the hypothesis of a preponderant role for HPt2, HPt7 and HPt9, with a dominant implication of HPt2 as a potential partner for HK1. In the case of HPt10, whose gene is expressed in leaves only, we cannot exclude that this protein could interact with HK1 in an organ specific manner. In *A. thaliana*, *AHK1* and *AHP2* were shown to be co-expressed mainly in roots and to a lesser extend in leaves and stems (Miyata et al. 1998, Urao et al. 1999). The same expression profile was observed for the homologous genes in soybean (Mochida et al. 2010, Le et al. 2011). In rice, expression analysis for HPts showed an important expression in roots, stems and leaves (Du et al. 2007) but no information is available for osmosensor expression since no AHK1 homologous genes have been found in rice genome (Schaller et al. 2007).

In yeast, the different partners of the multistep phosphorelay system involved in the osmoregulation are phosphorylated under physiological conditions of osmolarity. In the Sln1p RD, the mutation of the phospho-accepting Asp residue to Asn, abolishing the possibility of phosphorylation, has been shown to impair the signal transduction to downstream partners since it failed to complement a *sln1*Δ mutant (Maeda et al. 1994, Posas et al. 1996). In *A. thaliana*, the Asp to Glu AHK1 mutant failed to interact with AHP2 (Urao et al. 2000), and in yeast, the same mutation mimicking phosphorylation of the response regulator Skn7p RD caused constitutive activation of the protein (Brown et al. 1994). Here, the effect of phosphorylation on interaction between HK1 RD and HPt2, which presents the strongest affinity to HK1, was studied. The results show that the unphosphorylable form of HK1 still allows the interaction of both partners. On the other hand, a mimicking phosphorylated form of the RD strongly reduces the interaction with HPt2. Therefore, our results may indicate that HK1 can bind HPt2 only in the unphosphorylated form. In plant, it is not yet clearly established whether an osmotic stress induces a change in the phosphorylation status of the signal receptor. Nevertheless, our results allow us to hypothesize that HK1 and HPt2 could constitute a complex which could be dissociated by phosphorylation.

In this work, it has been shown that HK1 can act as an osmosensor in yeast, is able to homodimerize and presents exclusive plasma membrane localization in planta. These results constitute strong arguments in favor of an osmosensor function for HK1 in *Populus* cells. Moreover, 10 different HPts have been identified in *Populus* and revealed preferential HK1 partnership for five of them. The co-expression of HPts with HK1 was observed for three HPts and the HK1 phosphorylation status seems to alter HK1/HPt2 interaction. Altogether, these results lead us to hypothesize that HK1 and HPt2, HPt7 and HPt9 could be partners in a multistep phosphorelay system involved in the osmosensing pathway in *Populus*. To confirm this hypothesis, demonstration of an osmosensor function for HK1 in planta and search for response regulators, third partners in this type of phosphorelay, constitutes a work that is currently under investigation.

Acknowledgements – L. B. was supported by a PhD grant of the Conseil Régional Région Centre. We thank O. Rioland, E. Chanclud and M. Corral for technical assistance as well as A. Sallé for useful help in statistical analysis and S.

Bankhead for phylogenetic tree construction. We also thank Dr J. Masle (Australian University of Canberra) for critical reading of the manuscript and Dr J. Miller for English reviewing. This work was supported by the Conseil Général du Loiret and the Conseil Régional du Centre.

References

Asakura Y, Hagino T, Ohta Y, Aoki K, Yonekura-Sakakibara K, Deji A, Yamaya T, Sugiyama T, Sakakibara H (2003) Molecular characterization of His-Asp phosphorelay signaling factors in maize leaves: implications of the signal divergence by cytokinin-inducible response regulators in the cytosol and the nuclei. Plant Mol Biol 52: 331–341

Bilwes AM, Alex LA, Crane BR, Simon MI (1999) Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. Cell 96: 31–141

Bray EA (1997) Plant responses to water deficit. Trends Plant Sci 2: 48–54

Brown JL, Bussey H, Stewart RC (1994) Yeast Skn7p functions in a eukaryotic two-component regulatory pathway. EMBO J 13: 5186–5194

Caesar K, Thamm AMK, Witthöft J, Elgass K, Huppenberger P, Grefen C, Horak J, Harter K (2011) Evidence for the localization of the Arabidopsis cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. J Exp Bot 62: 5571–5580

Chefdor F, Bénédetti H, Depierreux C, Delmotte F, Morabito D, Carpin S (2006) Osmotic stress sensing in *Populus*: components identification of a phosphorelay system. FEBS Lett 580: 77–81

Desikan R, Horak J, Chaban C, Mira-Rodado V, Witthöft J, Elgass K, Grefen C, Cheung M-K, Meixner AJ, Hooley R, Neill SJ, Hancock JT, Harter K (2008) The Histidine kinase AHK5 integrates endogenous and environmental signals in Arabidopsis guard cells. PLoS One 3: e2491

Dortay H, Mehnert N, Bürkle L, Schmülling T, Heyl A (2006) Analysis of protein interactions within the cytokinin-signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*. FEBS J 273: 4631–4644

Du L, Jiao F, Chu J, Jin G, Chen M, Wu P (2007) The two-component signal system in rice (*Oryza sativa* L.): a genome-wide study of cytokinin signal perception and transduction. Genomics 89: 697–707

Fromont-Racine M, Rain JC, Legrain P (1997) Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. Nat Genet 16: 277–282

Gietz RD, Schiestl RH (1995) Transforming yeast with DNA. Met Mol Cell Biol 5: 255–269

Grefen C, Städele K, Ruzicka K, Obrdlik P, Harter K, Horák J (2008) Subcellular localization and in vivo interactions of the *Arabidopsis thaliana* ethylene receptor family members. Mol Plant 1: 308–320

Guirimand G, Burlat V, Oudin A, Lanoue A, St-Pierre B, Courdavault V (2009) Optimization of the transient transformation of *Catharanthus roseus* cells by particle bombardment and its application to the subcellular localization of hydroxymethylbutenyl 4-diphosphate synthase and geraniol 10-hydroxylase. Plant Cell Rep 28: 1215–1234

Guirimand G, Courdavault V, Lanoue A, Mahroug S, Guihur A, Blanc N, Giglioli-Guivarc'h N, St-Pierre B, Burlat V (2010) Strictosidine activation in Apocynaceae: towards a "nuclear time bomb"? BMC Plant Biol 10: 82

Hejátko J, Ryu H, Kim G-T, Dobešová R, Choi S, Choi SM, Souček P, Horák J, Pekárová B, Palme K, Brzobohatý B, Hwang I (2009) The histidine kinases CYTOKININ-INDEPENDENT1 and ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE2 and 3 regulate vascular tissue development in Arabidopsis shoots. Plant Cell 21: 2008–2021

Hellmann E, Gruhn N, Heyl A (2010) The more, the merrier: cytokinin signaling beyond Arabidopsis. Plant Signal Behav 5: 1384–1390

Ishida K, Niwa Y, Yamashino T, Mizuno T (2009) A genome-wide compilation of the two-component systems in *Lotus japonicus*. DNA Res 16: 237–247

Ito Y, Kurata N (2006) Identification and characterization of cytokinin-signaling gene families in rice. Gene 382: 57–65

Jacoby T, Flanagan H, Faykin A, Seto AG, Mattison C, Ota I (1997) Two protein-tyrosine phosphatases inactivate the osmotic stress response pathway in yeast by targeting the mitogen-activated protein kinase, Hog1. J Biol Chem 272: 17749–17755

Le DT, Nishiyama R, Watanabe Y, Mochida K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran L-SP (2011) Genome-wide expression profiling of soybean two-component system genes in soybean root and shoot tissues under dehydration stress. DNA Res 18: 17–29

Lu JM-Y, Deschenes RJ, Fassler JS (2003) *Saccharomyces cerevisiae* histidine phosphotransferase Ypd1p shuttles between the nucleus and cytoplasm for SLN1-dependent phosphorylation of Ssk1p and Skn7p. Eukaryot Cell 2: 1304–1314

Maeda T, Wurgler-Murphy SM, Saito H (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. Nature 369: 42–245

Miyata S-I, Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) Characterization of genes for two-component phosphorelay mediators with a single HPt domain in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett 437: 11–14

Mochida K, Yoshida T, Sakurai T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran L-SP (2010) Genome-wide analysis of two-component systems and prediction of stress-responsive two-component system members in soybean. DNA Res 17: 303–324

Ostrander DB, Gorman JA (1999) The extracellular domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Sln1p membrane osmolarity sensor is necessary for kinase activity. J Bacteriol 181: 2527–2534

Pareek A, Singh A, Kumar M, Kushwaha HR, Lynn AM, Singla-Pareek SL (2006) Whole-genome analysis of *Oryza sativa* reveals similar architecture of two-component signaling machinery with Arabidopsis. Plant Physiol 142: 380–397

Pekárová B, Klumpler T, Třísková O, Horák J, Jansen S, Dopitová R, Borkovcová P, Papoušková V, Nejedlá E, Sklenář V, Marek J, Zídek L, Hejátko J, Janda L (2011) Structure and binding specificity of the receiver domain of sensor histidine kinase CKI1 from *Arabidopsis thaliana*. Plant J 67: 827–839

Pils B, Heyl A (2009) Unraveling the evolution of cytokinin signaling. Plant Physiol 151: 782–791

Posas F, Wurgley-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, Thai TC, Saito H (1996) Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 ''two-component'' osmosensor. Cell 86: 865–875

Reiser V, Raitt DC, Saito H (2003) Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. J Cell Biol 161: 1035–1040

Schaller GE, Ladd AN, Lanahan MB, Spanbauer JM, Bleecker AB (1995) The ethylene response mediator ETR1 from *Arabidopsis thaliana* forms a disulfide-linked dimer. J Biol Chem 270: 12526–12530

Schaller GE, Doi K, Hwang I, Kieber JJ, Khurana JP, Kurata N, Mizuno T, Pareek A, Shiu S-H, Wu P, Yip WK (2007) Nomenclature for two-component signaling elements of rice. Plant Physiol 143: 555–557

Singh M, Berger B, Kim PS, Berger JM, Cochran AG (1998) Computational learning reveals coiled coil-like motifs in histidine kinase linker domains. Proc Natl Acad Sci USA 95: 2738–2743

Suzuki T, Sakurai K, Imamura A, Nakamura A, Ueguchi C, Mizuno T (2000) Compilation and characterization of histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in plants: AHP signal transducers of *Arabidopsis thaliana*. Biosci Biotechnol Biochem 64: 2486–2489

Tao W, Malone CL, Ault AD, Deschenes RJ, Fassler JS (2002) A cytoplasmic coiled-coil domain is required for histidine kinase activity of the yeast osmosensor, SLN1. Mol Microbiol 43: 459–473

Tomomori C, Tanaka T, Dutta R, Park H, Saha SK, Zhu Y, Ishima R, Liu D, Tong KI, Kurokawa H, Qian H, Inouye M, Ikura M (1999) Solution structure of the homodimeric core domain of *Escherichia coli* histidine kinase EnvZ. Nat Struct Mol Biol 6: 729–734

Tran L-SP, Urao T, Qin F, Maruyama K, Kakimoto T, Shinozaki K, Yamagushi-Shinozaki K (2007) Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci USA 104: 20623–20628

Urao T, Yakubov B, Satoh R, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M, Hirayama T, Shinozaki K (1999) A transmembrane hybrid-type histidine kinase in Arabidopsis functions as an osmosensor. Plant Cell 11: 1743–1754

Urao T, Miyata S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2000) Possible His to Asp phosphorelay signaling in an Arabidopsis two-component system. FEBS Lett 478: 227–232

Wohlbach DJ, Quirino BF, Sussman MR (2008) Analysis of the Arabidopsis histidine kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation. Plant Cell 20: 1101–1117

Wulfetange K, Lomin SN, Romanov GA, Stolz A, Heyl A, Schmülling T (2011) The cytokinin receptors of Arabidopsis are located mainly to the endoplasmic reticulum. Plant Physiol 156: 1808–1818

Wurgler-Murphy S, Maeda T, Witten E, Saito H (1997) Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG1 mitogen-activated protein kinase by the PTP2 and PTP3 protein tyrosine phosphatases. Mol Cell Biol 17: 1289–1297

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table. S1. *Populus* HPt genes.

Fig. S1. Alignment of all poplar HPts.

Fig. S2. Interaction between HK1 and HPts.

Fig. S3. Alignment of HK proteins with a predicted coiled-coil motif.

Fig. S4. Interaction between HK1 and Ypd1p.

Edited by T. Berberich

Table S1: *Populus* HPt genes

Name*	AN	Ref	Corresponding *Populus trichocarpa* genes models (Poptr1_1)**
HPt1	AJ841793	1	*estExt_fgenesh4_pm.C_LG_VI0337*
HPt2	AJ841794	1	*estExt_fgenesh4_pm.C_18170002 / eugene3.00081871*
HPt3a	AJ841795	1	*estExt_fgenesh4_pg.C_LG_XVI1041*
HPt3b	AJ841796	1	*estExt_fgenesh4_pg.C_LG_XVI1041*
HPt4	HE856347	2	*gw1.I.396.1*
HPt5	FN908133	2	*fgenesh4_pg.C_LG_XIV000773*
HPt6	FN908134	2	*estExt_fgenesh4_pg.C_LG_X0275*
HPt7	FN908135	2	*estExt_fgenesh4_pm.C_700061*
HPt8	FN908136	2	*eugene3.00180254*
HPt9	FN908137	2	*estExt_Genewise1_v1.C_LG_XCIII1173*
HPt10	FN908132	2	*fgenesh4_pg.C_LG_VI001633*

AN: Accession Number; Ref: references; 1: Chefdor *et al.,* 2006; 2: this work.
*: *Populus deltoïdes* (Bartr.) Marsh x *P. nigra* L. genotype Dorskamp HPt genes
**: gene models identified *in Populus trichocarpa* JGI (V1.1).

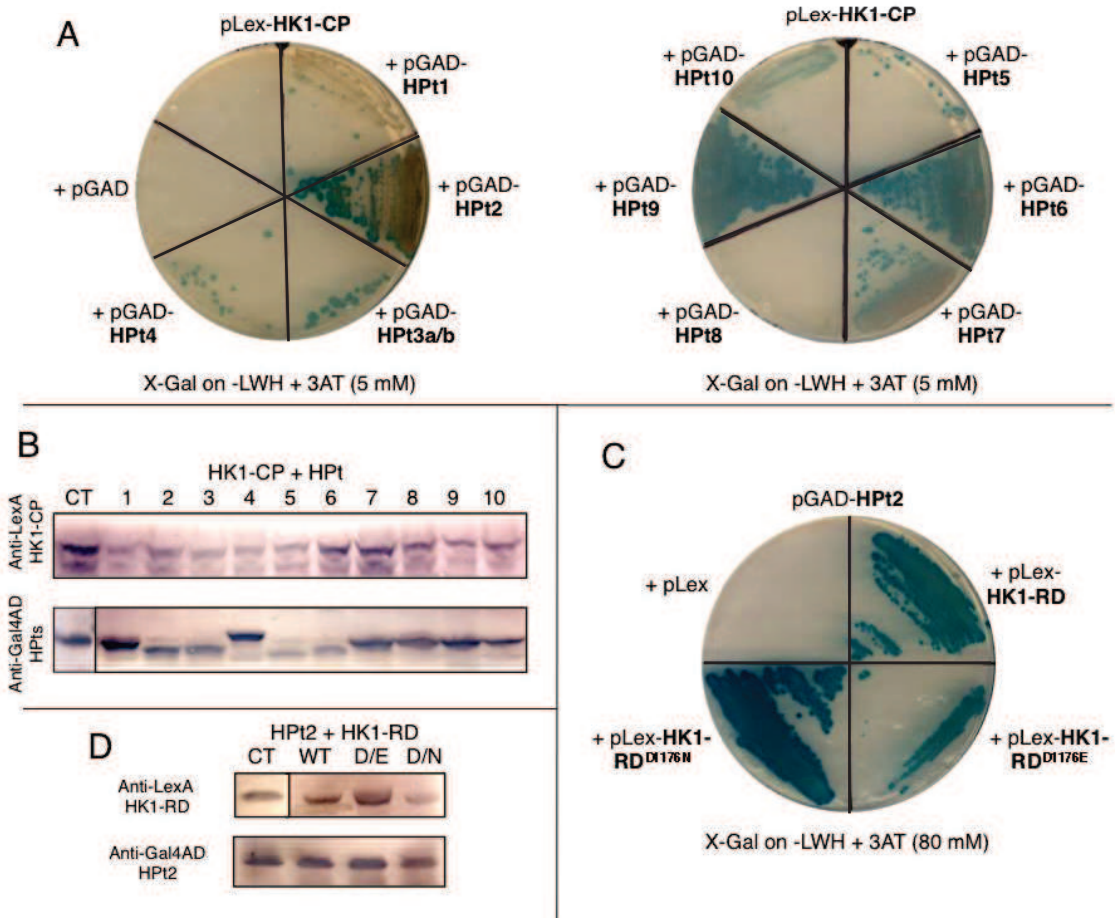
Fig. S1: HPt alignment

```
HPt1     MDLLNQLQRQYTDFTTLLYQEGFVDDQFTQLQKLQDESSPDFVVEVVSLFFEDCEKLVNN 60
HPt2     ME-VGQMQRAWVEYTKSLFREGFLDAQFQQLQLLQDESNPDFVAEVVSLFFEDSERLLTD 59
HPt3a    MDVVSQLQRQLADFLAPLYREGFVDDQFTQLQKLQDESSPDFVIEVVSLFFEDCEKLVSN 60
HPt3b    MDVLSQLQRQLADFLAPLYREGFVDDQFTQLQKLQDESSPDFVMEVVSLFFEDCEKLVNN 60
HPt4     ME-RNQLRRQVALTRQSLFDQGFLDEQFIQLEELQDDANPNFVEEVVSLHYRDSARLISN 59
HPt5     MDLLNQLRRQIADFSAFLYREGFVDDQFTQLQKLQDESSPGFVVEVVSLFFEDCEKLVNN 60
HPt6     ME-VVQMQRAWVEYTKSLFREGFLDAQFQQLQLLQDESNPDFVAEVVSLFFEDSERLLSD 59
HPt7     MDSVVQLQRQLIDYTGQLFNEGFLDDQFNQLQQLQDESNPDFVVELVTLFFEDSEKLINE 60
HPt8     MD-RKQLQHQVAYMRKSQFDQGYLDDQFNQLEDLQDEANPNFVEEVVTLFYSDSARFIQN 59
HPt9     MDSVVQLQRQLVDYSAQLFNEGFLDDQFNQLQQLQDESNPDFVVEVVTLFFEDSERLLDE 60
HPt10    MD-RKQLQHQVASTRRSLFDQGYLDDQFIQIEHLQDEANPNFVEEVVRLFYSDSVRLIQN 59
              *:::          : :*::* ** *:: ***::.*.** *:* *.: *. ::: :
                                  ▼
HPt1     MAKALEQQ-DVDFKRVDSHVHQLKGSSSSIGAARIKNVCIAFKTFCEAQNREGCLRCLQQ 119
HPt2     LTSALEQQ-NIDFKKVDAHVHQFKGSSSSIGALRVKNDCIAFRNFCEEQNIEGCLRCLQQ 118
HPt3a    MAKALEQQ-VVDFKQVDSHVHQLKGSSSSIGAARIKNVCVAFKTFCEAQNREGCLRCLQQ 119
HPt3b    MAKALEQQ-VVDFKQVDSHVHQLKGSSSSIGAARIKNVCIAFKTFCEAQNREGCLRCLQQ 119
HPt4     IEKALEKN-PLDFNKLDGYMHQFKGSSSSIGAKKVKAECTLFREYCKAGNGEGCMRTFQQ 118
HPt5     MAKALEQQ-IVDFKQVDSHVHQLKGSSSSIGAARIQNVCIAFKTYCEGQNRDGCVRCLQQ 119
HPt6     LTFALEQQ-SVDFKKVDAHVHQLKGSSSSIGAQRVKNGCIAFRSFCEEQNIEGCQRCLQQ 118
HPt7     LAKDLEQQ-SIDYRKIDAHVHQLKGSSSSIGVQRVQKVCIAFRNYCEERNIEGCQKCLQQ 119
HPt8     IEQAMIKKPNIDFGKLDDYMHQFKGSSSSFGAKKMKKECSQFRECCSAGNIEGCIKTFQQ 119
HPt9     LAKALEQQ-SVDYRKIDAHVHQLKGSSSSIGAQRVQKVCIGFRNFCDERNIEGCQKCLQQ 119
HPt10    IEQAMINKSNIDFGKLDDYMHQFKGSSSSIGAKKVMKECSKFREYCYAGNIEGCIKTFQL 119
         :   : ::  :*: ::* :**:******:*. ::   *  *:  *   * :** : :*

HPt1     VNHEHTQLKTNLQSLFTLERQIVANGGSIPVMQ--- 152
HPt2     LKHDYYLVKSKLEALIRLEQQIVAACGTIPMEELSS 154
HPt3a    VNHEYTQLKANLQTLFTLERQIVAAGGSVPAMQ--- 152
HPt3b    VNHEYTQLKANLQTLFTLERQIVAAGGSVPAMQ--- 152
HPt4     IKKEYATLKRKLETYFQLARQAGPADTACRPK---- 150
HPt5     VNHECIQLKNNLQALFKLEQQIVAAGGSIPAMQ--- 152
HPt6     VKQDYCLVKSKLEALIRLEQQIVAAGGSIPMEELSC 154
HPt7     VKNEYSLVKTKLETLFKLEQQVLTAGGSIPWPM--- 152
HPt8     VKQEHATLRRKLETYFQV------------------ 137
HPt9     VKHEYSLVKTKLETLFKLEQKVLAAGGSIPWPM--- 152
HPt10    LKQEHATLRRKLETYFQLVKQAGLAESA-------- 147
         ::::    :: :*:: : :
```

HPt sequences were aligned by ClustalW. Identical amino acids are highlighted in grey. The HPt conserved motif X**HQ**X**KGSS**X**S** is underlined and the putative phosphorylation site (H) is shown by an arrowhead. (*): identical amino acid, (:): amino acid with strong similarity, (.): amino acid with weak similarity.

Fig. S2: Interaction between HK1 and HPts



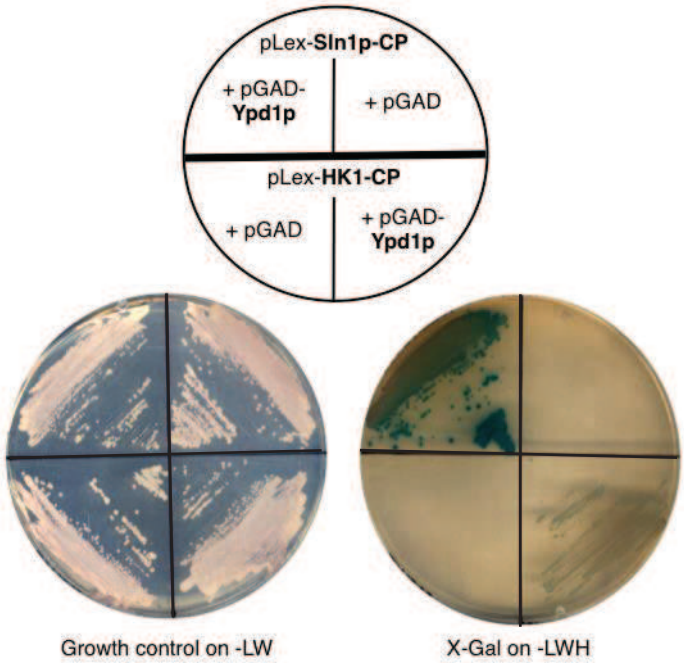
A-HK1-CP interactions with HPt1 to HPt10 as indicated on the X-Gal assay plates. **B-**Fusion proteins expression analysed by western blot with anti-LexA and anti-Gal4AD antibodies for Lex-HK1-CP and GAD-HPt fusion proteins immunodetection, respectively**.** **C-**HPt2 interactions with wild-type and mutant HK1-RD forms as indicated on the X-Gal assay plates. **D-**Fusion proteins expression analysed by western blot with anti-LexA and anti-Gal4AD antibodies for Lex-HK1-RD and GAD-HPt2 fusion proteins immunodetection, respectively.

Fig. S3: Alignment of HK proteins with a predicted coiled-coil motif

```
HK1    451 KTLVILISASLCILVIGCVFILILTNG----------------VSKEMKLRAELISHLDARRRAEASNNYKSQFLANMSHELRTPMAAVIGLLDILICDDCL 536
AHK1   446 KTLIILISASVCIFFIGCVCILILTNG----------------VSKEMKLRAELIRQLDARRRAEASSNYKSQFLANMSHELRTPMAAVIGLLDILISDDCL 530
Sln1p  495 RSHILTTSANLTEARLPDYRRLFSDELSDLTETFNTMTDALDQHYALLEERVRARTKQLEAAKIEAEAANEAKTVFIANISHELRTPLNGILGMTAISMEETDV 598
           :: ::  **.:    :     *:  :                  .  * ::**.      *: .***:.: *: *:**:*******: .::*:  * : :  :
```

Amino acid sequences of HK1, AHK1 and Sln1p were aligned using ClustalW. The region predicted by the learnCoil program (http://groups.csail.mit.edu/cb/learncoil/cgi-bin/learncoil.cgi) to form a coiled-coil motif is box-shaded. The H box containing the phospho-accepting histidine is shown in bold. Sequence conservation is represented by (*) for amino acid identity, by (:) for strong amino acid similarity and by (.) for weak amino acid similarity. Amino acid positions are indicated by numbers on the left and right of the protein sequences.

Fig. S4: Interaction test between HK1 and Ypd1p



Cytoplasmic part of HK1 (HK1-CP) or Sln1p (Sln1p-CP) have been tested in two-hydrid for interaction with Ypd1p as indicated. The growth control is presented on non-selective medium –LW. Results for X-Gal assay on –LWH medium is presented with empty vector pGAD used as negative

III. ÉTUDES COMPLÉMENTAIRES

Afin de visualiser et de comprendre la raison d'un partenariat d'interactions préférentielles de HK1 avec certaines HPt, un alignement des 10 séquences d'HPt de peuplier a été réalisé par ClustalW (Goujon *et al.*, 2010). Les résultats sont présentés en FIGURE 17. Une représentation de la structure en trois dimensions (3D) d'une protéine HPt (Ypd1p) est également associée à la figure. Elle consiste en six hélices α, dont quatre d'entre elles forment un motif structural connu sous le nom de faisceau quatre hélices ou "four-helix bundle". Concernant les séquences des HPt en vue globale (A), nous pouvons repérer un motif conservé qui correspond à la séquence consensus XHQXKGSSXS partagée par toutes les HPt, comme présentée précédemment (ARTICLE I). De plus, la matrice de substitution Blossum 62 des séquences a permis de définir quatre groupes d'HPt, partageant de forts degrés de similitudes de séquences. La vue ciblée des séquences (B) nous permet cependant de constater que même dans un groupe d'HPt affiliées, de petites différences de séquences sont observables, dont certaines sont sans doute à l'origine de différences de préférences d'interaction avec ses partenaires, HK ou RR.

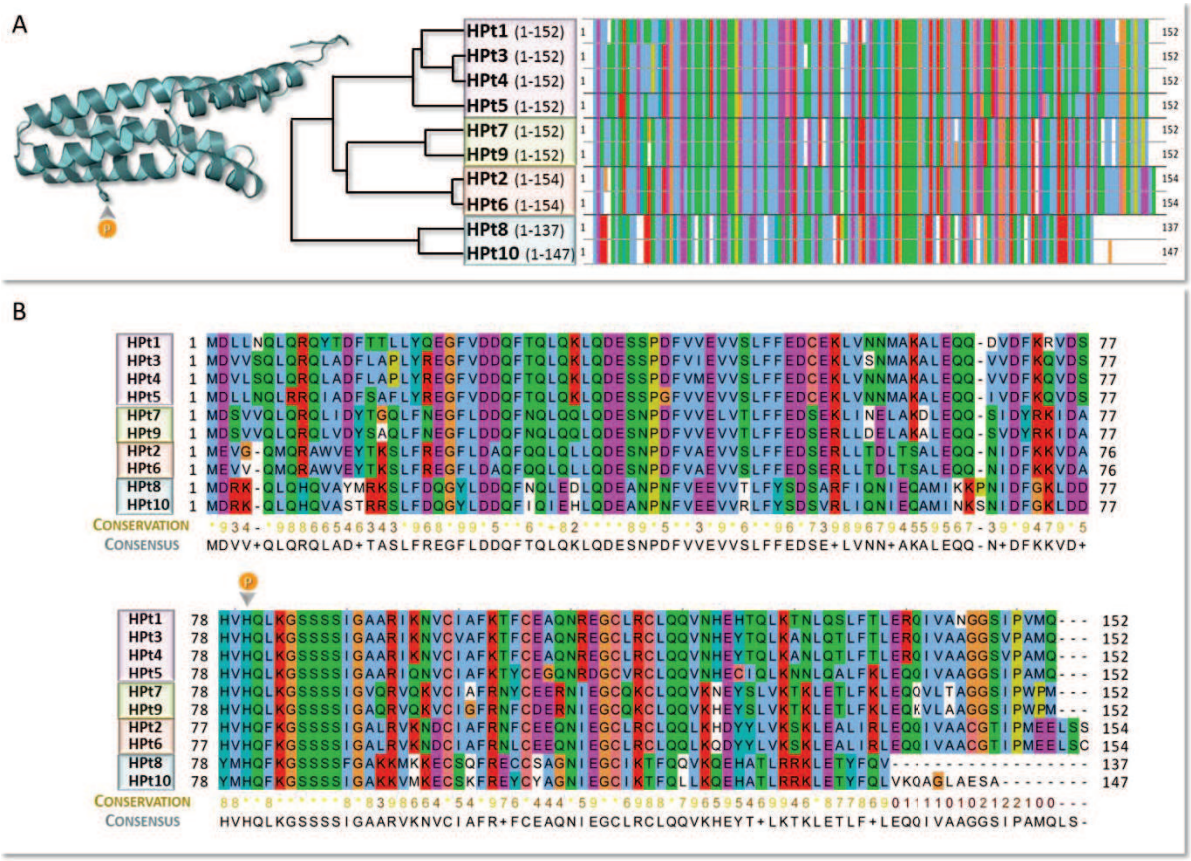


FIGURE 17 – Alignement des séquences protéiques de l'ensemble des HPt de peuplier

L'alignement a été réalisé avec le logiciel ClustalW. Cette image a été générée par Jalview 2.8 avec le masque d'affichage de couleur Clustalx (ANNEXE 4).

A-Un premier alignement en vue globale est représenté par HPt appartenant à un même groupe, c'est-à-dire présentant des similitudes de séquences importantes. La représentation schématique de la structure 3D de la protéine Ypd1p (code PDB : 1OXK) est montrée sous la forme avec laquelle elle interagit avec le récepteur Sln1p. L'image a été réalisée avec PyMOL (DeLano & Bromberg, 2004). Le résidu histidine strictement conservé qui est phosphorylé lors de l'activation de l'HPt est localisé.
B-Un zoom sur l'alignement permettant de visualiser la totalité des séquences des HPt est présenté. La conservation du résidu histidine est avérée parmi les HPt exprimées chez le peuplier. La conservation des résidus est représentée par une note de 0 à 9, par un astérisque lorsqu'un résidu est strictement conservé, et par un signe "+" quand la nature des résidus est conservée. La séquence consensus est donnée sous l'alignement.

Chapitre II

Validation des interactions des HPt partenaires avec le récepteur HK1 in planta

I. Présentation de l'article

Actuellement, plusieurs études montrent la nécessité d'utiliser différentes techniques en synergie afin de pouvoir conclure quant aux interactions entre deux protéines. Des interactions détectées par utilisation du système double-hydride en levure n'ont pas forcément été observées et donc validées par des techniques *in vitro* (Dortay *et al.*, 2006) ou *in planta* (Mira-Rodado *et al.*, 2012). Inversement, l'absence d'interaction entre deux protéines constatée en levure a, dans certains cas, pu être infirmée par observation de leur interaction *in planta* (Cutcliffe *et al.*, 2011; Veerabagu *et al.*, 2012).

Dans ce contexte, il était primordial de valider *in planta*, d'une part la dimérisation de HK1 et d'autre part, le partenariat d'interactions préférentielles entre HK1 et les trois protéines HPt (HPt2, 7 et 9), mis en évidence par la technique du double-hybride (Héricourt *et al.*, 2013). L'ensemble des tests d'interactions a été réalisé *in planta* par BiFC (**Bi**molecular **F**luorescence **C**omplementation) en utilisant la partie cytoplasmique de HK1 (HK1-CP). Cette étude avait donc pour principal objectif de valider *in planta* ces interactions initialement observées en levure.

II. Principaux résultats

Ce travail a permis de montrer que la partie cytoplasmique de HK1 (HK1-CP) est organisée en homodimère dans les cellules de plante, et donc de confirmer cette même interaction observée au préalable dans un système hétérologue. Cette caractéristique d'HK constitue la première preuve d'homodimérisation d'un osmosenseur *in planta*.

Les interactions entre HK1 et les trois HPt, HPt2, 7 et 9 ont également été confirmées *in planta*, suggérant la possible implication de ce partenariat d'interactions dans la voie de transduction orchestrée par HK1.

L'ensemble de ce travail est présenté dans l'Article II.

Article II

In planta validation of HK1 homodimerization and recruitment of preferential HPt downstream partners involved in poplar multistep phosphorelay systems

Publié dans Plant Biosystems (147:991-995) : L. Bertheau, M. Miranda, E. Foureau, L. F. Rojas Hoyos, F. Chefdor, F. Héricourt, C. Depierreux, D. Morabito, N. Papon, M. Clastre, G. S. Scippa, F. Brignolas, V. Courdavault, S. Carpin (2013)

Plant Biosystems, 2013
Vol. 147, No. 4, 991–995, http://dx.doi.org/10.1080/11263504.2013.853704

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

ORIGINAL ARTICLE

In planta validation of HK1 homodimerization and recruitment of preferential HPt downstream partners involved in poplar multistep phosphorelay systems

L. BERTHEAU[1,2], M. MIRANDA[3], E. FOUREAU[4], L.F. ROJAS HOYOS[5], F. CHEFDOR[1,2], F. HÉRICOURT[1,2], C. DEPIERREUX[1,2], D. MORABITO[1,2], N. PAPON[4], M. CLASTRE[4], G.S. SCIPPA[3], F. BRIGNOLAS[1,2], V. COURDAVAULT[4], & S. CARPIN[1,2]

[1]*Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures (LBLGC), UFR-Faculté des Sciences, Université d'Orléans, UPRES EA 1207, BP 6759, F-45067 Orléans, France;* [2]*INRA, USC1328, Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales (ARCHE), BP 6759, F-45067 Orléans, France;* [3]*Dipartimento di Bioscienze e Territorio, Università degli Studi del Molise, c.da Fonte Lappone s.n., 86190 Pesche, Italy;* [4]*EA 2106, Biomolécules et Biotechnologies Végétales, Université François-Rabelais de Tours, 31 Avenue Monge, 37200 Tours, France and* [5]*Laboratorio de Biotecnología, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Antioquia, Columbia*

Abstract
Multistep phosphorelays involve a phosphate transfer from sensor histidine-aspartate kinases (HKs) to response regulators (RRs), via histidine-containing phosphotransfer proteins (HPts). In *Arabidopsis*, some AHK receptors are organized as homodimers and able to interact with HPts (AHPs). However, there are no data available concerning the dimerization of the *Arabidopsis* osmosensor AHK1. Although only AHP2 is able to interact with AHK1 in yeast, validation of this interaction remains to be clarified in planta. The ability of poplar HK1 osmosensor, homologous to AHK1, to homodimerize and interact with three HPts (HPt2, 7 and 9) as preferential partners has been previously shown by yeast two-hybrid assay. However, protein interaction studies need to use complementary approaches to avoid interaction artifacts. Here, we confirmed *in planta* homodimerization of the cytoplasmic part of HK1 (HK1-CP) and the functional relevance of HK1-CP/HPt interactions by bimolecular fluorescence complementation assays. This work led us to validate these partnerships and to propose them as probably involved in osmosensing pathway in *Populus*.

Keywords: *Histidine-aspartate kinase, histidine-containing phosphotransfer protein, osmosensing pathway,* Populus, *protein interactions*

Introduction

Adverse environmental conditions, such as mechanical stress, high or low temperatures, heavy metals or drought, affect plant functions and growth (Scippa et al. 2008; Durand et al. 2011a, 2011b, 2012; Pal'ove-Balang & Mistrík 2011; Rahman et al. 2012; Trupiano et al. 2012a, 2012b). Plant response and adaptation to water stress are dependent on its perception by the multistep phosphorelay system that enables to perceive also plant hormone such as cytokinins. In *Arabidopsis thaliana*, this system is composed of histidine-aspartate kinases (AHKs), histidine-containing phosphotransfer proteins (AHPs) and response regulators (ARRs) (Hwang et al. 2002). In this model plant, five ethylene receptors (Grefen & Harter 2004); three cytokinin receptors AHK2, AHK3 and AHK4/CRE1 (Higuchi et al. 2004; Nishimura et al. 2004; Riefler et al. 2006); one osmosensor AHK1 (Urao et al. 1999; Tran et al. 2007) and two cytokinin-independent AHKs CKI1 (Pischke et al. 2002; Hejátko et al. 2003, 2009; Deng et al. 2010) and AHK5/CKI2 (Iwama et al. 2007; Desikan et al. 2008) have been identified. Several AHKs are able to dimerize as described for AHK2, 3 and 4 (Dortay et al. 2006; Caesar et al. 2011;

Correspondence: S. Carpin, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures (LBLGC), UFR-Faculté des Sciences, Université d'Orléans, UPRES EA 1207, BP 6759, F-45067 Orléans, France; INRA, USC1328, Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales (ARCHE), BP 6759, F-45067 Orléans, France, Tel: +33 (0)2 38 49 48 04. Fax: +33 (0)2 38 49 40 89. Email: sabine.carpin@univ-orleans.fr

© 2013 Società Botanica Italiana

Wulfetange et al. 2011) and CKI1 (Hejátko et al. 2009). The downstream members of this pathway are represented by 5 authentic AHPs and 11 B-type RRs, proteins of ARR family including also the A-type, C-type and pseudo-RRs (Pils & Heyl 2009). Binding of cytokinin to AHKs sensory CHASE domain initiates a phosphate transfer from these receptors to shuttle AHPs, and finally to B-type ARRs, transcription factors constituting the final output of cytokinin pathway. In addition to cytokinin signalling, multistep phosphorelays are also involved in other signalling pathways as osmosensing. AHK1 acts as an osmosensor in both yeast (Urao et al. 1999) and plant (Tran et al. 2007). This receptor seems to be involved in the control of the stomatal density to avoid dehydration during drought (Kumar et al. 2013) and also plays a role in the regulation of desiccation processes during seed formation (Wohlbach et al. 2008). Among the five authentic AHPs, only AHP2 has been shown to interact with AHK1 in yeast two-hybrid (Y2H) system (Urao et al. 2000). Although interaction studies between some HKs (CKI1 and AHK5) and HPts have been shown *in planta* (Pekárová et al. 2011; Mira-Rodado et al. 2012), no information is available concerning the AHK1/AHP interactions *in planta*.

In *Populus*, some multistep phosphorelay members have been identified such as HK1, 10 HPts and 8 B-type RRs. HK1 is able to function as osmosensor in yeast. The homodimerization of the cytoplasmic part of HK1 (HK1-CP) has been also demonstrated and three HPts (HPt2, 7 and 9) were identified as downstream partners of HK1 by only Y2H interaction studies (Chefdor et al. 2006; Héricourt et al. 2013). Moreover, we showed the functional relevance of interactions between these three HPts and B-type RRs by both Y2H and biomolecular fluorescence complementation (BiFC) analyses (Bertheau et al. 2012). A recent study in *Arabidopsis* showed that some interactions between AHK5 and AHPs established in yeast were not confirmed *in planta* constituting a yeast artifact (Mira-Rodado et al. 2012). Here, we confirmed, in plant cells, the interactions observed in yeast, highlighting their pertinence in a possible multistep phosphorelay in *Populus*.

Materials and methods

Y2H assays

Y2H assays were performed according to Héricourt et al. (2013). A cell suspension with an Optical Density at wavelength of 600 nm (OD_{600}) of 0.2 was prepared for each type of interaction. Ten microliters of each cell suspension were dropped on control medium -LW (-Leu, -Trp) and interaction selective medium -LWH (-Leu, -Trp, -His) supplemented with 5 mM of 3AT (3-amino-1,2,4-triazole). In addition, two dilutions (1:10 and 1:100) of each cell suspension (OD_{600} of 0.2) were prepared and dropped on -LWH medium. Yeast cells grew during four days at 30°C.

Plasmids construction

BiFC assays were conducted using the pSPYNE(R) 173 and pSPYCE(MR) plasmids (Waadt et al. 2008), and pSPYNE173 and SPYCE(M) plasmids (Guirimand et al. 2010) which allowed the expression of a protein fused to the C- or N-terminal of the split-yellow fluorescent protein (YFP) fragments, respectively. The cDNA of HK1-CP was cloned via *Spe*I in frame with the N- or C-terminal fragments of YFP, generating four distinct fusion proteins. The coding sequences of HPt2, 7 and 9 were cloned via *Spe*I in frame with the C-terminal fragment of YFP, generating one fusion protein by using pSPYCE(MR) plasmid only.

Bimolecular fluorescent complementation

Transient transformation of *Catharanthus roseus* cells by particle bombardment and YFP imaging were performed according to Guirimand et al. (2009) with adaptation for BiFC assays (Guirimand et al. 2010).

Results

Validation of HK1-CP dimerization in planta

To confirm whether HK1 is also able to homodimerize *in planta*, we conducted a BiFC analysis of this interaction. As shown in Figure 1(A), HK1-CP is able to self-interact in yeast. In *C. roseus* cells, co-transformations of plasmids expressing the split-YFP fragments fused to the N-terminal extremity of HK1-CP (e.g. YFP^N-HK1-CP/YFP^C-HK1-CP) allowed the formation of a BiFC complex visualized as a fluorescent signal within the cytosol of cells (Figure 1(D),(E)). On the other hand, no fluorescence was detected when the split-YFP fragments were fused to the C-terminal of HK1-CP (Figure 1(B),(C)) or in opposite orientations (Figure 1(F),(G)). No YFP reconstitution could be visualized when co-expressing the fusion protein YFP^N-HK1-CP with YFP^C, thereby validating the specificity of this interaction (Figure 1(H),(I)). These results show that HK1-CP is able to homodimerize *in planta*.

Validation of partnerships between HK1 and HPt2, 7 and 9 in planta

Héricourt et al. (2013) realized an exhaustive interaction study in yeast between HK1-CP and HPts highlighting three of them as preferential

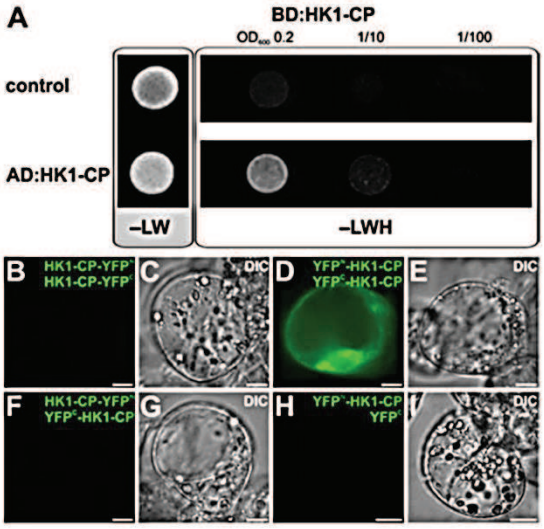


Figure 1. HK1-CP forms homodimer in Y2H and BiFC assays. (A) Y2H analysis with yeast cells co-expressing HK1-CP fused to the LexA binding domain (BD: HK1-CP) and fused to the GAL4 activation domain (AD: HK1-CP). Yeast cells were dropped on -LW or -LWH (5 mM of 3AT) media. Two dilutions of each culture were dropped on -LWH (5 mM of 3AT) medium. (B) Cells of *C. roseus* were co-transformed using the indicated YFP-N and YFP-C fusion proteins. Panels B, D, F and H show the fluorescence signal, and C, E, G and I the morphology by differential interference contrast (DIC) microscopy. Scale bar: 10 μm.

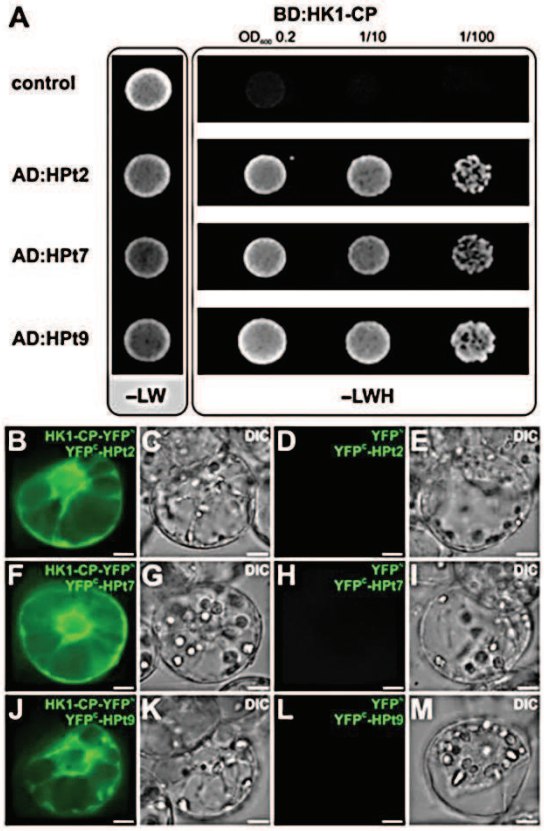


Figure 2. HK1-CP interacts with HPt2, 7 and 9 in Y2H and BiFC assays. (A) Y2H analysis with yeast cells co-expressing HK1-CP fused to the LexA binding domain (BD: HK1-CP) and HPt2, 7 or 9 fused to the GAL4 activation domain (AD: HPts). Yeast cells were dropped on -LW or -LWH (5 mM of 3AT) media. Two dilutions of each culture were dropped on -LWH (5 mM of 3AT) medium. (B) Cells of *C. roseus* were co-transformed using the indicated YFP-N and YFP-C fusion proteins. Panels B, D, F, H, J and L show the fluorescence signal, and C, E, G, I, K and M the morphology by DIC microscopy. Scale bar: 10 μm.

partners: HPt2, 7 and 9. We decided to confirm in plant cells the pertinence of these interactions by BiFC assays. As shown in Figure 2(A), HK1-CP interacted with HPt2, 7 and 9 in yeast as expected (Héricourt et al. 2013). When HK1-CP protein was co-expressed with HPts, a BiFC signal was observed in the cytosol for HPt2 (Figure 2(B),(C)), HPt7 (Figure 2(F),(G)) and HPt9 (Figure 2(J),(K)), indicating an interaction between these different proteins in plant cells. Regarding these interactions, the fusion protein orientations were also essential because no fluorescence was detected when we used YFP-HK1-CP orientation (data not shown). The specificity of HK1-CP/HPt interactions was validated by the absence of signal when the split N-terminal of YFP alone was co-expressed with HPts (YFP^C-HPts) (Figure 2(D),(E),(H),(I),(L),(M)). These results show that HK1-CP is able to interact with these three HPt proteins *in planta*.

Discussion

In the present study, we confirmed *in planta* HK1 homodimerization and HK1 interactions with its preferential downstream HPt proteins.

The capacity of HK1-CP to self-interact observed via BiFC assays corroborates the results obtained by the heterologous yeast system (Héricourt et al. 2013), showing that HK1-CP is organized as homodimer. It was previously shown that only the transmitter domain (TD) of HK1 was necessary for this interaction (Héricourt et al. 2013) due to the presence of a coiled-coil motif upstream of the TD, in agreement with our observations since a YFP reconstitution is only visualized when the split-YFP is fused to the N-terminal extremity of HK1-CP (i.e. upstream of the TD). Such homodimerization seems to be a common feature of AHK receptors, such as ethylene receptors (Gao et al. 2008; Grefen et al. 2008). The cytokinin receptors AHK2, AHK3, AHK4 and CKI1 are also reported to form dimers (Dortay et al. 2006; Hejátko et al. 2009; Caesar et al. 2011; Wulfetange et al. 2011). However, in *Arabidopsis* and other plants, no interaction study

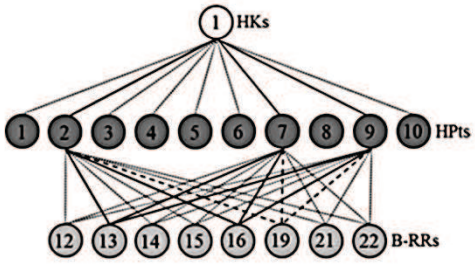


Figure 3. Protein–protein interactions model of HK1 pathway in *Populus*. The gene number designation of different family protein is noted in a circle. The verified interactions by both Y2H and BiFC are indicated by a line. Dashed lines correspond to the interactions observed only by Y2H system (…..) or by BiFC (--). The white circle indicates a self-interaction protein.

about the capacity of an osmosensor to form dimers was conducted *in planta*. Thus, up to now, these data on poplar HK1 constitute the first evidence of an osmosensor homodimerization *in planta*.

Furthermore, in this study we showed that HK1, a poplar osmosensor, is also able to interact with HPt2, 7 and 9 *in planta*. Only the configuration of the split-YFP fused to the C-terminal of HK1-CP, downstream the receiver domain (RD) which is involved in interaction interface of HK1 with HPt proteins, allows a complete reconstitution of YFP at the time of interaction with HPts. These observations corroborate results obtained in *Arabidopsis* by Pekárová et al. (2011) showing that CKI1-RD was necessary and sufficient to determine the interaction specificity with AHPs.

Several recent interaction studies using a combination of Y2H and BiFC approaches emerged. Some studies were able to substantiate protein–protein interaction *in planta* despite the lack of detected interaction in yeast (Cutcliffe et al. 2011; Bertheau et al. 2012). Pekárová et al. (2011) confirmed their interaction results by showing similar interactions between CKI1-RD and AHP2, 3, 5 in yeast and *in planta*. On the other hand, Mira-Rodado et al. (2012) showed that some interactions between AHK5 and AHPs detected in yeast did not have functional relevance in *Arabidopsis*. Thus, the confirmation of protein–protein interactions using different techniques appears essential. Until now, in *Arabidopsis*, only Y2H assays indicated that AHP2 seems to be a potential partner for AHK1 (Urao et al. 2000), but without interaction study *in planta* to corroborate this result.

Thus, the present work confirms and validates HPt2, 7 and 9 as potential downstream partners of HK1 in a multistep phosphorelay pathway in poplar. Figure 3 summarizes all protein interactions among the poplar HK1 signalling pathway between HK1/HPts (Chefdor et al. 2006; Héricourt et al. 2013) and HPts/B-RRs (Bertheau et al. 2012) observed by Y2H and/or BiFC.

Funding

This research was financially supported by grants from Conseil Régional du Centre and Conseil Général du Loiret. LB was supported by a PhD grant of the Conseil Régional du Centre, France.

References

Bertheau L, Chefdor F, Guirimand G, Courdavault V, Depierreux C, Morabito D, et al. 2012. Identification of five B-type response regulators as members of a multistep phosphorelay system interacting with histidine-containing phosphotransfer partners of *Populus* osmosensor. BMC Plant Biol 12: 241. doi:10.1186/1471-2229-12-241.

Caesar K, Thamm AMK, Witthöft J, Elgass K, Huppenberger P, Grefen C, et al. 2011. Evidence for the localization of the *Arabidopsis* cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. J Exp Bot 62: 5571–5580.

Chefdor F, Bénédetti H, Depierreux C, Delmotte F, Morabito D, Carpin S. 2006. Osmotic stress sensing in *Populus*: Components identification of a phosphorelay system. FEBS Lett 580: 77–81.

Cutcliffe JW, Hellmann E, Heyl A, Rashotte AM. 2011. CRFs form protein-protein interactions with each other and with members of the cytokinin signalling pathway in *Arabidopsis* via the CRF domain. J Exp Bot 62: 4995–5002.

Deng Y, Dong H, Mu J, Ren B, Zheng B, Ji Z, et al. 2010. *Arabidopsis* histidine kinase CKI1 acts upstream of histidine phosphotransfer proteins to regulate female gametophyte development and vegetative growth. Plant Cell 22: 1232–1248.

Desikan R, Horák J, Chaban C, Mira-Rodado V, Witthöft J, Elgass K, et al. 2008. The histidine kinase AHK5 integrates endogenous and environmental signals in *Arabidopsis* guard cells. Plos One 3: e2491. doi:10.1371/journal.pone.0002491.

Dortay H, Mehnert N, Bürkle L, Schmülling T, Heyl A. 2006. Analysis of protein interactions within the cytokinin-signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*. FEBS J 273: 4631–4644.

Durand TC, Baillif P, Albéric P, Carpin S, Label P, Hausman J-F, et al. 2011a. Cadmium and zinc are differentially distributed in *Populus tremula* × *P. alba* exposed to metal excess. Plant Biosyst 145: 397–405.

Durand T, Sergeant K, Renaut J, Planchon S, Hoffmann L, Carpin S, et al. 2011b. Poplar under drought: Comparison of leaf and cambial proteomic responses. J Proteomics 74: 1396–1410.

Durand TC, Sergeant K, Carpin S, Label P, Morabito D, Hausman J-F, et al. 2012. Screening forchanges in leaf and cambial proteome of *Populus tremula* × *P. alba* under different heat constraints. J Plant Physiol 169: 1698–1718.

Gao Z, Wen C-K, Binder BM, Chen Y-F, Chang J, Chiang Y-H, et al. 2008. Heteromeric interactions among ethylene receptors mediate signaling in *Arabidopsis*. J Biol Chem 283: 23801–23810.

Grefen C, Harter K. 2004. Plant two-component systems: Principles, functions, complexity and cross talk. Planta 219: 733–742.

Grefen C, Städele K, Růžička K, Obrdlik P, Harter K, Horák J. 2008. Subcellular localization and *in vivo* interactions of the *Arabidopsis thaliana* ethylene receptor family members. Mol Plant 1: 308–320.

Guirimand G, Burlat V, Oudin A, Lanoue A, St-Pierre B, Courdavault V. 2009. Optimization of the transient transformation of *Catharanthus roseus* cells by particle bombardment and its application to the subcellular localization of hydroxymethyl-

butenyl 4-diphosphate synthase and geraniol 10-hydroxylase. Plant Cell Rep 28: 1215–1234.

Guirimand G, Courdavault V, Lanoue A, Mahroug S, Guihur A, Blanc N, et al. 2010. Strictosidine activation in Apocynaceae: Towards a "nuclear time bomb"? BMC Plant Biol 10: 182. doi:10.1186/1471-2229-10-182.

Hejátko J, Pernisová M, Eneva T, Palme K, Brzobohatý B. 2003. The putative sensor histidine kinase CKI1 is involved in female gametophyte development in *Arabidopsis*. Mol Gen Genomics 269: 443–453.

Hejátko J, Ryu H, Kim G-T, Dobešová R, Choi S, Choi SM, et al. 2009. The histidine kinases cytokinin-independent1 and *Arabidopsis* histidine kinase 2 and 3 regulate vascular tissue development in *Arabidopsis* shoots. Plant Cell 21: 2008–2021.

Héricourt F, Chefdor F, Bertheau L, Tanigawa M, Maeda T, Guirimand G, et al. 2013. Characterization of histidine-aspartate kinase HK1 and identification of histidine phospho-transfer proteins as potential partners in a *Populus* multistep phosphorelay. Physiol Plantarum. 149: 188–199.

Higuchi M, Pischke MS, Mähönen AP, Miyawaki K, Hashimoto Y, Seki M, et al. 2004. *In planta* functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. PNAS 101: 8821–8826.

Hwang I, Chen H-C, Sheen J. 2002. Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*. Plant Physiol 129: 500–515.

Iwama A, Yamashino T, Tanaka Y, Sakakibara H, Kakimoto T, Sato S, et al. 2007. AHK5 histidine kinase regulates root elongation through an ETR1-dependent abscisic acid and ethylene signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol 48: 375–380.

Kumar MN, Jane W-N, Verslues PE. 2013. Role of the putative osmosensor *Arabidopsis* histidine kinase1 in dehydration avoidance and low water potential response. Plant Physiol 161: 942–953.

Mira-Rodado V, Veerabagu M, Witthöft J, Teply J, Harter K, Desikan R. 2012. Identification of two-component system elements downstream of AHK5 in the stomatal closure response of *Arabidopsis thaliana*. Plant Signal Behav 7: 1467–1476.

Nishimura C, Ohashi Y, Sato S, Kato T, Tabata S, Ueguchi C. 2004. Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. Plant Cell 16: 1365–1377.

Pal'ove-Balang P, Mistrík I. 2011. Effect of aluminium on nitrogen assimilation in roots of *Lotus japonicus*. Plant Biosyst 145: 527–531.

Pekárová B, Klumpler T, Trísková O, Horák J, Jansen S, Dopitová R, et al. 2011. Structure and binding specificity of the receiver domain of sensor histidine kinase CKI1 from *Arabidopsis thaliana*. Plant J 67: 827–839.

Pils B, Heyl A. 2009. Unraveling the evolution of cytokinin signaling. Plant Physiol 151: 782–791.

Pischke MS, Jones LG, Otsuga D, Fernandez DE, Drews GN, Sussman MR. 2002. An *Arabidopsis* histidine kinase is essential for megagametogenesis. PNAS 99: 15800–15805.

Rahman MM, Chongling Y, Rahman MDM, Islam KS. 2012. Effects of copper on growth, accumulation, antioxidant activity and malondialdehyde content in young seedlings of the mangrove species *Kandelia candel* (L.). Plant Biosyst 146: 47–57.

Riefler M, Novak O, Strnad M, Schmülling T. 2006. *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. Plant Cell 18: 40–54.

Scippa SG, Trupiano D, Rocco M, Di Iorio A, Chiatante D. 2008. Unravelling the response of poplar (*Populus nigra*) roots to mechanical stress imposed by bending. Plant Biosyst 142: 401–413.

Tran L-SP, Urao T, Qin F, Maruyama K, Kakimoto T, Shinozaki K, et al. 2007. Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. PNAS 104: 20623–20628.

Trupiano D, Di Iorio A, Montagnoli A, Lasserre B, Rocco M, Grosso A. 2012a. Involvement of lignin and hormones in the response of woody poplar taproots to mechanical stress. Physiol Plant 146: 39–52.

Trupiano D, Renzoni G, Rocco M, Scaloni A, Viscosi V, Chiatante D, et al. 2012b. The proteome of *Populus nigra* woody root: Response to bending. Ann Bot 11: 415–432.

Urao T, Miyata S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2000. Possible His to Asp phosphorelay signaling in an *Arabidopsis* two-component system. FEBS Lett 478: 227–232.

Urao T, Yakubov B, Satoh R, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M, Hirayama T, et al. 1999. A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. Plant Cell 11: 1743–1754.

Waadt R, Schmidt LK, Lohse M, Hashimoto K, Bock R, Kudla J. 2008. Multicolor bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous formation of alternative CBL/CIPK complexes *in planta*. Plant J 56: 505–516.

Wohlbach DJ, Quirino BF, Sussman MR. 2008. Analysis of the *Arabidopsis* histidine kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation. Plant Cell 20: 1101–1117.

Wulfetange K, Lomin SN, Romanov GA, Stolz A, Heyl A, Schmülling T. 2011. The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum. Plant Physiol 156: 1808–1818.

III. ÉTUDES COMPLÉMENTAIRES

En comparant le système de transduction de la contrainte osmotique sous le contrôle de Sln1p chez la levure à celui de la transduction du signal CK par les différents récepteurs HK chez *Arabidopsis*, une différence fondamentale ressort, à savoir l'état de phosphorylation du récepteur en fonction de la présence ou de l'absence du signal. En effet, en condition normale de croissance de la levure, c'est-à-dire sans signal extérieur, Sln1p est phosphorylée, contrairement aux HK récepteurs des CK qui ne sont phosphorylés que lors de la fixation de cette phytohormone. On peut ainsi s'interroger sur le mode de fonctionnement du récepteur de la contrainte osmotique chez les plantes et de l'impact du stress sur son état de phosphorylation.

Initialement, l'objectif de la présente étude était de confirmer la dimérisation de HK1 et l'interaction HK1/HPt2, observées chez la levure, *in planta* par BiFC en exprimant la protéine HK1 complète, et non plus la forme tronquée HK1-CP. De plus, cette étude visait également à obtenir des indices de manière indirecte sur l'état de phosphorylation de HK1 en condition normale de croissance des cellules de peuplier et en condition de stress hyper-osmotique, et de déterminer son impact sur son interaction avec HPt2. La stratégie de cette étude était donc de comparer les résultats d'interaction de HK1 (forme sauvage) avec HPt2 en conditions normale et de stress osmotique des cellules, aux résultats d'interactions de formes mutées de HK1, l'une mimant sa forme phosphorylée (D/E) et l'autre sa forme non phosphorylée (D/N), avec HPt2. Ce travail a été mené durant une année afin d'obtenir la totalité des constructions nécessaires aux expériences BiFC, mais n'a pas abouti en raison d'une absence de signal d'interaction de la protéine HK1 pleine longueur sur elle-même. Etant donné les résultats négatifs concernant la dimérisation de HK1 protéine complète, les interactions *in planta* de HK1 avec les protéines HPt n'ont pour le moment pas été testées. Cependant, les constructions nécessaires aux expériences BiFC ont été réalisées et sont disponibles.

Grefen et collaborateurs (2008) ont déclaré également que leurs tests d'interaction en levure par double-hydride (système ubiquitine, Grefen *et al.*, 2007) et *in planta* par BiFC concernant des protéines complètes d'HK récepteurs éthylène ont échoué dans l'obtention de preuve d'interaction *in vivo*. Les auteurs ont avancé l'hypothèse que l'organisation structurale des parties cytoplasmiques des protéines complètes HK engendrerait une distance trop importante entre les deux monomères de la protéine à reconstituer (YFP ou ubiquitine) malgré l'interaction potentielle entre les deux protéines HK. Cette distance minimale étant nécessaire à la visualisation de l'interaction du complexe BiFC ou à l'activation de gènes rapporteurs, aucune interaction *in planta* et en levure n'a pu être mise en évidence. Cependant, deux études d'interaction *in planta* concernant AHK2 (Wulfetange *et al.*, 2011) et CKI1 (Hejátko *et al.*, 2009) ont montré une dimérisation des récepteurs par utilisation

des protéines complètes fusionnées en partie C-terminale avec la moitié N- ou C-terminale de la YFP.

Dans notre cas, l'absence de signal reflétant la dimérisation de la protéine complète HK1 reste pour le moment inexpliquée. Deux hypothèses sont alors envisageables.

La première, basée sur les travaux de Grefen et collaborateurs (2008), serait liée à une impossibilité de reconstitution des moitiés de la protéine fluorescente, malgré l'interaction des deux monomères. En effet, le domaine impliqué dans cette interaction est le domaine donneur de phosphate (TD) puisque lors de l'utilisation de la partie CP de HK1, seule la fusion de la moitié YFP en N-terminale de HK1 autorise la visualisation de l'interaction en BiFC. Ce qui suggère que la fusion en C-terminale en aval du domaine receveur de phosphate induit une distance trop importante entre les deux moitiés YFP (ARTICLE II). Ainsi, l'absence de signal BiFC lors de l'utilisation de protéine HK1 complète peut être expliquée par le fait que la fusion de la YFP en C-terminale de HK1 ne permet pas une distance minimale pour une reconstitution de la protéine YFP (FIGURE 18).
Pour contrecarrer ce type de problème, l'utilisation de systèmes double-hydride indépendants de l'utilisation de protéines membranaires ou de la reconstitution de protéines complètes est envisageable. De plus, d'autres approches permettant de mettre en évidence des interactions entre protéines *in planta* en contournant les problèmes rencontrés liés à la nature des protéines testées peuvent être utilisées. Grefen et collaborateurs (2008) ont proposé une alternative au BiFC et au (**F**örster **R**esonance **E**nergy **T**ransfer), appelée MeRA (**Me**mbrane **R**ecruitment **A**ssays) qui succinctement implique l'interaction entre deux protéines cibles, l'une fusionnée à une protéine membranaire fluorescente (RFP) « appât » et l'autre à une protéine cytoplasmique fluorescente (GFP) "proie".

La deuxième hypothèse pourrait être à relier au mode de détection de la contrainte osmotique par le récepteur. En effet, chez la levure (Tanigawa *et al.,* 2012), comme déjà abordé précédemment, l'osmosenseur Sln1p serait enchâssé fermement dans des radeaux lipidiques membranaires lui permettant en conditions normales de maintenir physiquement son état dimérique nécessaire à son activité kinase et ainsi assurer efficacement le relais du phosphate aux autres molécules "signal". Ces auteurs ont montré qu'une diminution au niveau des sphingolipides *via* des mutations des enzymes clés des étapes de biosynthèse ou un stress osmotique inhiberait le fonctionnement de Sln1p et donc provoquerait l'activation de la voie HOG. Ainsi, ces résultats suggèrent que ces radeaux lipidiques sont déterminants pour autoriser ou empêcher des interactions entre protéines en fonction d'un signal reçu. Dans notre cas, on peut s'interroger quant à la nécessité du signal pour la formation du dimère. Les osmosenseurs sont-ils constitutivement sous forme dimérique ? Quel est l'impact du stress osmotique sur cet état ? De tels radeaux lipidiques mis en évidence chez la levure, gouvernent-ils de manière identique le fonctionnement des osmosenseurs chez les plantes ?

Chapitre III

Identification des RR-B partenaires des HPt interacteurs de HK1

I. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE

Malgré l'identification et la caractérisation systématique des membres appartenant à ces systèmes de phosphorylation multiple chez de nombreuses espèces de plante, très peu de protéines ont été identifiées comme protagonistes dans la voie de signalisation stress osmotique. En effet, chez *Arabidopsis* AHK1, certains RR de type-A ainsi qu'un RR de type-B, l'ARR18, sembleraient y exercer un rôle (Tran *et al.*, 2007; Wohlbach *et al.*, 2008; Veerabagu, 2011). Il existe également peu d'informations sur les réseaux d'interactions entre partenaires impliqués dans cette voie. Seule la capacité de trois HPt (AHP1, 2 et 3) a interagir avec AHK1 a été testée par utilisation du système double-hydride, dégageant ainsi AHP2 comme potentiel interacteur de cette HK (Urao *et al.*, 2000). Parmi les RR-B, de nombreuses études indépendantes ont montré que les ARR1, 2, 10, 11, 14 et le 18 pouvaient interagir avec AHP2 (TABLEAU 4).

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude était d'analyser et de dégager un éventuel partenariat d'interaction entre les trois HPt partenaires de HK1 (HPt2, 7 et 9) et la totalité des RR-B de peuplier.

Après isolement des différents RR de type-B, nous nous sommes interrogés sur plusieurs points concernant leur capacité d'interaction avec les protéines HPt :

- Les RR-B sont-ils tous capables d'interagir avec les HPt ?
- Est-ce que certains membres peuvent se dégager des autres en terme de profil d'interaction ?

Afin de répondre à cet objectif, les interactions HPt/RR-B ont été étudiées conjointement, en levure par utilisation du système double-hydride, et *in planta* par BiFC. De manière identique à l'ARTICLE I, le partenariat d'interactions potentielles a été confirmé par étude de co-expression des transcrits correspondant aux partenaires.

II. PRINCIPAUX RÉSULTATS

A l'issue de cette étude, huit ADNc de RR de type-B ont pu être isolés (RR12-16, 19-21). Une pré-analyse globale des interactions HPt/RR a été menée chez la levure, permettant de sélectionner et de valider certaines interactions *in planta*. Bien que la localisation nucléaire de cette interaction soit fortement suspectée, elle a été montrée pour la première fois dans ce travail, corroborant ainsi la localisation nucléo-cytoplasmique et nucléaire des HPt et des RR respectivement. Etant donné que tous les RR-B sont capables d'interagir avec les trois HPt, l'étude de co-expression des transcrits *in planta* a permis de juger de la pertinence de ces interactions en mettant en évidence cinq RR-B, qui présentent une co-expression spatiale avec les trois HPt. Ces dernières sont elles-mêmes

co-exprimées avec les transcrits de *HK1*. Ce travail finalise donc les études précédentes en dessinant un réseau d'interactions de protéines pouvant être impliqué potentiellement dans la transduction du signal de la contrainte osmotique.

L'ensemble de ce travail est présenté dans l'ARTICLE III.

ARTICLE III

Identification of five B-type response regulators as members of the multistep phosphorelay system interating with histidine-containing phosphotranfer partners of *Populus* osmosensor

En ligne dans BMC plant Biology : L. Bertheau, F. Chefdor, G. Guirimand, V. Courdavault, C. Depierreux, D. Morabito, F. Brignolas, F. Héricourt, S. Carpin (2012)

Bertheau *et al. BMC Plant Biology* 2012, **12**:241
http://www.biomedcentral.com/1471-2229/12/241

BMC Plant Biology

RESEARCH ARTICLE Open Access

Identification of five B-type response regulators as members of a multistep phosphorelay system interacting with histidine-containing phosphotransfer partners of *Populus* osmosensor

Lucie Bertheau[1,2], Françoise Chefdor[1,2], Grégory Guirimand[3], Vincent Courdavault[3], Christiane Depierreux[1,2], Domenico Morabito[1,2], Franck Brignolas[1,2], François Héricourt[1,2] and Sabine Carpin[1,2*]

Abstract

Background: In plants, the multistep phosphorelay signaling pathway mediates responses to environmental factors and plant hormones. This system is composed of three successive partners: hybrid Histidine-aspartate Kinases (HKs), Histidine-containing Phosphotransfer proteins (HPts), and Response Regulators (RRs). Among the third partners, B-type RR family members are the final output elements of the pathway; they act as transcription factors and clearly play a pivotal role in the early response to cytokinin in *Arabidopsis*. While interactions studies between partners belonging to the multistep phosphorelay system are mainly focused on protagonists involved in cytokinin or ethylene pathways, very few reports are available concerning partners of osmotic stress signaling pathway.

Results: In *Populus*, we identified eight B-type RR proteins, RR12-16, 19, 21 and 22 in the Dorskamp genotype. To assess HPt/B-type RR interactions and consequently determine potential third partners in the osmosensing multistep phosphorelay system, we performed global yeast two-hybrid (Y2H) assays in combination with Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) assays in plant cells. We found that all B-type RRs are able to interact with HPt predominant partners (HPt2, 7 and 9) of HK1, which is putatively involved in the osmosensing pathway. However, different profiles of interaction are observed depending on the studied HPt. HPt/RR interactions displayed a nuclear localization, while the nuclear and cytosolic localization of HPt and nuclear localization of RR proteins were validated. Although the nuclear localization of HPt/RR interaction was expected, this work constitutes the first evidence of such an interaction in plants. Furthermore, the pertinence of this partnership is reinforced by highlighting a co-expression of B-type RR transcripts and the other partners (HK1 and HPts) belonging to a potential osmosensing pathway.

Conclusion: Based on the interaction studies between identified B-type RR and HPt proteins, and the co-expression analysis of transcripts of these potential partners in poplar organs, our results favor the model that RR12, 13, 14, 16 and 19 are able to interact with the main partners of HK1, HPt2, 7 and 9, and this HPt/RR interaction occurs within the nucleus. On the whole, the five B-type RRs of interest could be third protagonists putatively involved in the osmosensing signaling pathway in *Populus*.

Keywords: Response Regulator (RR), Histidine-containing Phosphotransfer protein (HPt), Osmosensing pathway, *Populus*

* Correspondence: sabine.carpin@univ-orleans.fr
[1]Université d'Orléans, UFR-Faculté des Sciences, UPRES EA 1207, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures (LBLGC), BP 6759, Orléans F-45067, France
[2]INRA, USC1328, Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales (ARCHE), BP 6759, Orléans F-45067, France
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2012 Bertheau et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background

Plants display sophisticated sensing and signaling systems which elicit a variety of responses to environmental signals such as drought or osmotic stress, and to plant hormones including cytokinin. The resulting intracellular signal transduction relies notably on phosphorylation events, which are mediated by multistep phosphorelay signaling. This system involves three components: a hybrid Histidine-aspartate Kinase (HK) receptor, Histidine-containing Phosphotransfer proteins (HPt) and Response Regulators (RR). One of the best characterized corresponding systems is the osmo-responsive pathway operating in yeast. This system is composed of the HK receptor, Sln1p, the HPt, Ypd1p and the RR, Ssk1p [1,2]. The phosphorelay consists in transferring phosphate from His-to-Asp residues between the different partners. Under hyper-osmolarity conditions, Sln1p is inactive and unphosphorylated, leading to the accumulation of unphosphorylated cytoplasmic RR Ssk1p. This active form of Ssk1p is then able to activate the HOG1 MAP kinase pathway that induces genes expression, leading to cell protection by glycerol synthesis. In *Arabidopsis thaliana*, multistep phosphorelay members similar to the one found in yeast are involved in signaling pathways: *Arabidopsis* histidine kinases (AHKs), *Arabidopsis* histidine-phosphotransfer proteins (AHPs) and *Arabidopsis* response regulators (ARR) [3]. The AHK family consists of six hybrid histidine protein kinases, AHK1, AHK2, AHK3, AHK4 (CRE1/WOL), AHK5 and CKI1. These latters, CKI1 and AHK5, are involved in megagametophyte development [4-6] and stomatal closure [7] respectively. This family also includes the cytokinin receptors AHK2, AHK3, AHK4 [8-11] and AHK1 which is the first partner of the osmosensing pathway displaying an osmosensor function in both models, yeast and *Arabidopsis* [12,13]. This latter also plays a role in the regulation of desiccation processes during seed maturation [14]. Contrary to AHK1, cytokinin receptors AHK2, 3 and 4 function as negative regulators of osmotic stress [13]. Concerning the second partner, 5 AHPs mediate the phosphorelay between AHKs and ARRs. Urao *et al.* found that the osmosensor receptor, AHK1, is only able to interact with one HPt protein AHP2 [15]. An interaction network study of multistep phosphorelay signaling pathway members performed by yeast two-hybrid assays showed interactions of AHP2 with some ARRs [16,17]. On the basis of a structural comparaison of amino acid sequences, the members of the ARR family were subdivided into four distinct groups including A-type, B-type, C-type and pseudo-RRs [3,18]. Among these groups, the B-type RR family members are assumed to function as crucial transcriptional regulators in the His-to-Asp phosphorelay signal transduction network. Such RRs are composed of a phosphate receiver domain with the conserved D-D-K motif (RR domain), and a large C-terminal extension mediating sequence specific DNA-binding domain referred to originally as the B motif [3,19]. According to Riechmann's classification [20], the B motif appears to be a representative of the plant single Myb-related domains, which belong to the GARP subfamily. The GARP domain or B motif is specific to transcription factors found only in plant, and its name derives from its discovery inside the maize GOLDEN2 gene sequence, the B-type ARR proteins from *Arabidopsis*, and Psr1 from *Chlamydomonas* [20]. The C-terminal extension contains a transcriptional activation region which is rich both in proline and glutamine residues, as it is usually met in transcriptional activators [21] and also nuclear localization signals (NLSs) responsible for the B-type RRs targeting to the nucleus [22-27]. Within the eleven members of B-type RR family identified in *Arabidopsis* (ARR1, 2, 10, 11, 12, 13, 14, 18, 19, 20, 21), some interacting partners of AHP2 [16,17,28] have been shown to be associated with cytokinin signal transduction [29-32]. This signal is relayed from membrane to nucleus where these RRs function as transcription factors that operate in the last step of the primary cytokinin response pathway. Although *B-type RR* genes expression is not cytokinin inducible, B-type RRs function as positive regulators of the cytokinin signaling pathway [31-34] by enhancing transcription of cytokinin target genes, including A-type ARRs [25,29], which act in turn as negative regulators allowing a feedback control of the pathway [25,35]. While B-type RRs involvement in cytokinin signaling pathway has been studied in detail, little is known about their role in osmosensing signaling pathway in other plants than *Arabidopsis* and more particularly in woody plants. In *Populus trichocarpa*, 11 A-type, 11 B-type, 10 C-type and 17 pseudo RRs have been identified to date [18,36]. A transcriptomic analysis revealed that some genes corresponding to cytokinin signaling pathway components (HK, HPt and RR) were regulated during shoot organogenesis in hybrid poplar 717-1B4 genotype [37]. Moreover, in the same genotype, Ramirez-Carvajal *et al.* [38], showed that RR13 acted downstream of cytokinin pathway by repressing adventitious root formation. In poplar Dorskamp genotype, we identified a putative osmosensor, HK1 [39], as well as ten HPts (HPt1 to HPt10). A recent study led us to propose HPt2, 7 and 9 as specific partners of HK1 in the *Populus* osmosensing signaling pathway [40].

To characterize in more detail the molecular mechanisms involved in the poplar osmosensing pathway, we undertook to analyze potential interactions of the three HPt partners of HK1 (HPt2, 7 and 9) with the different B-type RRs. As a consequence, we isolated eight B-type RRs in our poplar genotype and performed interaction tests by yeast two-hybrid (Y2H) and Bimolecular

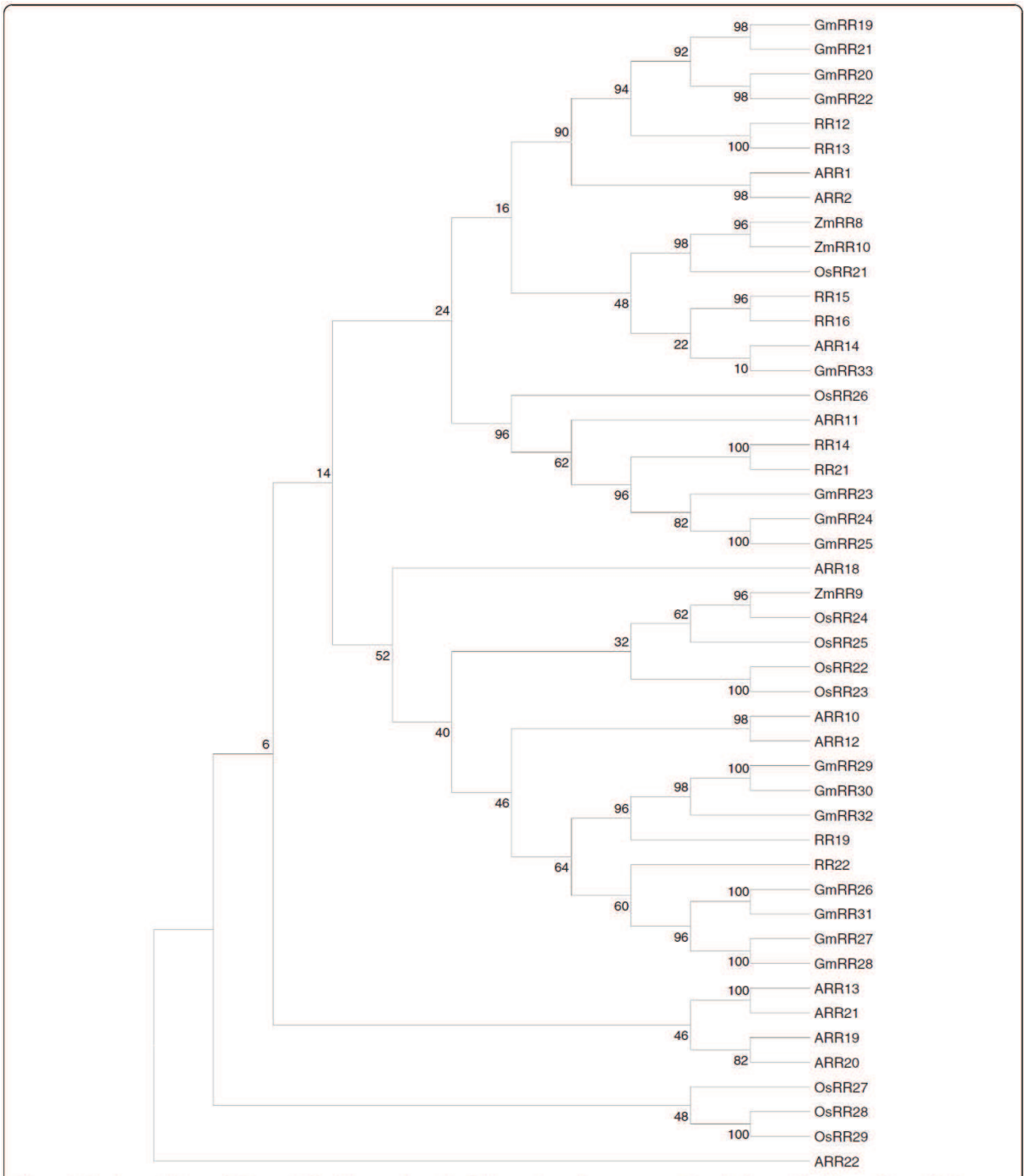


Figure 1 Phylogenetic tree of B-type RR family members. The full-length protein sequences of poplar B-type RRs deduced from cDNA sequences (EMBL: FN908138 to FN908145) were aligned using Muscle [41] with those of *Arabidopsis* (ARRs), soybean (GmRRs), maize (ZmRRs) and rice (OsRRs), obtained from respective genome databases (Additional file 2). Maximum likelihood tree reconstructions were performed with MEGA 5 [42] using the JTT substitution model [43]. The C-type ARR22 from *Arabidopsis* was used as outgroup. Numbers indicate bootstrap support (1000 replicates).

Fluorescence Complementation (BiFC) assays. These tests showed that the three HPts interact with eight B-type RRs and presented distinct interaction profiles based on different level of reporter gene activation. The interaction study *in planta* for some B-type RRs by BiFC assays confirmed a nuclear localization of HPt/B-RR interactions. The co-expression of some B-type RR and HPt transcripts in same poplar organs led us to highlight five of them as potential partners for these three HPt proteins.

Results

Isolation of eight poplar B-type response regulators

On the basis of *Populus* genomic resources, we isolated eight cDNAs encoding B-type RRs from a root cDNA library: RR12, 13, 14, 15, 16, 19, 21, 22 (EMBL: FN908138 to FN908145). We did not succeed in isolating RR17, 18 and 20. Deduced amino acid sequences of these newly isolated poplar B-type RRs share a common structural design composed of the phospho-accepting receiver domain, the GARP DNA-binding domain and two putative NLSs. The phylogenetic relationships of these B-type RRs with those of model plant species, *Arabidopsis thaliana* (ARRs), *Zea mays* (ZmRRs), *Glycine max* (GmRRs), and *Oryza sativa* (OsRRs), are represented by a rooted tree based on the alignment of B-type RR full-length amino acid sequences (Figure 1). Such analysis revealed that the different B-type RR family members are interspersed in distinct groups independent of

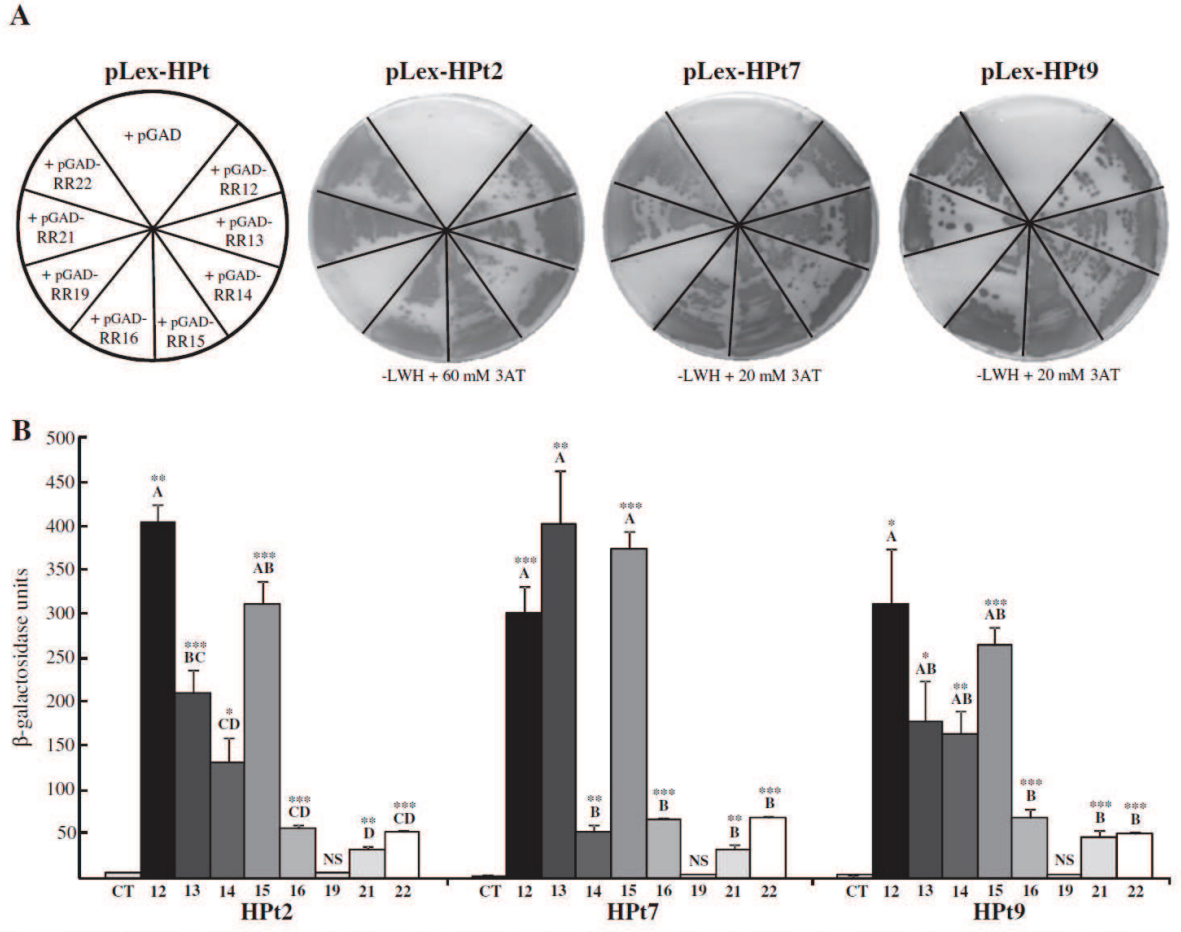


Figure 2 HPt2, HPt7 and HPt9 interact with a subset of B-type RRs in the yeast two-hybrid system. A) X-gal assays of HPt/B-type RR interactions. HPts (HPt2, 7, 9) interactions with B-type RRs (RR12, 13, 14, 15, 16, 19, 21 and 22) as indicated and the corresponding X-gal assay on leucine-tryptophan-histidine lacking medium (–LWH) supplemented with 60 (HPt2) or 20 (HPt6, 7, 9) mM of 3AT. **B**) ß-Galactosidase activity measurements of HPt/B-type RR interactions. Means ± standard error of three independent replicates of ß-Galactosidase activity measurements are presented for each HPt/B-type RR interaction. The negative control (CT) of each HPt is the interaction background between HPt2, 7 or 9 and the empty vector pGAD. The mean values of HPt/RR interactions were compared to their respective negative control by a t-test and asterisks indicate significant differences: *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 and NS for not significant. The mean values of interaction between HPts and RR12, 13, 14, 15, 16, 21, and 22 are compared by ANOVA followed by Scheffe test; different letters indicate significant differences (P ≤ 0.05).

species but in most cases, are classified within groups in species-specific pairs.

HPt2, HPt7 and HPt9 interact with a subset of B-type response regulators in yeast

To study interactions of the three HPts of interest (HPt2, 7, 9) with the eight isolated B-type RRs, we conducted a Y2H analysis. Since B-type RR expression in the "bait" configuration led to a strong autoactivation of the first reporter gene (*HIS3*) (data not shown), all the B-type RRs were used as a "prey" while the three HPts tested were cloned in the "bait" vector. This analysis revealed interactions of the three HPts with seven B-type RRs: RR12, RR13, RR14, RR15, RR16, RR21 and RR22. No interaction was detected between HPts and RR19 using this system (Figure 2A). These results were confirmed by the estimation of the ß-Galactosidase activity corresponding to the second reporter gene activation (Figure 2B). As a control of the interaction background, we used each pLex-HPt in combination with the empty pGAD vector that did not result in significant ß-Galactosidase activity. As expected, similar low levels of activity were also obtained when testing the interaction of the three HPts with RR19. By contrast, we observed that the other RRs interacted significantly with the three HPts. Indeed, for HPt2 and 9 similar patterns of interaction were revealed including a strong ß-Galactosidase activity for RR12, and an intermediate one for RR13, 14 and 15 and a weaker one for RR16, 21 and 22. On the other hand, HPt7 presented an interaction pattern separating RRs in two groups, the first one with a strong ß-Galactosidase activity (RR12, 13 and 15) and the second one exhibiting a weaker activity (RR14, 16, 21 and 22).

HPt/RR interactions occur in the nuclear compartment

To confirm and localize *in planta* the HPt/RR interactions observed in Y2H assays, we tested whether HPts can interact with B-type RRs using BiFC assays in *Catharanthus roseus* cells. For such analysis, four detected interactions in the Y2H system were tested: HPt2/RR13, HPt2/RR16, HPt9/RR13 and HPt9/RR16. Furthermore, in order to substantiate the lack of HPt/RR19 interaction in yeast, BiFC assays were conducted to test the interaction between RR19 and HPt2, 7, 9 *in planta*. HPt2, 7, 9, RR13, 16 and 19 coding sequences were fused either to the N-terminal (YFP^N) or C-terminal (YFP^C) fragments of yellow fluorescent protein (YFP) at their N-terminal end to produce: YFP^N-HPts, YFP^C-HPts and YFP^N-RRs, YFP^C-RRs. During co-transformation experiments, the different combinations of HPt2 and RR13 or RR16 constructs led to the formation of a BiFC complex within plant cells (Figure 3A, E, I, M). This signal perfectly merged with the fluorescence of the cyan fluorescent protein (CFP) nucleus marker (Figure 3A-P) indicating the nuclear localization of this interaction. Similar constructs, utilized to test the interactions HPt9/RR13 and HPt9/RR16 using BiFC assays, revealed a YFP reconstitution in both cases (Figure 4A, E, I, M). Both interaction combinations displayed a nuclear fluorescence signal, as demonstrated by the co-localization with the signal of the co-expressed CFP nucleus marker (Figure 4A-P). As regards RR19, the formation of a BiFC complex within plant cells was observed in case of interaction with HPt2 (Figure 5A, E), HPt7 (Figure 5I, M) and HPt9 (Figure 5Q, U). This signal also perfectly merged with the CFP nucleus marker (Figure 5A-X) indicating the nuclear localization of these three interactions. As a positive control, BiFC complex reconstitution was visualized when co-expressing the fusion proteins bZIP-YFP^N and bZIP-YFP^C, confirming a nuclear localization of homodimers of this known transcription factor (Figure 6A-C). By contrast, no YFP reconstitution could be visualized when co-expressing the fusion proteins YFP^C-HPt2, YFP^N-HPt9, YFP^N-RR13, YFP^C-RR16, YFP^N or YFP^C-RR19 with the fusion protein bZIP-YFP^C or bZIP-YFP^N (Figure 6D-F, G-I, J-L, M-O and Figure 5Ya-b, Za-b), thereby validating the specificity of interaction between B-type RRs (RR13, 16 and 19) and HPts (HPt2, 7 and 9) *in planta*. This interaction study confirmed *in planta* some of the interactions detected by Y2H analysis, between RR13 or RR16 and HPt2 or HPt9. In contrast to Y2H system, BiFC assays highlighted the ability of RR19 to interact with the three HPts of interest. The totality of these HPt/RR interactions occurs in the nuclear compartment.

The nuclear localization of these interactions prompted us to examine the subcellular localization of these different partners, HPt2, HPt9, RR13 and RR16, using transient expression of GFP-fusion proteins within *C. roseus* cells. This study showed that HPt2 (Figure 7A-H) and HPt9 (Figure 7I-P) GFP-fusion proteins displayed both a nuclear and cytosolic localization as illustrated by a perfect merge of fluorescence with the mcherry nucleo-cytosolic marker (Figure 7C, G, K, O). By contrast, the RR13 (Figure 8A-D) and RR16 (Figure 8E-H) GFP-fusion proteins were exclusively localized into the nucleus as demonstrated by the co-localization of the GFP fluorescent signal with the signal of the co-expressed mcherry nuclear marker (Figure 8C, G) validating the RR13 and RR16 nuclear localization.

Expression profile of B-type RRs transcripts in *Populus*

The physiological existence of the interactions observed between HPts and B-type RRs relies on the concomitant presence in plant organs of both partners. As a consequence, the distribution of the transcripts of each protein has been evaluated by RT-PCR approaches. For this

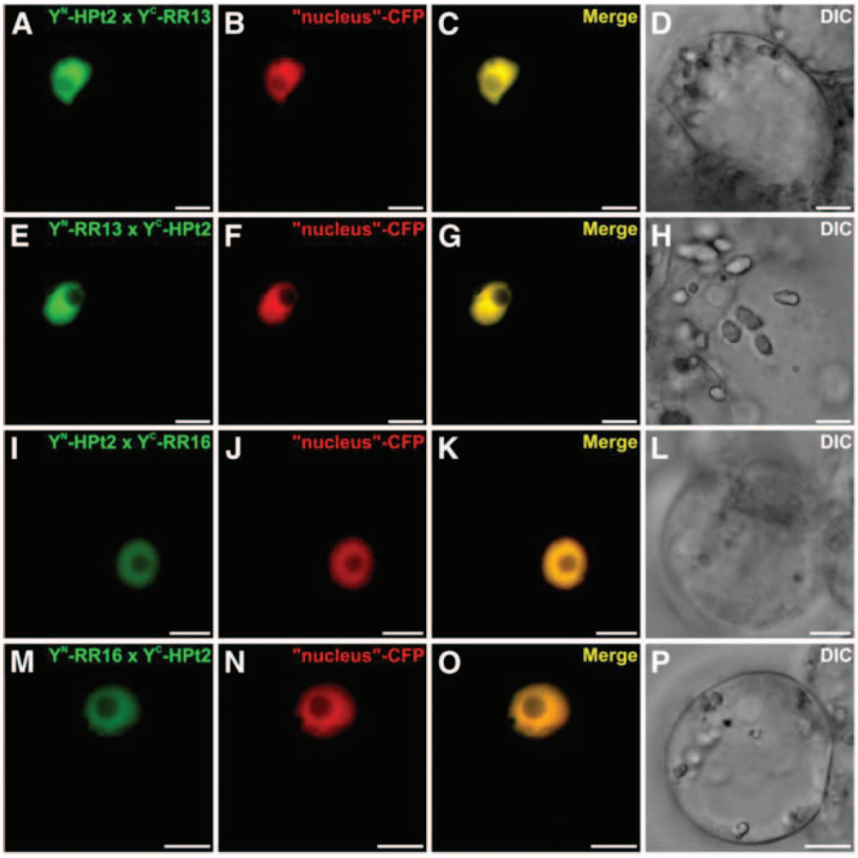


Figure 3 Analysis of HPt2/RR13 and HPt2/RR16 interactions in *C. roseus* cells using BiFC assays. Cells were co-transformed using a combination of plasmids expressing HPt2/RR13 (**A-H**) and HPt2/RR16 (**I-P**) as indicated. For each combination, an additional co-transformation was performed with the CFP nuclear marker (**B, F, J, N**). Co-localization of the two fluorescence signals is shown in the merged image (**C, G, K, O**). The morphology was observed by differential interference contrast (**DIC**) microscopy (**D, H, J, P**). Scale bar = 10 μm.

purpose, RNAs were extracted from various organs (roots, stems, petioles, leaves) of poplar cuttings in control or stressed conditions (treatment by polyethylene glycol 6000 [PEG 6000] at 50 g/L for 10 min duration) and reverse transcribed. The resultant cDNAs were amplified by PCR using specific primers (Additional file 1) for each *B-type RRs* and *Clathrin* gene was used as control (Figure 9C). While the transcripts of *RR13* were detected in all organs and conditions following 30 cycles of amplification (Figure 9A), 10 additional cycles were needed to detect in all organs and conditions the transcripts of *RR12*, *14*, *16* and *19* (Figure 9B). By contrast, the transcripts of *RR15*, *21* and *22* were not detected in these conditions (data not shown). This analysis suggests that among all poplar *B-type RRs*, the transcripts of *RR12*, *13*, *14*, *16* and *19* are more expressed than the others with a more marked expression for *RR13*. Besides, under the conditions of our study, the osmotic constraint applied did not allow to detect marked variations in transcripts expression whatever the *B-type RRs* studied.

Discussion

The B-type response regulators are the final output elements of the His-to-Asp phosphorelay system. In spite of a systematic identification and characterization of the different partners belonging to these systems in *Arabidopsis*, *Zea mays*, *Glycine max*, and *Oryza sativa*, only few members of these systems from herbaceous plants have been identified as drought-related actors. In *Arabidopsis*, it has been demonstrated that the hybrid Histidine-aspartate Kinase, AHK1, is a positive regulator of osmotic stress signaling and that *AHK1* gene expression is regulated by salt stress and dehydration [13,14]. Moreover, among three authentic AHPs (AHP1, 2 and 3), only AHP2 was shown to be an interacting partner of this osmosensor [15]. However, the B-type RR interacting partners of AHP2 [16,17,28] clearly play a pivotal

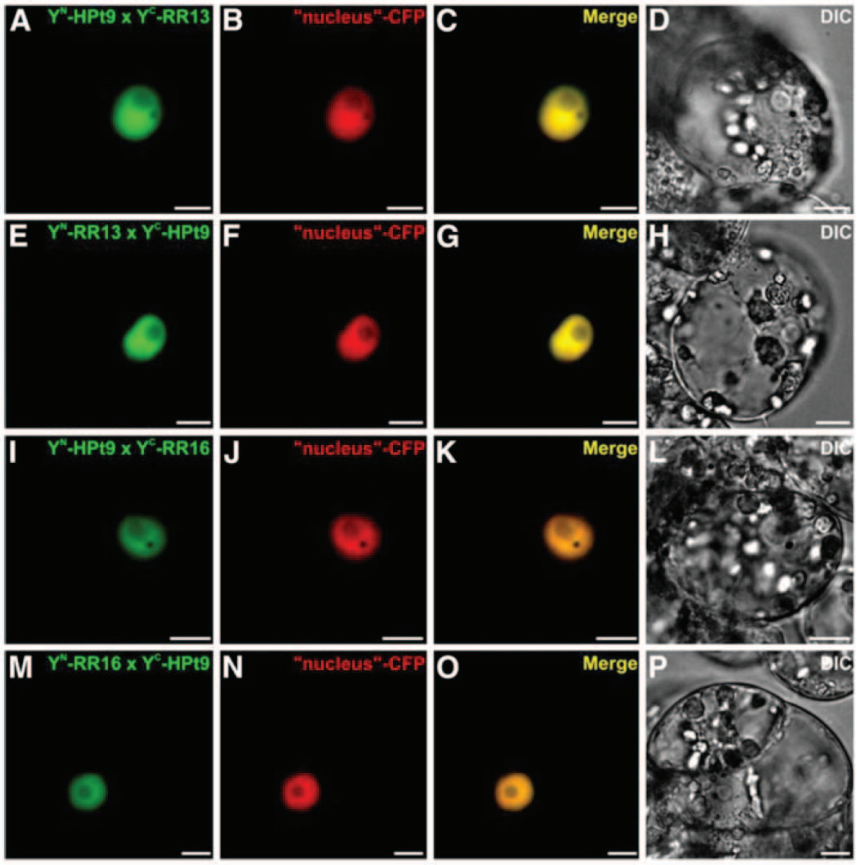


Figure 4 Analysis of HPt9/RR13 and HPt9/RR16 interactions in *C. roseus* cells using BiFC assays. Cells were co-transformed using a combination of plasmids expressing HPt9/RR13 (**A-H**) and HPt9/RR16 (**I-P**) as indicated. For each combination, an additional co-transformation was performed with the CFP nuclear marker (**B, F, J, N**). Co-localization of the two fluorescence signals is shown in the merged image (**C, G, K, O**). The morphology was observed by differential interference contrast (**DIC**) microscopy (**D, H, J, P**). Scale bar = 10 μm.

role in the response to cytokinin [29-32] or to ethylene [44]. Until now, very few information is available concerning an interaction network between osmotic stress signaling partners belonging to the multistep phosphorelay system.

The aim of the present study was to determine, in *Populus*, the potential third partners in osmotic stress signaling by bringing out interactions between B-type RRs and three HPts main interacting partners of the putative osmosensor HK1. Based on a homology approach, we isolated eight cDNAs, from the poplar Dorskamp genotype, encoding RRs sharing the common features of B-type RR family members. A phylogenetic analysis of poplar B-type RRs and several RRs from other model plant species revealed that in most cases, B-type RR family members can be classified independently of species but present pairings within species. In *Arabidopsis*, based on sequence comparisons and expression patterns, the B-type RRs have been divided into three sub-groups: BI, the largest sub-group that contains ARR involved in cytokinin responses [25,29], BII and BIII represented respectively by the pairs ARR13/ARR21 and ARR19/ARR20 [27,33,45]. Our rooted tree produced the same global scheme: the B-type RRs of the sub-group BI of *Arabidopsis* clustered together notably with a high number of B-type RRs from the other species and more particularly with isolated poplar B-type RRs.

We did not succeed in isolating RR17 or 20 which belong to the sub-group II, or the RR18 of sub-group I. Nevertheless, as shown in *P. trichocarpa* genotype, *RR17* and *RR20* are not expressed in roots [36], in agreement with our difficulties in isolating them. On the other hand, in the Dorskamp genotype, we isolated RR14 but not RR18, which were undetected and detected respectively in *P. trichocarpa* genotype. These differential expressions of B-type RRs observed in *P. trichocarpa* and *P. deltoides* (Bartr.) Marsh x *P. nigra* L. Dorskamp genotypes could be explained by their genetic variability.

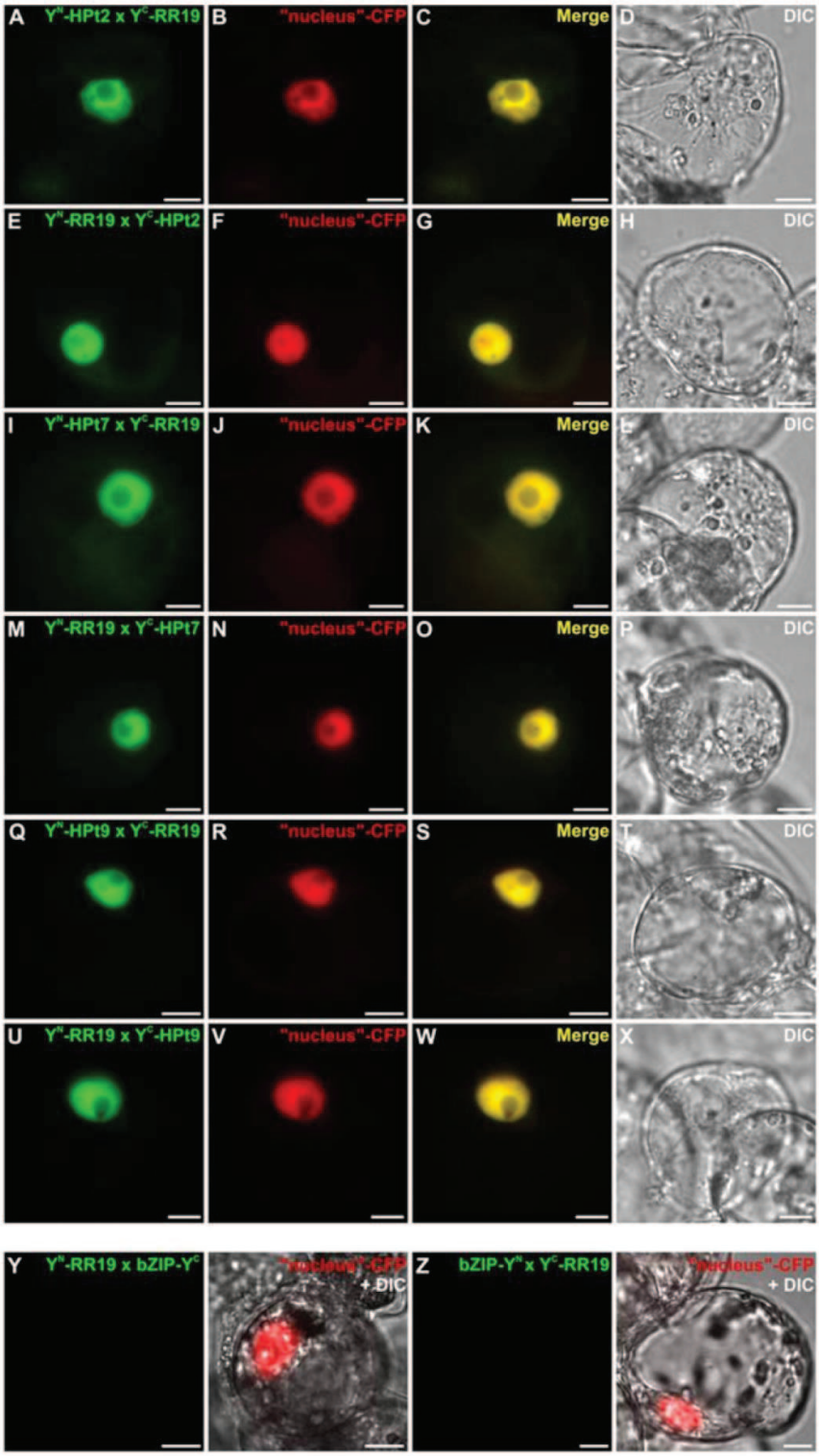


Figure 5 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)
Figure 5 Analysis of RR19/HPts (HPt2, 7 and 9) interactions in *C. roseus* cells using BiFC assays. Cells were co-transformed using a combination of plasmids expressing HPt2/RR19 (**A-H**), HPt7/RR19 (**I-P**) and HPt9/RR19 (**Q-X**) as indicated. For each combination, an additional co-transformation was performed with the CFP nuclear marker (**B**, **F**, **J**, **N**, **R**, **V**). Co-localization of the two fluorescence signals is shown in the merged image (**C**, **G**, **K**, **O**, **S**, **W**). The morphology was observed by differential interference contrast (DIC) microscopy (**D**, **H**, **J**, **P**, **T**, **X**). Scale bar = 10 μm. As negative controls, two combinations of plasmids were used: YFP^N-RR19/bZIP- YFP^C and bZIP-YFP^N/YFP^C-RR19 (**Ya-b**, **Za-b**), supplemented by a co-transformation with the CFP nuclear marker. The morphology was observed by differential interference contrast (DIC) microscopy (**Yb**, **Zb**). Scale bar = 10 μm.

To identify the partners potentially involved in the osmosensing pathway, we performed a global interaction analysis in yeast between HPts (HPt2, 7, and 9), the main partners of HK1, and the eight isolated B-type RRs. Both qualitative approaches used allowed us to obtain an overview of B-type RR partners of these HPts. Except for RR19, strong interactions between all B-type RRs and the three HPts were detected with different interaction profiles. Based on different activation levels of the second reporter gene (β-galactosidase), three RR groups emerged for HPt2 and HPt9, while the RRs are divided into two groups for HPt7.

To substantiate the partnership observed by Y2H analysis, some HPt/RR interactions were also analyzed *in planta* using BiFC assays. Among interactions observed in yeast, two HPts and two B-type RRs were chosen: i) HPt2 and HPt9, that present the strongest interaction with HK1 and seem to be key actors of the osmosensing pathway on the basis of their expression profiles in *Populus* [40], ii) RR13 and RR16, that display strong or weak β-galactosidase activity with the three HPts, respectively. These BiFC assays demonstrated that HPt2 and HPt9 interact with RR13 or RR16 in the *C. roseus* cells. In *Arabidopsis*, an interaction study concerning Cytokinin Response Factors (CRFs) and other members of cytokinin signaling pathway showed that BiFC technique led to a more complete detection of interactions than with the Y2H method [46]. Based on this study and due to the lack of HPt2, 7, 9/RR19 interactions observed in Y2H system, we decided to complete the interaction study by testing the ability of RR19 to interact *in planta* with HPts. As for the CRFs study, the BiFC analysis showed that RR19 displayed interactions with HPt2, 7 and 9. Cutcliff *et al.* [46], speculated that the lack of some interaction in Y2H system can be explained by the absence of plant specific post-translational modifications on protein or plant-specific protein facilitating the interactions of this protein. The whole of HPt/RR interactions *in planta* occurs in the nucleus. To validate this study, we confirmed that HPt2 and 9 have a nuclear and cytosolic localization while the RR13 and 16 are localized in the nucleus. Although the localization of the second and third partners has already been described in *Arabidopsis* [22-27], and that the nuclear localization of HPt/B-type RR interactions is expected, the localization of these interactions was until now only putative. Our study shows clearly this localization for the first time in plant cell.

To reinforce the hypothesis of interactions between the second and third partners *in planta*, an analysis of the concomitant presence of the transcripts of both partners (HPts and B-type RRs) in the same plant organs was performed. A previous analysis of expression of *HK1* and *HPt* genes in four different organs of poplar cuttings under control and osmotic stress conditions revealed that only *HK1*, *HPt2*, *7* and *9* are co-expressed in all organs and conditions tested [40]. In the present study, we also analyzed the B-type RR genes expression in the same poplar cuttings organs and conditions, which led us to show that only *RR12*, *13*, *14*, *16* and *19* are expressed in the same organs and conditions than *HK1* and the three *HPts*. By contrast to HPts, none B-type RR showed an organo-specific expression. However, the absence of *RR15*, *21* and *22* transcripts in organs and conditions tested, even though they are able to interact physically with HPts in yeast, allows us to conclude that these B-type RRs are of lesser importance in the osmosensing signaling pathway in these organs.

The five poplar B-type RRs, RR12, 13, 14, 16 and 19, interacting with HPt2, 7 and 9, the predominant partners of HK1, and concomitantly expressed in the main organs of poplar, could be probably involved in a poplar osmosensing pathway. Nevertheless, some *Arabidopsis* B-type RRs homologous to these five poplar RRs are transcription factors of cytokinin or ethylene signaling pathways, such as ARR2 involved in leaf senescence [47], ethylene response [44] and resistance against pathogens [48]. Consequently, these transcription factors would behave as a set of protagonists linking several signaling pathways to coordinate different developmental processes and stress responses [19]. This hypothesis is consistent with the known cross-talk between cytokinin, ABA and abiotic stresses [13,49,50].

Conclusion

In the present work, eight B-type RRs have been identified in *Populus* (Dorskamp genotype). In yeast, almost all B-type RRs tested (except RR19) present interactions with the three preferential partners, HPt2, 7, 9, of HK1, a putative poplar osmosensor. Some HPt/RR interactions

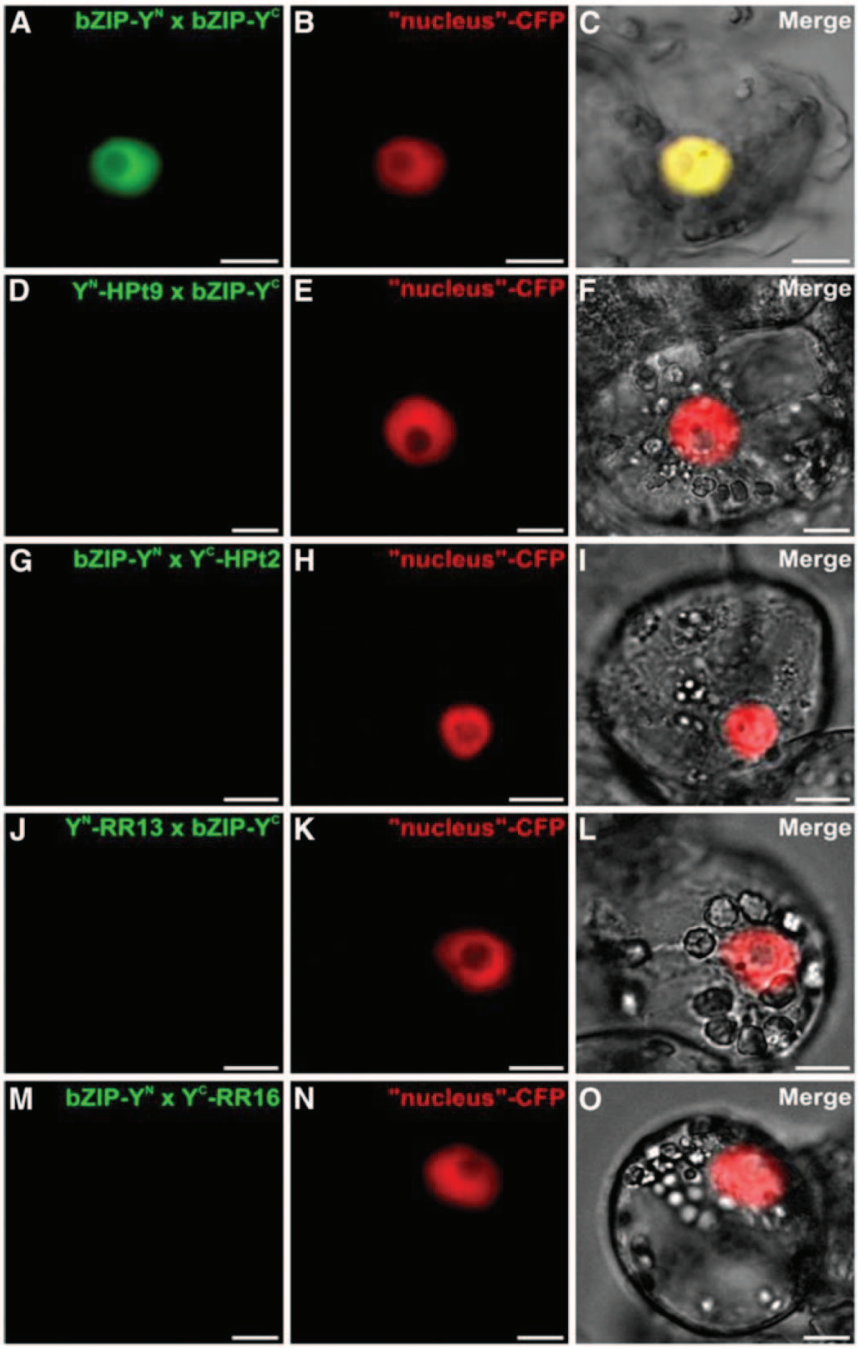


Figure 6 Controls of BiFC assays in *C. roseus* cells. Cells were co-transformed using a combination of plasmids as indicated: (**A**-**C**) the split of nuclear transcription factor bZIP as a positive control. An additional co-transformation with the CFP nuclear marker (**B**) confirms the co-localization of the two fluorescence signals (**C**). (**D**-**O**) YFP^N-HPt9/-RR13 or YFP^C-HPt2/-RR16 with the split bZIP as a negative control. For each combination, an additional co-transformation with the CFP nuclear marker was performed (**E**, **H**, **K**, **N**). The morphology was observed by differential interference contrast (DIC) microscopy (**C**, **F**, **I**, **L**, **O**). Scale bar = 10 μm.

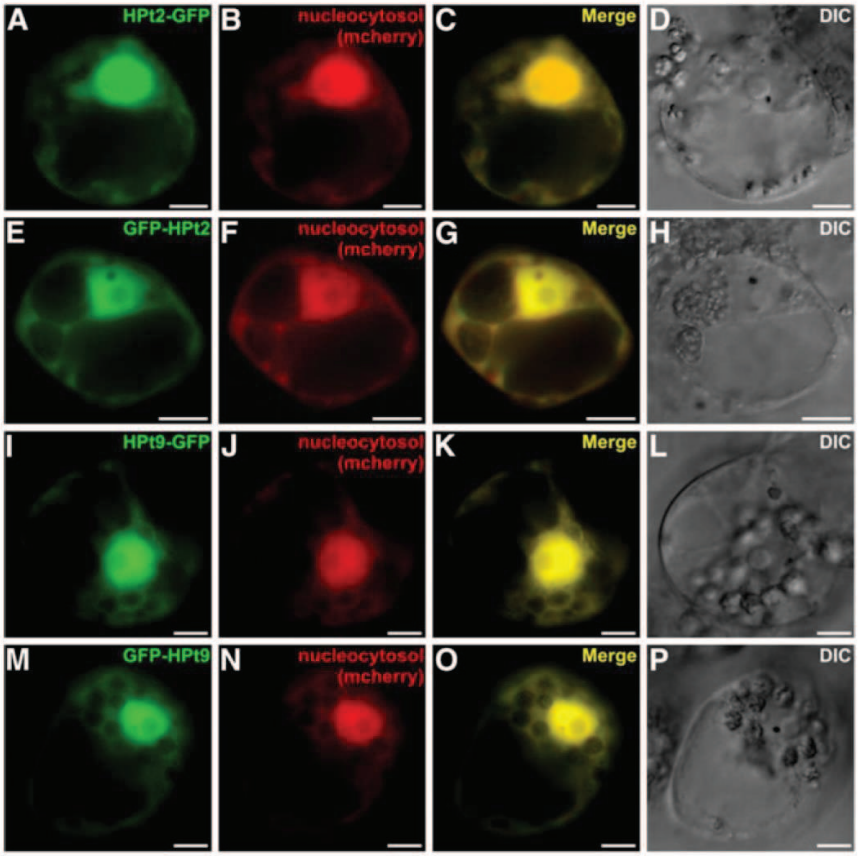


Figure 7 Nuclear and cytosolic localization of HPt2 and HPt9 in *C. roseus* cells. Cells were transiently transformed with HPt-GFP (HPt2 (**A**-**D**); HPt9 (**I**-**L**)) or GFP-HPt (HPt2 (**E**-**H**); HPt9 (**M**-**P**)) expressing vectors in combination with the nucleocytosolic-mcherry marker (**B**, **F**, **J**, **N**). Co-localization of the two fluorescence signals is shown in the merged image (**C**, **G**, **K**, **O**). The morphology was observed by differential interference contrast (DIC) microscopy (**D**, **H**, **L**, **P**). Scale bar = 10 μm.

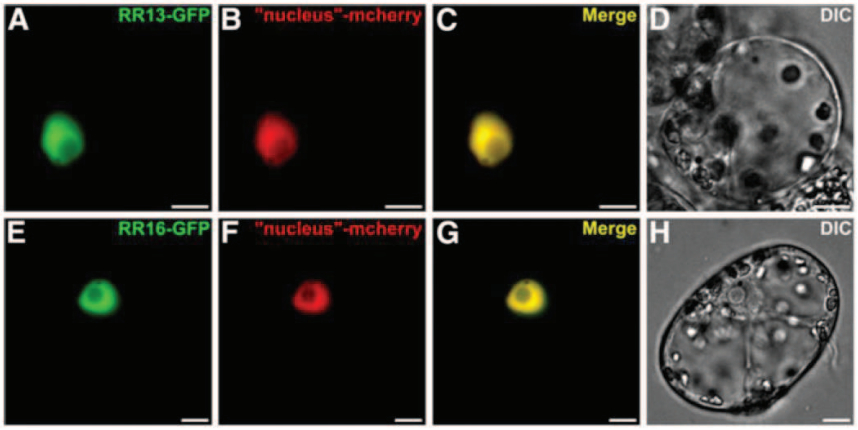


Figure 8 Nuclear localization of RR13 and RR16 in *C. roseus* cells. Cells were transiently transformed with RR13-GFP (**A**-**D**) or RR16-GFP (**E**-**H**) expressing vectors in combination with the nuclear-mcherry marker (**B**, **F**). Co-localization of the two fluorescence signals is shown in the merged image (**C**, **G**). The morphology was observed by differential interference contrast (DIC) microscopy (**D**, **H**). Scale bar = 10 μm.

Figure 9 Expression analysis of RR12, 13, 14, 16, 19 by RT-PCR. RNAs isolated from roots (R), stems (S), petioles (P) and leaves (L) under control (c) or stressed (s) conditions, were reverse transcribed and used as template for PCR amplification. PCR reactions were performed using *B-type RRs* specific primers under optimal conditions for each primer set (**A**: 30 cycles, **B**: 40 cycles). Expression profile of a housekeeping gene, *Clathrin* (CLA), was realized with 25 cycles of PCR amplification.

were confirmed *in planta* by BiFC assays and the ability of RR19 to interact with HPts was only detected *in planta*. All tested HPt/RR interactions displayed a nuclear localization, HPts being nuclear and cytosolic proteins, and B-type RRs nuclear proteins. The co-expression of the downstream signaling partners in poplar organs highlights the relevance of RR12, 13, 14, 16 and 19 as potential third partners involved in the osmosensing pathway in *Populus*. However, their specific implications in transcription of osmotic stress response genes remain to be investigated.

Methods

Isolation of B-type RR CDSs and phylogenetic analysis

We used the references of gene from *Populus trichocarpa* B-type RRs (PtRR12 to PtRR22) [36] to search their nucleotidic sequences in JGI *Populus trichocarpa* (v1.1) and designed a specific primers pairs corresponding to each RR (Additional file 1), in order to isolate their CDSs from *Populus deltoides* (Bartr.) Marsh x *P. nigra* L. Dorskamp genotype. PCRs were performed using a root cDNA library constructed with the Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech) and Taq Advantage polymerase (Clontech), with primers at a final concentration of 0.2 µM. PCR products were cloned into pGEM-T vector (Promega), sequenced and compared with *P. trichocarpa* B-type RRs sequences using ClustalW [51] as implemented in BIOEDIT version 7.0.9 [52].

Multiple amino acid sequences alignments of all poplar B-type RRs and those of *Arabidopsis thaliana, Zea mays, Glycine max, Oryza sativa* (Additional file 2) were carried out using Muscle [41] incorporated within the software MEGA 5 [42]. Maximum likelihood tree reconstructions were performed with MEGA 5 and generated using the Jones-Taylor-Thornton model [43]. Our analysis used only RRs containing both the RR domain (the receiver domain) and the Myb DNA-binding domain. The ARR22 sequence (EMBL: At3g04280.1), a C-type RR from *Arabidopsis*, was used as outgroup [18]. The robustness of the tree was assessed by 1000 bootstrap replicates.

Yeast two-hybrid interaction tests

The two-hybrid analysis was performed using a LexA DNA-binding domain encoding bait vector (pBTM116 referred as pLex) and a Gal4 activation domain encoding prey vector (pGADT7, Clontech). RR CDSs were cloned into the pGAD vector as *Xma*I-*sal*I (RR12, RR13, RR14, RR16, RR21, RR22), *Cla*I-*Xho*I (RR15) and *Cla*I-*Sal*I (RR19) fragments derived from PCR-amplified pGEMT-RR clones.

The yeast strain L40Δ (MATa ade2-101 his3-200 leu2-3,112 trp1-901 ura3-52 LYS2::(lexA op)x4-HIS3 URA3::

(lexA op)x8-lacZ gal4Δ) was used for all transformations according to the lithium acetate method from Gietz *et al.* [53]. Co-transformed yeasts were selected onto leucine-trytophan lacking medium (–LW) for 4 days at 30°C then streaked onto leucine-trytophan-histidine lacking medium (–LWH) and grown for 4 days at 30°C. Due to autoactivation of HPts, 3-amino-1, 2, 4-triazole (3AT) was supplemented to -LWH medium at 60 mM (HPt2) or 20 mM (HPt7 and 9). X-Gal assays were performed according to the overlay method derived from Fromont-Racine *et al.* [54] by applying (directly onto the -LWH medium containing streaked positive yeasts) 10 mL of an X-Gal mixture containing agar (0.5%), phosphate buffer (0.25 M), SDS (0.1%) and X-Gal (0.04%). The blue colour was allowed to appear for 3h to 5h at 30°C. Interactions were tested using two different reporter genes (*HIS3* and *LacZ*) and all interactions were tested at least twice.

ß-galactosidase activity measurements

Yeast colonies grown onto -LW medium were resuspended into Z buffer (Na_2HPO_4, NaH_2PO_4, KCl, $MgSO_4$) at an OD_{600} between 0.5 and 0.7 and concentrated in a final volume of 300 µL. Cells were lysed by 3 cycles of liquid nitrogen/37°C incubations and 100 µL were used for triplicate tests. Two hundred µL of *ortho*-nitrophényl-ß-D-galactopyranoside (ONPG, 4 mg/mL) into Z buffer were added to the cells and the reaction was incubated at 37°C for 5 min, and then stopped with 200 µL of 1 M Na_2CO_3. One hundred µL of supernatant were transferred into a microplate for OD_{420} reading. Units of ß-galactosidase were expressed as Miller units. A minimum of three independent clones were used for each interaction HPt/RR tested. Data management and statistical analyzes were carried out with the statistical software SPPS 11.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). For each variable, the normality of the distribution was tested by a Shapiro-Wilk test. Means are expressed with their standard error and compared by t-test or ANOVA followed by Scheffe test. All statistical tests were considered significant at $P \leq 0.05$.

Interaction studies between HPts and B-type RRs by BiFC assays

BiFC assays were conducted using the pSPYNE(R)173 and pSPYCE(MR) plasmids [55] which allowed the expression of a protein fused to the C-terminus of the split-YFP fragments. For HPt2, HPt7, HPt9, RR16 and RR19, the cDNAs amplified using specific primers were cloned via *Spe*I in frame with the 3' ends of the coding sequence of the N-terminal (YFP^N, amino acids 1–173) and C-terminal (YFP^C, amino acids 156–239) fragments of YFP. RR13 cDNAs were cloned via *Bam*HI in the same configuration. This led to the production of two distinct fusion proteins for HPt2, HPt7, HPt9, RR13, RR16 and RR19 which each type of fusion including YFP^N-HPt2 and YFP^C-HPt2 as described for HPt2. Transient transformation of *C. roseus* cells by particle bombardment and YFP imaging were performed using the CFP nucleus marker according to Guirimand *et al.* [56] with adaptation for BiFC assays [57].

GFP-fused protein expression plasmids

To express the HPt-GFP and RR-GFP fusion proteins, the full coding sequence of HPts (HPt2 and 9) and RRs (RR13 and 16) were amplified by PCR using specific primers, extended by *Spe*I (HPt2 and 9, RR16) or *Xba*I (RR13) restriction sites at both extremities. The amplified cDNA was subsequently cloned into the *Spe*I *or Xba*I restriction site of pSCA-cassette GFPi [56] in frame with the 5' extremity of the coding sequence of GFP.

Transient transformation of *C. roseus* cells by particle bombardment and YFP imaging were performed using the mcherry nuclear and nucleocytoplasmic markers according to Guirimand *et al.* [56].

B-type RR transcripts analysis by RT-PCR

This study was done using the *Populus deltoides* (Bartr.) Marsh x *P. Nigra* L. clone Dorskamp genotype. The osmotic stress was imposed on one month old hydroponically grown rooted cuttings by supplementing the growth medium with PEG 6000 at 50 g/L [58]. Roots, stems, petioles and leaves were harvested and frozen after 0 and 10 minutes of stress. RNA extractions were carried out with the NucleoSpin® RNA Plant mini kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. One µg of total RNA was reverse transcribed using M-MuLV Reverse Transcriptase RNase H- (Finnzyme) according to the manufacturer's procedure and used as template for PCR amplifications. All PCR reactions were performed in triplicate under optimal and comparable conditions. *Clathrin* was used as an expression control gene. The amplified fragments were separated by 1.2% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide and analyzed under UV light. Three independent biological experiments were performed.

Additional files

Additional file 1: Table S1. Sequence of *Populus B-type RRs* and *Clathrin* genes specific primers used to achieve the co-expression analysis.

Additional file 2: Table S2. Identifiers of B-type RRs proteins used in the phylogenetic analysis.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution

LB coordinated the project from its elaboration until the submission of the paper. She conducted technical experiments as the interaction study including two-hybrid assays, dosages of β-galactosidase activity and plasmid constructs for GFP/BiFC assays. She carried out the phylogenetic data analyzes, and wrote the paper. FC carried out the isolation of poplar B-type RRs and their expression profiles analysis. GG and VC were completely in charge of GFP/BiFC-imaging experiments. FB participated in the statistical analysis. FH co-supervised the LB PhD work. SC, supervisor of LB PhD, conceived of the study, carried out its coordination, performed part of the experiments and drafted the manuscript. FC, VC, CD, DM and FH helped in editing the manuscript, and all authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This research was financially supported by grants from Conseil Régional du Centre and Conseil Général du Loiret. LB was supported by a PhD grant of the Conseil Régional Région Centre, France. The technical assistance of A Guichard (EA 1207, University of Orléans, France) and M Larcher (EA 1207, University of Orléans, France) is gratefully acknowledged. We are grateful to Dr. C Bertheau (University of Bokü, Austria) for helpful recommendations for phylogenetic tree construction and Dr. D Auguin (EA 1207, University of Orléans, France) for useful advices. We also thank Dr. J-C Leplé (AGPF, INRA of Orléans, France) for the design of *clathrin* primers. We especially want to thank Dr. W Strong (B.C. Ministry of Forests, Lands, and Natural Resource Operations, Canada) for linguistic proofreading.

Author details

[1]Université d'Orléans, UFR-Faculté des Sciences, UPRES EA 1207, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures (LBLGC), BP 6759, Orléans F-45067, France. [2]INRA, USC1328, Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales (ARCHE), BP 6759, Orléans F-45067, France. [3]Université François-Rabelais de Tours, EA 2106, Biomolécules et Biotechnologies Végétales, 31 avenue Monge, Tours 37200, France.

Received: 13 June 2012 Accepted: 29 November 2012
Published: 19 December 2012

References

1. Maeda T, Wurgler-Murphy SM, Saito H: **A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast.** *Nature* 1994, **369:**242–245.
2. Posas F, Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, Thai TC, Saito H: **Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor.** *Cell* 1996, **86:**865–875.
3. Hwang I, Chen H-C, Sheen J: **Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*.** *Plant Physiol* 2002, **129:**500–515.
4. Pischke MS, Jones LG, Otsuga D, Fernandez DE, Drews GN, Sussman MR: **An *Arabidopsis* histidine kinase is essential for megagametogenesis.** *PNAS* 2002, **99:**15800–15805.
5. Hejátko J, Pernisová M, Eneva T, Palme K, Brzobohatý B: **The putative sensor histidine kinase CKI1 is involved in female gametophyte development in *Arabidopsis*.** *Mol Genet Genomics* 2003, **269:**443–453.
6. Deng Y, Dong H, Mu J, Ren B, Zheng B, Ji Z, Yang W-C, Liang Y, Zuo J: ***Arabidopsis* histidine kinase CKI1 acts upstream of histidine phosphotransfer proteins to regulate female gametophyte development and vegetative growth.** *Plant Cell* 2010, **22:**1232–1248.
7. Desikan R, Horák J, Chaban C, Mira-Rodado V, Witthöft J, Elgass K, Grefen C, Cheung M-K, Meixner AJ, Hooley R, Neill SJ, Hancock JT, Harter K: **The histidine kinase AHK5 integrates endogenous and environmental signals in *Arabidopsis* guard cells.** *PLoS One* 2008, **3:**e2491.
8. Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K, Kakimoto T: **Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*.** *Nature* 2001, **409:**1060–1063.
9. Yamada H, Suzuki T, Terada K, Takei K, Ishikawa K, Miwa K, Yamashino T, Mizuno T: **The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane.** *Plant Cell Physiol* 2001, **42:**1017–1023.
10. Ueguchi C, Koizumi H, Suzuki T, Mizuno T: **Novel family of sensor histidine kinase genes in *Arabidopsis thaliana*.** *Plant Cell Physiol* 2001, **42:**231–235.
11. Higuchi M, Pischke MS, Mähönen AP, Miyawaki K, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Shinozaki K, Kato T, Tabata S, Helariutta Y, Sussman MR, Kakimoto T: ***In planta* functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family.** *PNAS* 2004, **101:**8821–8826.
12. Urao T, Yakubov B, Satoh R, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M, Hirayama T, Shinozaki K: **A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor.** *Plant Cell* 1999, **11:**1743–1754.
13. Tran L-SP, Urao T, Qin F, Maruyama K, Kakimoto T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K: **Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*.** *PNAS* 2007, **104:**20623–20628.
14. Wohlbach DJ, Quirino BF, Sussman MR: **Analysis of the *Arabidopsis* histidine kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation.** *Plant Cell* 2008, **20:**1101–1117.
15. Urao T, Miyata S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K: **Possible his to asp phosphorelay signaling in an *Arabidopsis* two-component system.** *FEBS Lett* 2000, **478:**227–232.
16. Dortay H, Mehnert N, Bürkle L, Schmülling T, Heyl A: **Analysis of protein interactions within the cytokinin-signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*.** *FEBS J* 2006, **273:**4631–4644.
17. Dortay H, Gruhn N, Pfeifer A, Schwerdtner M, Schmülling T, Heyl A: **Toward an interaction map of the two-component signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*.** *J Proteome Res* 2008, **7:**3649–3660.
18. Pils B, Heyl A: **Unraveling the evolution of cytokinin signaling.** *Plant Physiol* 2009, **151:**782–791.
19. Gupta S, Rashotte A: **Down-stream components of cytokinin signaling and the role of cytokinin throughout the plant.** *Plant Cell Rep* 2012, **31:**801–812.
20. Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C-Z, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang JZ, Ghandehari D, Sherman BK, Yu G-L: ***Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes.** *Science* 2000, **290:**2105–2110.
21. Triezenberg S: **Structure and function of transcriptional activation domains.** *Curr Opin Genet Dev* 1995, **5:**190–196.
22. Sakai H, Aoyama T, Oka A: ***Arabidopsis* ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators.** *Plant J* 2000, **24:**703–711.
23. Imamura A, Yoshino Y, Mizuno T: **Cellular localization of the signaling components of *Arabidopsis* his-to-asp phosphorelay.** *Biosci Biotechnol Biochem* 2001, **65:**2113–2117.
24. Lohrmann J, Sweere U, Zabaleta E, Bäurle I, Keitel C, Kozma-Bognar L, Brennicke A, Schäfer E, Kudla J, Harter K: **The response regulator ARR2: a pollen-specific transcription factor involved in the expression of nuclear genes for components of mitochondrial complex I in *Arabidopsis*.** *Mol Genet Genomics* 2001, **265:**2–13.
25. Hwang I, Sheen J: **Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction.** *Nature* 2001, **413:**383–389.
26. Hosoda K, Imamura A, Katoh E, Hatta T, Tachiki M, Yamada H, Mizuno T, Yamazaki T: **Molecular structure of the GARP family of plant myb-related DNA binding motifs of the *Arabidopsis* response regulators.** *Plant Cell* 2002, **14:**2015–2029.
27. Mason MG, Li J, Mathews DE, Kieber JJ, Schaller GE: **Type-B response regulators display overlapping expression patterns in *Arabidopsis*.** *Plant Physiol* 2004, **135:**927–937.
28. Imamura A, Hanaki N, Nakamura A, Suzuki T, Taniguchi M, Kiba T, Ueguchi C, Sugiyama T, Mizuno T: **Compilation and characterization of *Arabiopsis thaliana* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction.** *Plant Cell Physiol* 1999, **40:**733–742.
29. Sakai H, Honma T, Aoyama T, Sato S, Kato T, Tabata S, Oka A: **ARR1, A transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins.** *Science* 2001, **294:**1519–1521.
30. Mason MG, Mathews DE, Argyros DA, Maxwell BB, Kieber JJ, Alonso JM, Ecker JR, Schaller GE: **Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in *Arabidopsis*.** *Plant Cell* 2005, **17:**3007–3018
31. Yokoyama A, Yamashino T, Amano Y-I, Tajima Y, Imamura A, Sakakibara H, Mizuno T: **Type-B ARR transcription factors, ARR10 and ARR12, are implicated in cytokinin-mediated regulation of protoxylem differentiation in roots of *Arabidopsis thaliana*.** *Plant Cell Physiol* 2007, **48:**84–96.

32. Ishida K, Yamashino T, Yokoyama A, Mizuno T: **Three type-B response regulators, ARR1, ARR10 and ARR12, play essential but redundant roles in cytokinin signal transduction throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*.** *Plant Cell Physiol* 2008, **49**:47–57.
33. Imamura A, Kiba T, Tajima Y, Yamashino T, Mizuno T: ***In vivo* and *in vitro* characterization of the ARR11 response regulator implicated in the his-to-asp phosphorelay signal transduction in *Arabidopsis thaliana*.** *Plant Cell Physiol* 2003, **44**:122–131.
34. Argyros RD, Mathews DE, Chiang Y-H, Palmer CM, Thibault DM, Etheridge N, Argyros DA, Mason MG, Kieber JJ, Schaller GE: **Type B response regulators of *Arabidopsis* play key roles in cytokinin signaling and plant development.** *Plant Cell* 2008, **20**:2102–2116.
35. To JPC, Deruère J, Maxwell BB, Morris VF, Hutchison CE, Ferreira FJ, Schaller GE, Kieber JJ: **Cytokinin regulates type-a *Arabidopsis* response regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay.** *Plant Cell* 2007, **19**:3901–3914.
36. Ramírez-Carvajal GA, Morse AM, Davis JM: **Transcript profiles of the cytokinin response regulator gene family in *Populus* imply diverse roles in plant development.** *New Phytol* 2008, **177**:77–89.
37. Bao Y, Dharmawardhana P, Mockler T, Strauss S: **Genome scale transcriptome analysis of shoot organogenesis in *Populus*.** *BMC Plant Biol* 2009, **9**:132.
38. Ramírez-Carvajal GA, Morse AM, Dervinis C, Davis JM: **The cytokinin type-B response regulator PtRR13 is a negative regulator of adventitious root development in *Populus*.** *Plant Physiol* 2009, **150**:759–771.
39. Chefdor F, Bénédetti H, Depierreux C, Delmotte F, Morabito D, Carpin S: **Osmotic stress sensing in *Populus*: components identification of a phosphorelay system.** *FEBS Lett* 2006, **580**:77–81.
40. Héricourt F, Chefdor F, Bertheau L, Tanigawa M, Maeda T, Guirimand G, Courdavault V, Larcher M, Depierreux C, Bénédetti H, Morabito D, Brignolas F, Carpin S: **Characterization of histidine-aspartate kinase HK1 and identification of histidine phosphotransfer proteins as potential partners in a *Populus* multistep phosphorelay.** *Physiol plant*, doi:10.1111/ppl.12024.
41. Edgar RC: **MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**:1792–1797.
42. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S: **MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods.** *Mol Biol Evol* 2011, **28**:2731–2739.
43. Jones DT, Taylor WR, Thornton JM: **The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences.** *Comput Appl Biosci* 1992, **8**:275–282.
44. Hass C, Lohrmann J, Albrecht V, Sweere U, Hummel F, Yoo SD, Hwang I, Zhu T, Schäfer E, Kudla J, Harter K: **The response regulator 2 mediates ethylene signalling and hormone signal integration in *Arabidopsis*.** *EMBO J* 2004, **23**:3290–3302.
45. Tajima Y, Imamura A, Kiba T, Amano Y, Yamashino T, Mizuno T: **Comparative studies on the type-B response regulators revealing their distinctive properties in the his-to-asp phosphorelay signal transduction of *Arabidopsis thaliana*.** *Plant Cell Physiol* 2004, **45**:28–39.
46. Cutcliffe JW, Hellmann E, Heyl A, Rashotte AM: **CRFs form protein–protein interactions with each other and with members of the cytokinin signalling pathway in *Arabidopsis* via the CRF domain.** *J Exp Bot* 2011, **62**:4995–5002.
47. Kim HJ, Ryu H, Hong SH, Woo HR, Lim PO, Lee IC, Sheen J, Nam HG, Hwang I: **Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**:814–819.
48. Choi J, Huh SU, Kojima M, Sakakibara H, Paek K-H, Hwang I: **The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in *Arabidopsis*.** *Dev Cell* 2010, **19**:284–295.
49. Tran L-SP, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K: **Role of cytokinin responsive two-component system in ABA and osmotic stress signalings.** *Plant Signal Behav* 2010, **5**:148–150.
50. Nishiyama R, Watanabe Y, Fujita Y, Le DT, Kojima M, Werner T, Vankova R, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Kakimoto T, Sakakibara H, Schmülling T, Tran L-SP: **Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis.** *Plant Cell* 2011, **23**:2169–2183.
51. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nucleic Acid Res* 1994, **22**:4673–4680.
52. Hall TA: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT.** *Nucleic Acids Symp Ser* 1999, **41**:95–98.
53. Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA: **Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure.** *Yeast* 1995, **11**:355–360.
54. Fromont-Racine M, Rain J-C, Legrain P: **Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens.** *Nat Genet* 1997, **16**:277–282.
55. Waadt R, Schmidt LK, Lohse M, Hashimoto K, Bock R, Kudla J: **Multicolor bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous formation of alternative CBL/CIPK complexes *in planta*.** *Plant J* 2008, **56**:505–516.
56. Guirimand G, Burlat V, Oudin A, Lanoue A, St-Pierre B, Courdavault V: **Optimization of the transient transformation of *Catharanthus roseus* cells by particle bombardment and its application to the subcellular localization of hydroxymethylbutenyl 4-diphosphate synthase and geraniol 10-hydroxylase.** *Plant Cell Rep* 2009, **28**:1215–1234.
57. Guirimand G, Courdavault V, Lanoue A, Mahroug S, Guihur A, Blanc N, Giglioli-Guivarc'h N, St-Pierre B, Burlat V: **Strictosidine activation in apocynaceae: towards a "nuclear time bomb"?** *BMC Plant Biol* 2010, **10**:182.
58. Caruso A, Morabito D, Delmotte F, Kahlem G, Carpin S: **Dehydrin induction during drought and osmotic stress in *Populus*.** *Plant Physiol Biochem* 2002, **40**:1033–1042.

doi:10.1186/1471-2229-12-241
Cite this article as: Bertheau *et al.*: Identification of five B-type response regulators as members of a multistep phosphorelay system interacting with histidine-containing phosphotransfer partners of *Populus* osmosensor. *BMC Plant Biology* 2012 **12**:241.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

Table S1. Sequence of *Populus B-type RRs* and *clathrin* genes specific primers

Name	5' primers	3' primers
B-type RRs		
RR12	ATGATGAATCTTGCTAACTGC	CTACACAGGAATATTATCCAGG
RR13	ATGTCAACGGCTAGTTCTGGTG	CTACACAGGAATATTATCCAGGG
RR14	ATGGAAAATAATGGTTTCTCTTCTC	TCATGCTATAAACAAGCTTTGATC
RR15	ATGGCTGCTTTGCAGCGAG	CTATTCTTTGAAAACACTCATG
RR16	ATGGCTGCTTTGCAGCGAGTG	CTATTCTGTGAAAACACTCATAAG
RR19	ATGACCGTAGAGGACCAAAGGG	TCATACCCGTTTGATCATTGCATTC
RR21	ATGGAGAATGGTTTCTCCTCTCC	TCATATAAACAAGCTTTGATCTATTAG
RR22	ATGACTGTAGAACAGGGGATTGG	CTAACCAAGAATGGTTGGCAAATC
Clathrin		
CLATH	CAACCATGAGCGCAGAAGTC	CTCATACGAGCCTGCTTTGG

Table S2. Identifiers of B-type RRs proteins used in the phylogenetic analysis

Identifiers	**name**
Arabidopsis thaliana	
At3g16857.2	ARR1
At4g16110.1	ARR2
At4g31920.1	ARR10
At1g67710.1	ARR11
At2g25180.1	ARR12
At2g27070.1	ARR13
At2g01760.1	ARR14
At5g58080.1	ARR18
At1g49190.1	ARR19
At3g62670.1	ARR20
At5g07210.1	ARR21
Oryza sativa	
LOC_Os03g12350.3|12003.m35103|protein	OsRR21
LOC_Os06g08440.1|12006.m05563|protein	OsRR22
LOC_Os02g55320.1|12002.m10558|protein	OsRR23
LOC_Os02g08500.1|12002.m06196|protein	OsRR24
LOC_Os06g43910.1|12006.m08921|protein	OsRR25
LOC_Os01g67770.1|12001.m12881|protein	OsRR26
LOC_Os05g32880.1|12005.m07520|protein	OsRR27
LOC_Os04g28160.1|12004.m07933|protein	OsRR28
LOC_Os04g28130.1|12004.m07930|protein	OsRR29
Zea mays	
Q9AV93_MAIZE	ZmRR8
Q94LW1_MAIZE	ZmRR9
Q948L2_MAIZE	ZmRR10
Glycine max	
Glyma17g03380	GmRR19
Glyma09g04470	GmRR20
Glyma07g37220	GmRR21
Glyma15g15520	GmRR22
Glyma11g37480	GmRR23
Glyma05g27670	GmRR24
Glyma08g10650	GmRR25
Glyma04g06650	GmRR26
Glyma17g33230	GmRR27
Glyma14g13320	GmRR28
Glyma15g24770	GmRR29
Glyma09g14650	GmRR30
Glyma06g06730	GmRR31
Glyma13g22320	GmRR32
Glyma07g26890	GmRR33
Populus Dorskamp genotype	
D7GN43_POPCA	RR12
D7GN44_POPCA	RR13
D7GN50_POPCA	RR14
D7GN45_POPCA	RR15
D7GN46_POPCA	RR16
D7GN47_POPCA	RR19
D7GN48_POPCA	RR21
D7GN49_POPCA	RR22

III. ÉTUDES COMPLÉMENTAIRES

III.1 Résultats

III.1.a *Isolement du RR18 chez le peuplier*

Au sein de cette précédente étude, l'isolement de certains ADNc de RR de type-B n'a pas abouti dans le génotype Dorskamp, alors que ces mêmes RR notamment le PtRR18, rattaché au sous-groupe BI des RR-B chez *Arabidopsis*, a pu être isolé chez *Populus trichocarpa* (Mason *et al.,* 2004; Ramirez-Carvajal *et al.,* 2008). Rappelons que la nomenclature des RR-B de *Populus trichocarpa* est identique chez le génotype Dorskamp. Par comparaison des séquences du domaine receveur DDK, ce PtRR18 se retrouve dans le même groupe que deux autres RR-B de *Populus trichocarpa* PtRR19 et 22, et trois RR-B d'*Arabidopsis*, l'ARR10, 12 et 18 (Ramirez-Carvajal *et al.,* 2008). Une analyse d'identité de séquence a révélé que les RR19 et 22, du génotype Dorskamp, possèdent les plus forts pourcentages d'identité de séquences avec les ARR12 (41,45%) et 10 (43,17%) respectivement, ce qui suggère que le RR18 est l'orthologue de l'ARR18 d'*Arabidopsis*. Une étude a montré que cet ARR voyait l'expression de ses transcrits augmenter dans des feuilles de plants traités au PEG au terme de six heures de stress (Veerabagu, 2011). Sur la base de ces résultats, l'isolement du RR18 du peuplier a donc été mené dans ces mêmes conditions à savoir dans des boutures de peuplier soumises à une application de PEG_{6000} pendant trois et six heures, menant à un total de neuf RR de type-B isolés chez le peuplier génotype Dorskamp.

III.1.b *Le RR18, membre des RR de type-B*

L'analyse de la séquence complète du RR18 a été réalisée dans un premier temps par un alignement conjoint de cette séquence avec celles des RR-B de peuplier (FIGURE 18) par clustalW (Goujon *et al.,* 2010). Cet alignement montre deux zones de haute conservation correspondant aux domaines caractéristiques des RR de type-B à savoir le domaine receveur DDK et le domaine de fixation à l'ADN, le domaine GARP. Ces derniers sont reliés par une séquence appelée "charnière" qui sera présentée ultérieurement. De plus, on remarque que les séquences carboxy-terminales de l'ensemble des RR-B présentent un polymorphisme notable. Cette analyse de séquence sera étudiée plus finement en PARTIE II. En outre, deux séquences NLS putatives ont également été décelées au sein de la séquence protéique de ce RR.

Afin de compléter l'étude déjà initiée concernant les RR-B, un nouvel arbre phylogénétique a

été généré en utilisant les mêmes séquences de protéines que l'étude précédente et en réintégrant ce RR supplémentaire (FIGURE 19). Le schéma global reste identique, la totalité des RR-B de peuplier génotype Dorskamp est toujours regroupée dans la sous-famille BI des RR-B d'*Arabidopsis*, à la différence que le RR19 de peuplier forme une paire avec ce nouvel RR partageant ensemble 80,93% d'identité de séquences.

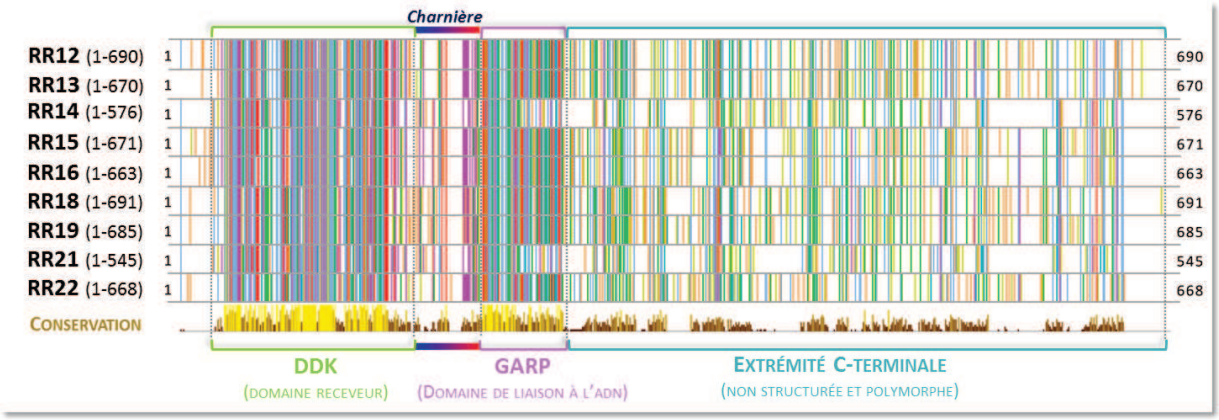


FIGURE 18 – Alignement des séquences protéiques de l'ensemble des RR-B de peuplier

L'alignement a été réalisé avec le logiciel ClustalW en utilisant la matrice de substitution BLOSUM62. Cette image a été générée par Jalview 2.8 avec le masque d'affichage de couleur Clustalx (ANNEXE 4). La conservation des résidus est montrée par des barres verticales.

III.1.c *Analyse des interactions du RR18 avec HPt2, 7 et 9*

Afin de tester les interactions directes potentielles de ce RR-B avec les trois HPt interagissant avec HK1, des études complémentaires d'interactions par les techniques du double-hybride et du BiFC ont été menées.

III.1.c.1 *Interaction dans le système double-hydride*

Les interactions entre le RR18 et les trois HPt ont été testées en levure par utilisation du système double-hybride permettant de réaliser un test qualitatif de croissance sur milieu sélectif et un dosage des niveaux d'activation du second gène rapporteur (ß-galactosidase). Le système double-hydride et les configurations utilisées sont identiques à ce qui a été utilisé durant l'étude précédente en tenant compte de la nature auto-activatrice des RR-B. Les HPt (HPt2, 7 et 9) ont donc été fusionnées au domaine de fixation à l'ADN (protéine "appât") et le RR18 fusionné au domaine d'activation de la transcription (protéine "proie"). Les tests d'interaction montrent que le RR18 est capable d'interagir avec ces trois protéines en levure avec ce système (FIGURE 20).

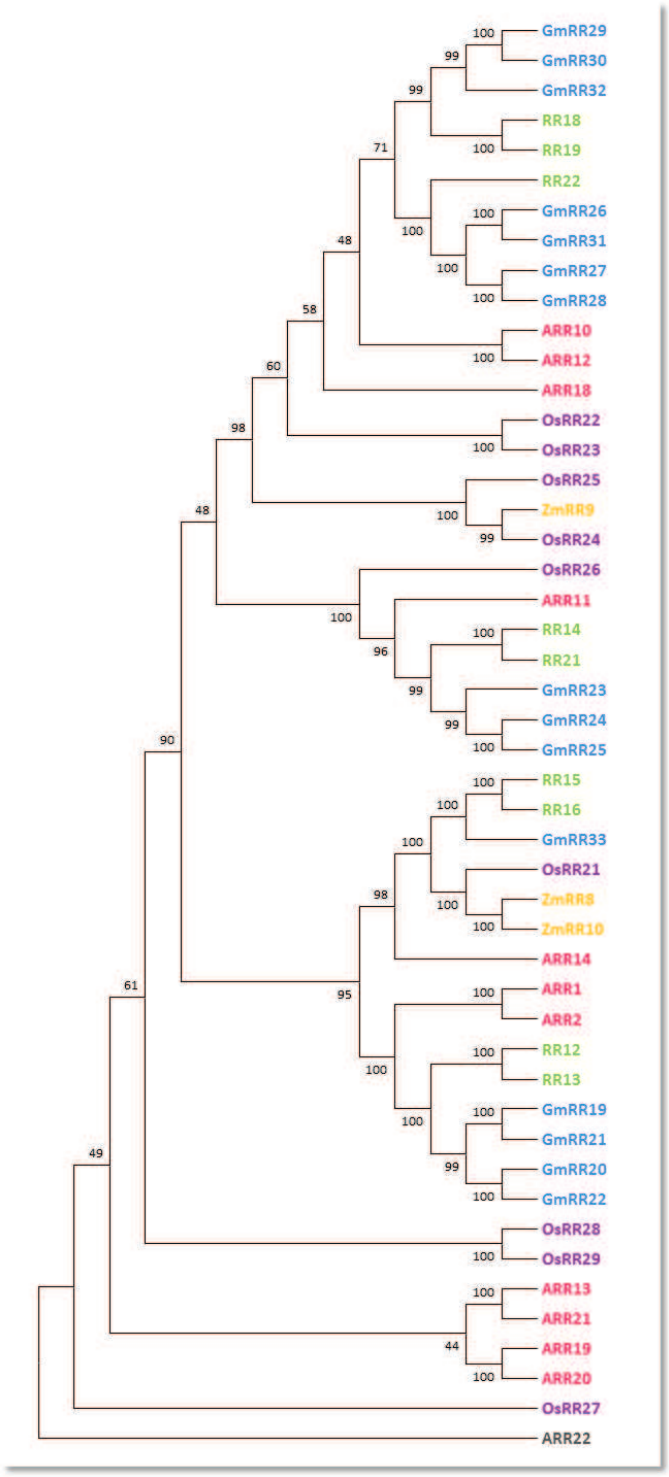


FIGURE 19 – **Arbre phylogénétique des membres de la famille des RR de type B**

Arbre basé sur le principe du maximum de vraisemblance et du modèle JTT a été obtenu après alignement de la séquence RR18 (numéro d'accès EMBL : HG518156) avec l'ensemble des séquences des protéines complètes RR-B accessibles de peuplier (vert), d'*Arabidopsis* (ARR, rose), de soja (GmRR, bleu), de maïs (ZmRR, orange), et de riz (OsRR, violet), utilisées dans l'analyse phylogénétique de l'ARTICLE III (numéros d'accession dans les données supplémentaires 2 de l' ARTICLE III). L'arbre a été enraciné avec la séquence du RR de type-C, ARR22, d'*Arabidopsis* (ARR22, gris). Les nombres en-dessous des branches représentent les valeurs en pourcentage du bootstrap calculé après 1000 répétitions.

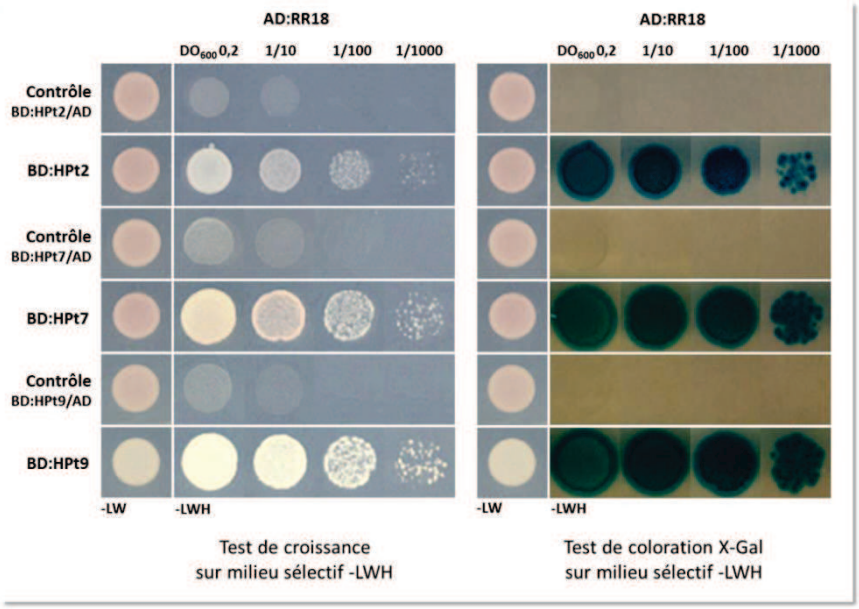


FIGURE 20 – RR18 interagit avec les HPt2, 7 et 9 en système double-hydride dans la levure

L'analyse a été réalisée avec des levures co-exprimant les protéines HPt (HPt2, 7 ou 9) fusionnées au domaine de fixation de l'ADN LexA (BD:HPt) et la protéine RR18 fusionnée au domaine d'activation de la transcription Gal4 (AD:RR18). Les suspensions cellulaires de levure (absorbance à 600 nm de 0,2) ont été déposées sur les milieux –LW et –LWH (supplémenté en 3AT : 60 mM pour HPt2, 20 mM pour les HPt7 et 9). Une série de trois dilutions pour chaque culture a également été déposée sur le milieu sélectif –LWH.

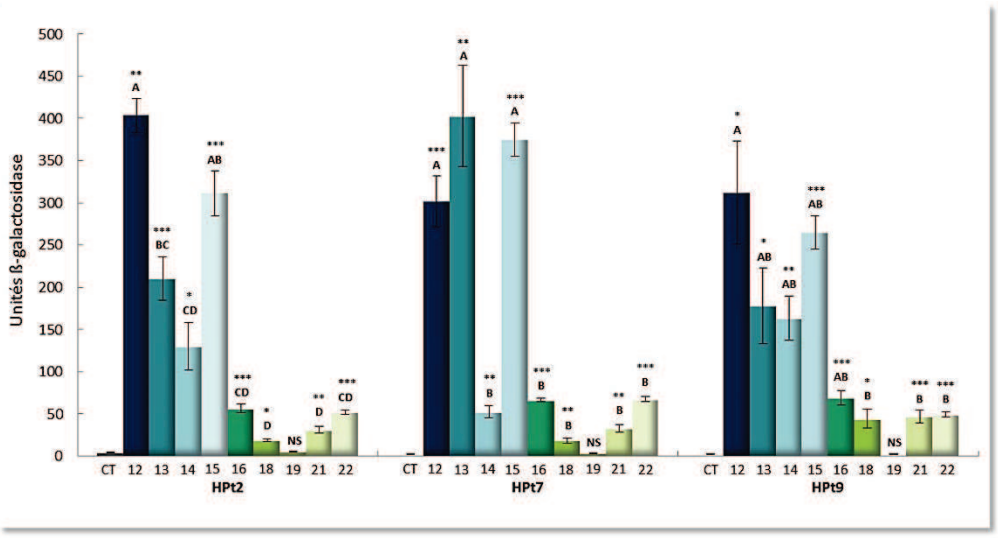


FIGURE 21 – Mesure des activités ß-Galactosidase des interactions HPt/RR type-B

Les moyennes (± erreurs standards) d'au moins deux répétitions (correspondant à trois clones de levure) indépendantes de mesures des activités ß-Galactosidase sont présentées pour chaque interaction HPt/RR-B. Le contrôle négatif (CT) de chaque HPt est l'interaction entre HPt2, 7 ou 9 et le vecteur vide pGAD. Les valeurs des moyennes des interactions HPt/RR sont comparées à leur contrôle négatif respectif par un test-t et les différences significatives sont indiquées par des astérisques (*P<0,05 ; **P<0,01 ; ***P<0,001) et NS signifie **N**on **S**ignificatif. Les valeurs moyennes entre les HPt et les RR12, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22 sont comparées par une analyse ANOVA suivie d'un test Scheffe. Les différentes lettres indiquent des différences significatives ($P \leq 0,05$).

Les valeurs moyennes d'activation du second gène rapporteur concernant les interactions HPt/RR18 ont ensuite été intégrées à celles des différentes interactions des HPt2, 7 et 9 avec l'ensemble des RR-B (ARTICLE III, FIGURE 1). Globalement, le RR18 se classe, pour chaque HPt, dans le groupe des RR avec les plus faibles niveaux d'activation de la ß-Galactosidase, ce qui suggère des interactions plus faibles avec ces trois HPt (FIGURE 21).

III.1.c.2 *Interaction in planta par BiFC*

La validation *in planta* des interactions HPt/RR18 observées en levure a été conduites par des expériences BIFC dans des cellules de *Catharanthus roseus*.

Les séquences codantes du RR18 et des HPt2, 7 et 9 ont été fusionnées en partie C-terminale aux hémidomaines (N-terminale ou C-terminale) de la protéine fluorescente YFP, afin de produire les protéines suivantes : HPt-YFP^N et RR18-YFP^C. Après co-transformation des cellules de *C. roseus*, les différentes combinaisons du RR18 avec HPt2 (FIGURE 22, A-D), HPt7 (FIGURE 22, E-H) et HPt9 (Figure 22, I-L) conduisent à la formation d'un complexe BiFC (FIGURE 22, A, E, I,). La fluorescence émise par la YFP reconstituée se superpose parfaitement avec celle du marqueur nucléaire CFP (FIGURE 22, C, G, K) confirmant ainsi une localisation nucléaire au sein des cellules de ces interactions RR18/HPt.

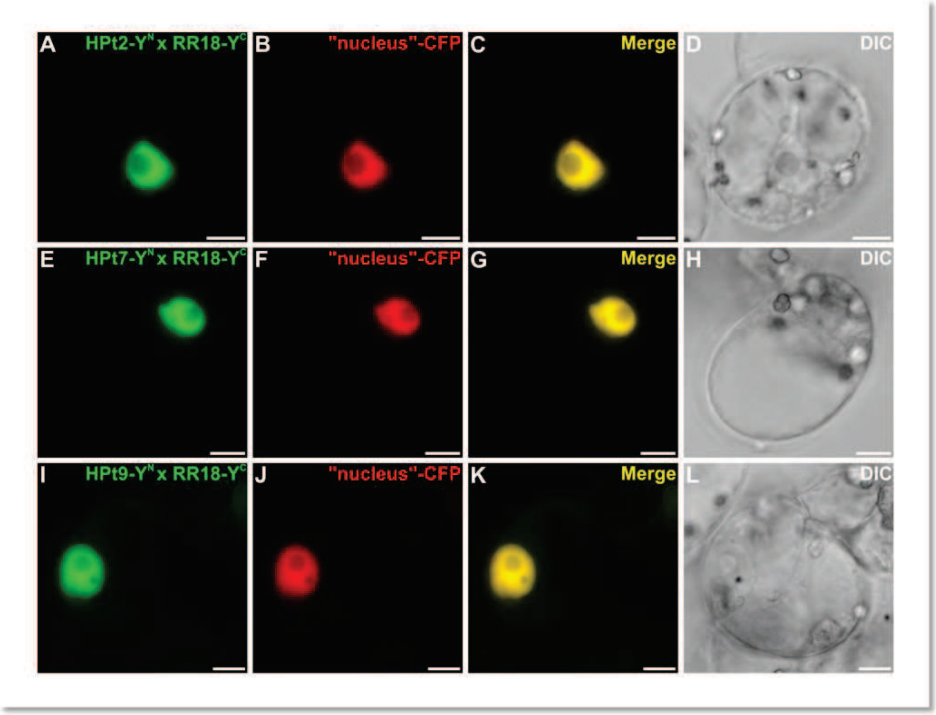


FIGURE 22 – Interaction du RR18 avec les HPt2, 7 et 9 *in planta* par BiFC

Les cellules de *C. roseus* ont été transformées par une combinaison de plasmides exprimant RR18/HPt2 (A-D), RR18/HPt7 (E-H) et RR18/HPt9 (I-L) fusionnées chacune aux parties N-terminale (YFP^N) ou C-terminale (YFP^C)

de la YFP comme indiqué. Pour chaque combinaison, une co-transformation supplémentaire a été réalisée avec le marqueur nucléaire CFP (B, F, J). La co-localisation des deux signaux de fluorescence est montrée dans les encarts C, G, K. La morphologie de la cellule est observée par microscopie de contraste inter-différentiel (DIC) (D, H, L). La barre d'échelle représente 10 µm.

La visualisation des interactions *in planta* des interactions entre le RR18 et les trois HPt d'intérêt (HPt2, 7 et 9), nous permet de confirmer celles montrées dans le système hétérologue.

III.1.d *Etude de la régulation transcriptionnelle des RR13 et 18 par Q-PCR*

Comme dans la précédente étude (ARTICLE III), la co-expression des transcrits des deux partenaires, le RR18 et les trois HPt partenaires de HK1, s'avère nécessaire pour conclure quant à une implication potentielle de ce RR dans la voie de signalisation de la contrainte osmotique orchestrée par HK1. Cependant, chez *Arabidopsis*, la régulation transcriptionnelle de l'ARR18, homologue du RR18, dans des feuilles de plantules soumises à un stress osmotique ainsi que son rôle positif dans la tolérance au manque d'eau au cours de la germination des graines, témoignent que cet ARR est un acteur dans la voie de signalisation "osmosensing" (Veerabagu, 2011). Cette étude conforte donc l'hypothèse d'une possible implication du RR18 dans cette voie chez le peuplier, et nous suggère que l'étude de la co-expression des transcrits des HPt et de ce RR doit se réaliser dans des cinétiques de temps tardifs, comme chez *Arabidopsis*.

Les interactions détectées entre le RR13 et les trois HPt, les teneurs importantes en transcrits de ce RR dans les différents organes de peuplier, et la possible régulation de ce gène par le stress osmotique (constatée dans l'ARTICLE III, par augmentation de l'expression du *RR13* dans les racines et les pétioles après 10 minutes de stress PEG) font de lui une cible intéressante à étudier.

Ces deux RR-B, le RR13 et le RR18 apparaissent donc comme de bons candidats pouvant faire partie des protagonistes de la voie "osmosensing". En conséquence, une étude fine de la régulation de leurs gènes sous l'impact d'une contrainte osmotique a été entreprise. Pour réaliser cette étude, des boutures de peuplier ont été soumises à un traitement PEG_{6000} durant une cinétique à la fois précoce et tardive, et la régulation des gènes *RR13* et *RR18* a été étudiée dans différents organes par la méthode de RT-PCR en temps réel.

Suivi de la conductance stomatique dans des plants de peuplier soumis à une contrainte osmotique

Les différents organes (racines, tiges, pétioles, feuilles) de boutures de peupliers cultivés en hydroponie ont été collectés en conditions témoin et stressée au PEG_{6000} (100 g/L) au terme d'une

cinétique de temps courts (5, 10, 20, 40 minutes) et longs (60, 120, 180 et 360 minutes). Pour s'assurer que les plants perçoivent le stress, les conductances stomatiques de six plants indépendants, correspondant à deux expériences biologiques, ont été mesurées au cours de cette même cinétique (FIGURE 23).

Nous avons pu constater que le stress induit une diminution progressive des conductances au court du temps, qui devient significativement différente de la condition témoin au bout de 20 minutes de contrainte. A la fin de la cinétique de stress (six heures), la conductance stomatique des plants stressés n'est plus que d'environ 50 mmole d'$H_2O.m^{-2}.s^{-1}$, soit approximativement 12 fois moins que celle mesurée au temps 0 (environ de 600 mmole d'$H_2O.m^{-2}.s^{-1}$).

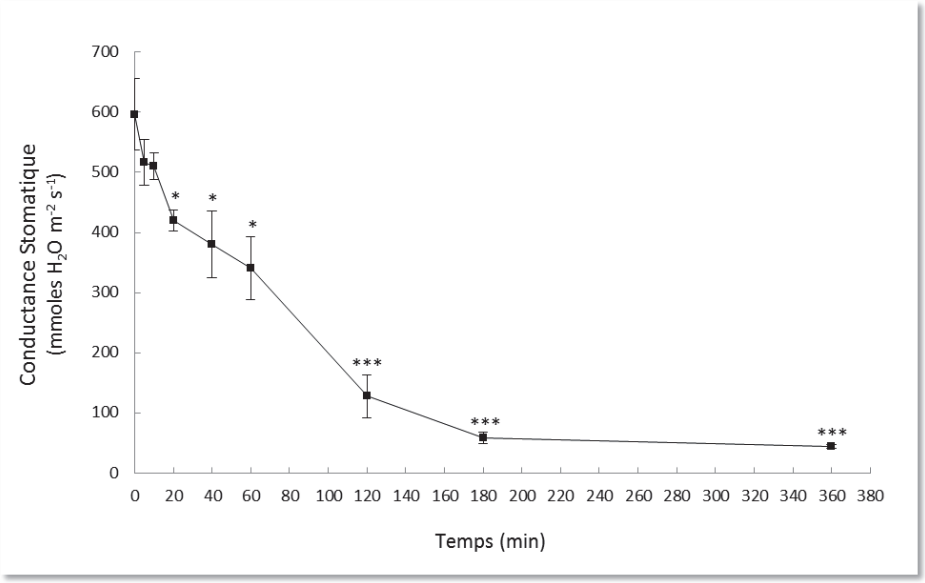


FIGURE 23 – Suivi des conductances stomatiques des plants stressés au PEG_{6000}

Mesures de la conductance stomatique (en mmoles $H_2O.m^{-2}.s^{-1}$) en fonction du temps (en minutes) des plants du génotype Dorskamp traités au PEG_{6000} à une concentration de 100 g/L. Chaque point représente la moyenne des mesures effectuées sur six plants (trois par expérience biologique). Les moyennes des mesures de la conductance stomatique en condition stressée ont été comparées à celles effectuées au temps 0 par un test-t et les différences significatives pour le traitement PEG sont indiquées par des astérisques (*P<0,05 ; ***P<0,001). Les barres verticales représentent l'erreur standard.

Régulation transcriptionnelle du RR13 par la contrainte osmotique

La comparaison des niveaux de base d'expression du *RR13* dans chaque organe en condition témoin (FIGURE 24), a permis de souligner que les transcrits de ce RR-B sont plus abondants dans les parties aériennes que dans les racines.

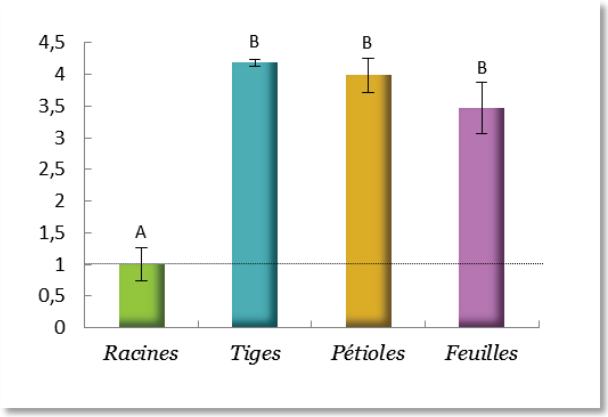


FIGURE 24 – Expression relative des transcrits du *RR13* dans les différents organes de boutures de peuplier en condition témoin

Le niveau d'expression relative du *RR13* a été mesuré dans différents organes (racines, tiges, pétioles, feuilles) des boutures de peuplier au temps 0, sans contrainte. Les calculs d'expression relative sont basés sur le niveau de transcrits du *RR13* dans les racines au temps 0 (calibrateur). Les valeurs moyennes (± erreurs standards) des expressions relatives du *RR13* au sein de chaque organe ont été comparées par une analyse ANOVA suivie d'un test Scheffe. Les valeurs portant une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de $P<0,05$.

L'analyse de la régulation transcriptionnelle du *RR13* présentée en FIGURE 25 permet de considérer chaque organe indépendamment afin de comparer l'expression relative du RR à chaque temps de la cinétique par rapport aux contrôles respectifs (temps 0).

Dans les racines (FIGURE 25, A), l'augmentation des transcrits du *RR13* par rapport au contrôle est significativement différente dès cinq minutes de stress. Les augmentations de l'expression des transcrits de ce RR sont respectivement d'un facteur 12 à cinq minutes, et d'un facteur 20 à 10 minutes. Ces teneurs, bien que diminuant globalement après 10 minutes de stress, restent néanmoins supérieures (cinq fois) à celles de la condition contrôle en fin de cinétique.

Dans les feuilles (FIGURE 25, D), on peut observer le même profil d'expression. Cependant, l'augmentation ne devient significative qu'à 10 minutes et les transcrits atteignent leur niveau maximal, de huit fois celles du contrôle, à 20 minutes de stress. On constate comme précédemment une diminution des teneurs de transcrits, tout en restant en fin de cinétique à des teneurs en transcrits trois fois supérieures à celles du témoin.

Dans les tiges (FIGURE 25, B), le profil présenté est également intéressant avec une augmentation significative des transcrits dès une heure de contrainte, et cette augmentation perdure au terme des six heures de traitement au PEG.

Dans les pétioles (FIGURE 25, C), de faibles augmentations des teneurs en transcrits sont observées (10, 20, 60 minutes), pour ensuite revenir à un taux relativement comparable à celui du témoin.

Ainsi, par cette approche, nous avons montré une régulation de l'expression du gène *RR13* sous l'influence d'un stress osmotique. Elle est tout d'abord caractérisée par une accumulation rapide et conséquente de ces transcrits (cinq à 10 minutes dans les racines, et 10 à 20 minutes dans les feuilles). En effet, les teneurs en transcrits du *RR13* ont augmenté jusqu'à 20 fois par rapport à celle du témoin dans les racines et jusqu'à 8 fois dans les feuilles. Il faut cependant garder à l'esprit que la teneur en transcrits en condition témoin dans les racines étant nettement inférieure à celle des feuilles, les niveaux des teneurs de ceux-ci à 10 minutes sont équivalents au sein de ces deux organes. Puis, le niveau d'expression de ce gène est globalement maintenu au cours du temps.

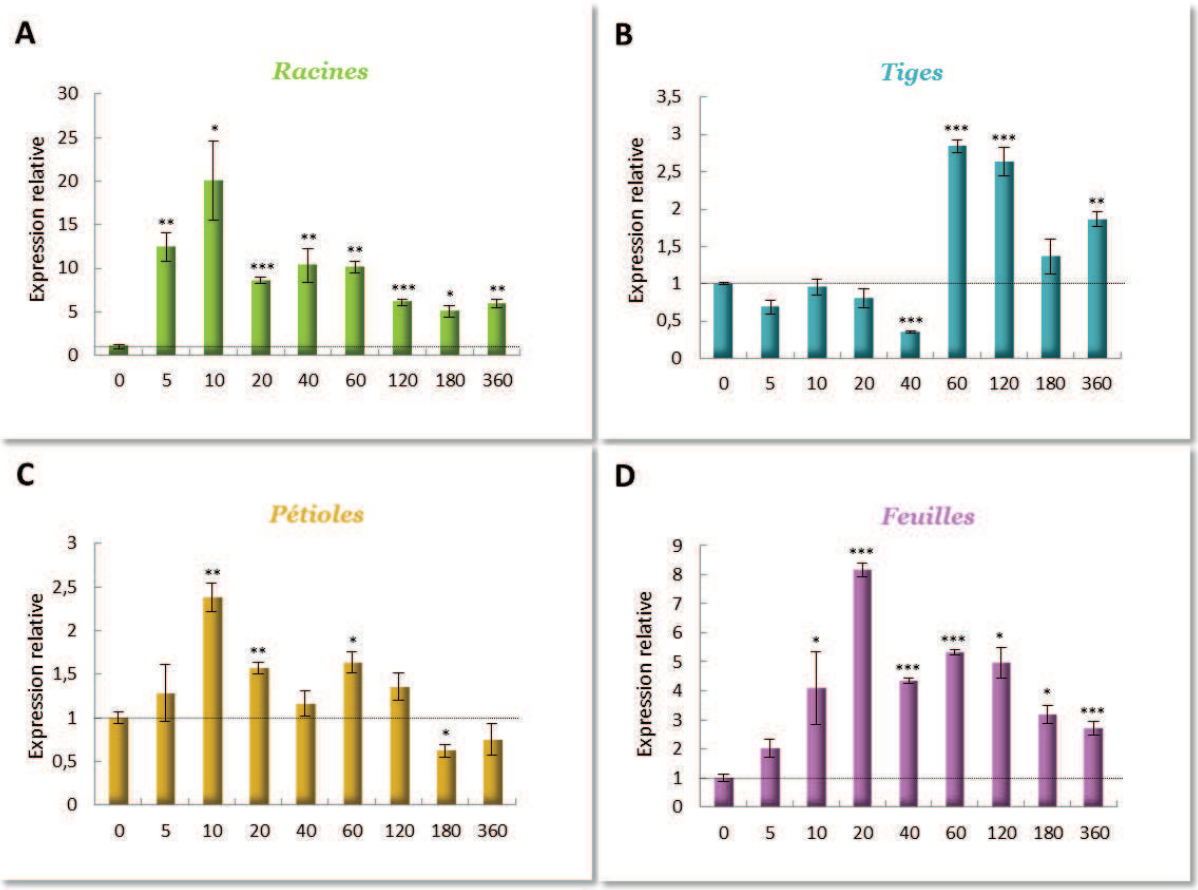


FIGURE 25 – **Expression relative des transcrits du *RR13* dans les différents organes de boutures de peuplier soumises à une contrainte osmotique au PEG_{6000}**

Le niveau d'expression relative du *RR13* a été mesuré dans différents organes : racines (A), tiges (B), pétioles (C), feuilles (D) des boutures de peuplier soumises à un traitement au PEG_{6000} (100 g/L) au cours de la cinétique de contrainte. Les calculs d'expression relative du *RR13* se basent sur le niveau de transcrits du *RR13* au sein de chaque organe au temps 0 (calibrateurs). Les valeurs moyennes (± erreurs standards) des expressions relatives à chaque temps de la cinétique ont été comparées à celles du temps 0 respectivement pour chaque organe par un test-t, les astérisques indiquant une différence significative (*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001).

Regulation transcriptionnelle du RR18 par la contrainte osmotique

Contrairement à ce qui est observé pour le *RR13*, aucune différence significative du taux d'expression du *RR18* n'est décelée entre organes en condition témoin (FIGURE 26).

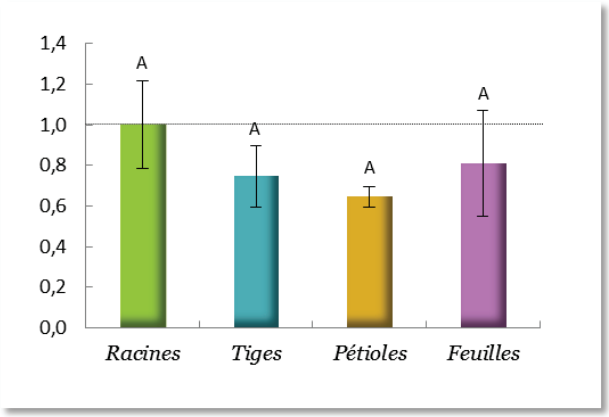


FIGURE 26 – Expression relative des transcrits du *RR18* dans les différents organes de boutures de peuplier en condition témoin

Le niveau d'expression relative du *RR18* a été mesuré dans différents organes (racines, tiges, pétioles, feuilles) des boutures de peuplier au temps 0, sans contrainte. Les calculs d'expression relative du *RR18* sont basés sur le niveau de transcrits du *RR18* dans les racines au temps 0 (calibrateur). Les valeurs moyennes (± erreurs standards) des expressions relatives du *RR18* au sein de chaque organe ont été comparées par une analyse ANOVA suivie d'un test Scheffe. Les valeurs portant une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de $P<0,05$.

Au cours de la contrainte, des augmentations ponctuelles du niveau d'expression du *RR18* sont observées dans les tiges et les pétioles à deux heures et cinq minutes respectivement (FIGURE 27, B-C). Contrairement aux racines dans lesquelles aucune variation significative de ces teneurs en transcrits n'est observée (FIGURE 27, A), les feuilles, quant à elles, voient leurs teneurs en transcrits *RR18* augmenter à partir de 40 minutes pour atteindre des teneurs de trois à cinq fois supérieures à celles du témoin en fin de cinétique (Figure 27, D).

Globalement, nous avons pu montrer que le *RR18* est régulé par le stress osmotique de manière tardive dans les feuilles.

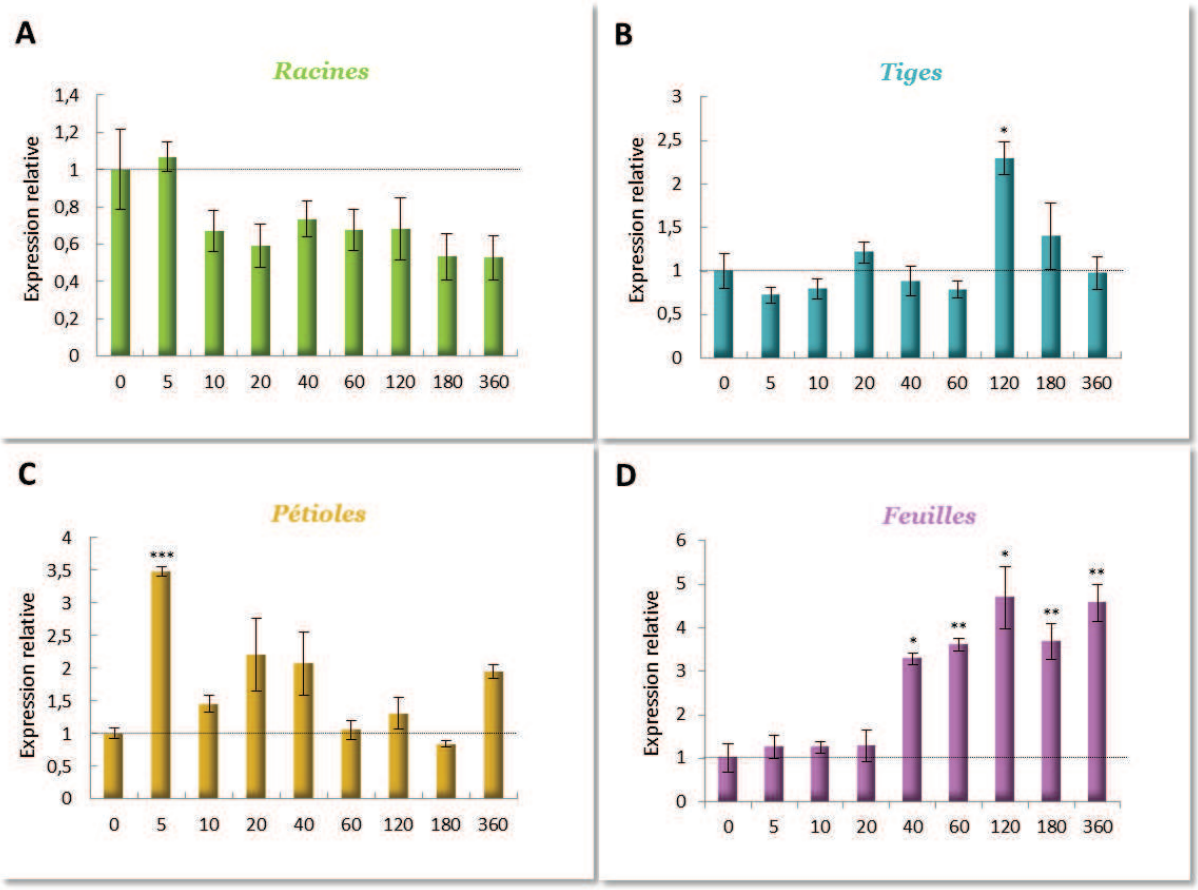


FIGURE 27– **Expression relative des transcrits du *RR18* dans les différents organes de boutures de peuplier soumises à une contrainte osmotique au PEG_{6000}**

Le niveau d'expression relative du *RR18* a été mesuré dans différents organes : racines (A), tiges (B), pétioles (C), feuilles (D) des boutures de peuplier soumises à un traitement au PEG (100 g/L) au cours de la cinétique de contrainte. Les calculs d'expression relative du *RR18* se basent sur le niveau de transcrits du *RR18* au sein de chaque organe au temps 0 (calibrateurs). Les valeurs moyennes (± erreurs standards) des expressions relatives à chaque temps de la cinétique ont été comparées à celles du temps 0 respectivement pour chaque organe par un test-t, les astérisques indiquant une différence significative (*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001).

III.2 Discussion

L'isolement d'un RR supplémentaire, le RR18, mène à neuf le total des isoformes de RR-B exprimées chez le peuplier génotype Dorskamp. En effet, toutes les caractéristiques requises qui permettent de rattacher ces protéines à la famille des RR-B ont été retrouvées pour chacune d'entre elles.

Afin de dégager parmi ces neuf protéines RR-B, celles potentiellement impliquées dans la voie de signalisation de la contrainte osmotique, des études d'interaction avec les trois HPt (HPt2, 7 et 9), interacteurs préférentiels de HK1, complémentées d'études de co-expression transcriptionnelle de

leurs transcrits respectifs ont été menées (ARTICLE III). Cette étude a permis, dans un premier temps, de mettre en lumière cinq RR-B comme potentiellement impliqués dans la voie de signalisation. Afin de compléter cette étude, une approche similaire a été conduite pour le RR18. La démonstration de la capacité du RR18 à interagir avec les trois HPt d'intérêt a été apportée à la fois en système hétérologue et *in planta*, validant sans équivoque ces interactions. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus, *in planta* par BiFC, pour l'ARR18 d'*Arabidopsis*, capable d'interagir notamment avec AHP1 (Veerabagu *et al.*, 2012). Cette dernière HPt d'*Arabidopsis* semble être plus proche des protéines HPt2, 7et 9 (ARTICLE I, FIGURE 5) avec des similitudes de séquence supérieures à celles que présentent les autres HPt de peuplier.

La difficulté d'isolement de ce *RR18*, dans l'étude précédente, à partir d'organes en conditions témoin et stressée au PEG_{6000} pendant 10 minutes (ARTICLE III), et la régulation transcriptionnelle tardive par le stress osmotique de son homologue ARR18 (Veerabagu, 2011), nous ont conduit à étudier la régulation de ce gène dans des boutures de peuplier au cours d'une nouvelle cinétique de contrainte plus longue *via* la technique de PCR en temps réel. Les résultats de cette étude nous ont, entre autre, permis de comprendre que ce RR n'est que faiblement exprimé dans les différents organes en absence de stress comparé au niveau d'expression du *RR13* (FIGURE 28). En outre, au moyen de cette étude, nous avons également montré que bien que les teneurs en transcrits du *RR18* soient relativement identiques dans les racines, les tiges, les pétioles, elles sont augmentées dans les feuilles sous l'impact de 40 minutes de stress et ce jusqu'à la fin de la cinétique. D'une part, ces données sont en accord avec les conditions restreintes d'isolement du RR18, *i.e.* à partir de feuilles stressées pendant trois et six heures au PEG_{6000}. D'autre part, nos résultats corroborent ceux obtenus dans l'étude menée chez *Arabidopsis*, montrant dans des conditions similaires aux nôtres (application de PEG_{6000} en culture hydroponique) une régulation de l'*ARR18* dans les feuilles au terme de six heures de stress (Veerabagu, 2011). Selon ces auteurs, ce RR est celui qui présente la plus forte augmentation transcriptionnelle le plaçant ainsi comme une exception chez *Arabidopsis*. Dans notre étude, nous avons pu montrer cette même régulation de ce gène avec comme information supplémentaire qu'elle est uniquement localisée dans les feuilles.

L'ensemble de ces données de régulation ainsi que les interactions entre ce RR18 et HPt2, 7 et 9, mises en évidence précédemment, suggèrent que ce RR pourrait jouer un rôle dans la voie de signalisation "osmosensing" plus particulièrement au niveau des feuilles et de manière plus tardive que le RR13.

Concernant le RR13, nous pouvons confirmer dans un premier temps par cette présente étude réalisée en RT-PCR en temps réel nos résultats obtenus précédemment et présentés dans

l'ARTICLE III, qui suggéraient une possible régulation transcriptionnelle positive dans les racines et les pétioles après 10 minutes de stress osmotique. Nos résultats montrent également que les transcrits de ce gène sont très fortement accumulés à la fois dans les racines et dans les feuilles de façon précoce, dès les premières minutes de la contrainte. D'autre part, ces teneurs restent relativement élevées au cours de la cinétique, également au terme des six heures de contrainte, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Veerabagu et collaborateurs (2011). Ces auteurs ont montré, dans les feuilles et au bout de six heures de stress, des augmentations, certes faibles, des transcrits des *ARR1* et *ARR2*, avec lesquels le RR13, rappelons-le, présente les plus forts pourcentages d'identité (ARR1 : 52,35% ; ARR2 : 52,94%).

Pour conclure, l'ensemble de ces données d'interaction ainsi que les régulations transcriptionnelles observées concernant les RR13 et 18 suggèrent leur implication dans l'induction des réponses en aval de HK1 et donc témoignent possiblement de leur fonction dans la voie de signalisation du stress osmotique.

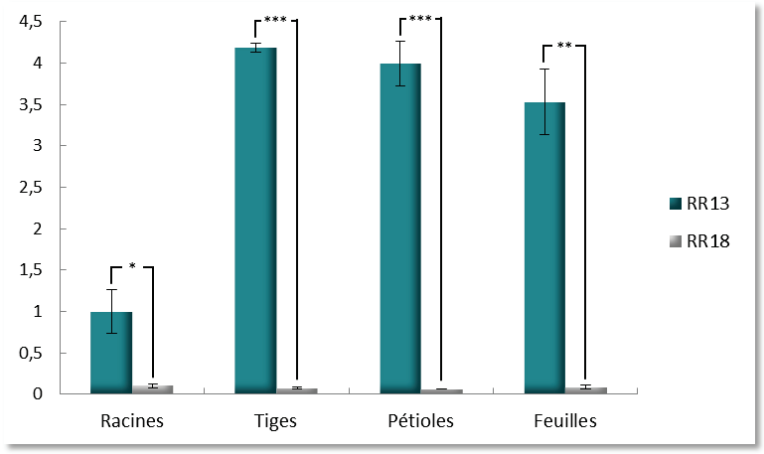


FIGURE 28 – **Expression relative des transcrits du *RR13* et *RR18* dans les différents organes de boutures de peuplier en condition témoin**

Le niveau d'expression relative des *RR13* et *RR18* a été mesuré dans différents organes (racines, tiges, pétioles, feuilles) des boutures de peuplier sans contrainte. Les calculs d'expression relative des *RR13* et *RR18* sont basés sur le niveau de transcrits du *RR13* dans les racines au temps 0 (calibrateur). Les valeurs moyennes (± erreurs standards) des expressions relatives du *RR18* au sein de chaque organe sont comparées respectivement à celles du *RR13* dans ces mêmes organes par un test-t. Les astérisques indiquent une différence significative (*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001).

Discussion

Identification des partenaires de HK1 dans la transduction du signal de la contrainte osmotique

I. CARACTÉRISATION FONCTIONNELLE DE HK1

Le rôle de chacun des domaines de HK1, définis par analyse de sa séquence protéique, a été testé et démontré dans cette PARTIE I.

Les domaines DHp et CA constituant HK1, domaine contenant le résidu histidine conservé en charge de la réception du phosphate et domaine catalytique de fixation de l'ATP respectivement, permettent bien d'exercer une activité histidine kinase, comme démontrée chez la levure. Ce qui confirme par ailleurs le rôle direct de ces résidus histidine et aspartate dans cette activité. HK1 est donc bien une protéine histidine-aspartate kinase.

La présence d'un coiled-coil d'hélices au sein de HK1 est en faveur d'une dimérisation (par un surenroulement) probable de cette protéine, action indispensable à son activité kinase comme démontrée chez les HK des systèmes bactériens. Cette capacité de dimérisation de HK1 a pu être montrée, mais uniquement avec sa partie cytoplasmique, en levure et *in planta*, en raison de la nature des techniques et systèmes utilisés pour cette étude (abordé précédemment). La visualisation de la capacité de HK1-CP à interagir sur elle-même constitue néanmoins une preuve tangible de la dimérisation de HK1. Cependant, la démonstration de la dimérisation de la protéine HK1 complète est incontournable, et nous permettrait d'apporter des informations décisives sur son état monomérique ou dimérique en condition normale de croissance ou de contrainte osmotique.

Il est admis que la région extra-cellulaire des récepteurs HK est impliquée directement dans la détection du *stimulus*. En montrant sa localisation au niveau de la membrane plasmique de la cellule, nous pouvons affirmer qu'HK1 est à l'interface entre les milieux intra- et extracellulaire, et que son domaine extracellulaire détecterait un signal, qui serait transmis au sein de la cellule et traduit chimiquement *via* son activité histidine kinase. En présentant 65% d'identité avec AHK1 d'*Arabidopsis*, il a été supputé que cette protéine pourrait elle aussi être un osmosenseur. Cette fonction de HK1 a donc été testée chez la levure. Cette étude a effectivement révélée qu'HK1 est capable d'agir en tant que tel dans la souche mutée Δ*Sln1* Δ*Sho1*. Bien que ces expériences fournissent une preuve de la fonction potentielle de HK1, elles ont été réalisées dans un système hétérologue et nécessitent d'être confirmées en plante. Dans le cadre d'une collaboration, une complémentation fonctionnelle de HK1 dans des plants d'*Arabidopsis* dépourvus d'AHK1 est en cours de réalisation. Concernant HK1, j'ai pu également initier au début de ma thèse, des expériences de RNAi (**RNA i**nterference) afin de supprimer, de manière contrôlée, son expression au sein de cals de peuplier. Cependant, des problèmes de constructions plasmidiques m'ont contrainte à laisser de côté un temps ces expériences. Ce projet a repris au sein du laboratoire en optant pour un autre système de clonage.

Les processus de détection du signal des osmosenseurs HK ne sont pas actuellement clairement définis à l'exception de Sln1p chez la levure qui a fait l'objet de quelques études qui permettent de proposer des mécanismes d'activation possibles de son activité kinase. Il a été proposé, en premier lieu, que Sln1p était capable de suivre et de détecter les changements de pression de turgescence de la cellule induits par un stress osmotique, notamment avec des modifications de son activité kinase en phase avec ces changements comme une augmentation de celle-ci lors d'une entrée d'eau potentielle dans la cellule (Tao *et al.,* 1999) ou comme une diminution lors de perturbations de la paroi de la cellule mimant une perte de turgescence (Reiser *et al.,* 2003). Plus récemment, il a été constaté que l'association de Sln1p avec des composants de la paroi et de la membrane cellulaire participe également dans les processus de détection de cette HK (Shankarnarayan *et al.,* 2008; Tanigawa *et al.,* 2012).

Chez les plantes, aucune étude n'a été réalisée et certaines inconnues, notamment concernant le rôle de certains domaines protéiques présents, demeurent toujours. Il est donc tentant sur la base de certains éléments de structure de se livrer à quelques spéculations quant à leurs fonctions respectives dans le contexte de cette famille de protéines.

- L'analyse de la séquence protéique de la partie extracellulaire de HK1 a également menée à l'identification d'un domaine appelé CACHE (**CA**$^{2+}$ channels & **CHE**motaxis receptors) isolé pour la première fois au niveau d'une dihydropyridine sensible au voltage généré par le Ca^{2+} chez les animaux et de récepteurs impliqués dans la chimiotaxie chez les bactéries (Anantharaman & Aravind, 2000). Ce domaine extracellulaire jouerait un rôle dans la reconnaissance de petites molécules ligands. La présence d'un tel domaine ouvre le champ des possibilités de détection de cette HK en suggérant que ce domaine CACHE de HK1 pourrait interagir avec une molécule constitutive de la paroi et utiliser ce contact comme un point d'ancrage. Ainsi, le *stimulus* activateur de la voie intracellulaire pourrait prendre la forme d'une tension. Une hypothèse selon laquelle cette HK se comporterait comme un mécanosenseur est alors envisageable.

- Le domaine HAMP (abordée en PARTIE II.1.a.1) localisé en partie N-terminale du dernier segment transmembranaire, est défini comme étant impliqué dans la transduction du signal entre le domaine extracellulaire senseur et le domaine effecteur du récepteur (Aravind & Ponting, 1999). Ce domaine correspond à un coiled-coil d'hélice et serait à l'état dimérique. Chez HK1, le coiled-coil prédit fait partie d'un domaine HAMP, suggérant également différentes possibilités d'implication du dimère et de ce domaine dans le passage de l'information du milieu extérieur à l'intérieur de la cellule. La flexibilité d'un tel arrangement, en "super-enroulement" peut nous interpeller quant à un mécanisme de transmission d'un signal. En effet, avec les changements induits, cet élément pourrait constituer une sorte de détecteur, sensible à de légères fluctuations, comme la distance entre la paroi et la membrane impactée par les mouvements d'eau entre les compartiments intra- et extracellulaires.

II. Partenariat d'interactions préférentielles en aval de HK1

Globalement, les études d'interaction chez le peuplier ou *Arabidopsis* entre les membres appartenant aux trois familles de molécules "signal" mettent en évidence la capacité d'un bon nombre d'entre eux à interagir ensemble (Tableau 4, Article II Figure 3). Chez le peuplier, la comparaison des séquences au sein des partenaires HPt ou RR de type-B (Figure 17, 19) montre une forte similitude de séquence entre les membres appartenant à une même famille de protéines. De plus, la redondance fonctionnelle ainsi que les nombreuses interconnexions de voies de signalisation chez *Arabidopsis*, mène à supposer que les HPt et les RR-B peuvent se comporter comme des pools de protéines non spécifiques d'un signal donné et donc d'une HK activée.

Cependant, la stratégie mise en œuvre correspondant à la réalisation conjointe d'études d'interactions complémentaires en levure et *in planta* et d'analyse de co-expression de transcrits, nous a permis de dégager un éventuel partenariat interactionnel. Une étude d'affinité des interactions protéine-protéine apporterait toutefois des réponses plus précises quant à une préférence d'interaction entre partenaires potentiels, comme démontrée dans certaines études d'interaction HK/HPt (Pekárová *et al.*, 2011; Bauer *et al.*, 2013). Malgré la conservation des surfaces d'interaction entre molécules "signal" HK/HPt ou HPt/RR, des différences minimes de séquence privilégieront certaines interactions entre membres de même famille.

Bien que la capacité d'une protéine à interagir avec son partenaire, déterminée possiblement par une affinité forte ou faible, soient mise en évidence, de nombreux paramètres liés à l'état physiologique d'une cellule interfèrent et pondèrent ces interactions.

Dans le cadre des relais multiples de phosphate, les préférences d'interaction peuvent être conditionnées par l'état de phosphorylation des protéines. Une étude de mesures d'affinité *in vitro* entre ETR1, récepteur à l'éthylène, et AHP1 a permis de montrer une préférence d'interaction lorsque les deux protéines sont dans des états opposés de phosphorylation (Scharein & Groth, 2011). A la vue de ces résultats, on peut donc suggérer que le récepteur transmettrait son phosphate à l'HPt par interaction directe, et une fois le phosphate transféré, elle se décrocherait du récepteur hypothétiquement à l'issue d'un léger changement de conformation de celui-ci. Nos résultats concernant le potentiel état de phosphorylation de HK1 (Article I) vont à l'encontre des précédents, montrant qu'une interaction entre HK1/HPt2 en conditions témoins (supposée dans le même état de phosphorylation) est observée, et est levée par utilisation d'une forme mutante d'HK mimant son état phosphorylé (D/E). Cette différence de résultats peut être reliée à l'utilisation de la technique double-hybride. En effet, étant dans un tel système, les subtilités d'interaction liées à l'état de phosphorylation peuvent être gommées, et l'interaction "forcée" même si la conformation optimale

pour l'interaction est la moins présente, en raison de la surproduction de protéines. En utilisant la forme de HK1 muté D/E, la conformation de l'HK est donc idéale pour l'interaction avec l'HPt puisqu'il est établi (Hass *et al.,* 2004; Kim *et al.,* 2006) qu'elle puisse mimer la présence d'un phosphate. Cependant, l'utilisation de ce type de mutant peut induire de petites modifications de charges sans doute responsables de la diminution du signal obtenu par ce système lorsque l'"interaction avec HPt2 est testée. Finalement, seule une détection directe de l'état de phosphorylation par phospho-protéomique par exemple permettra de définir l'impact du signal sur l'état de phosphorylation de l'HK, et la preuve du rôle du phosphate dans les interactions entre partenaires.

Pour qu'une interaction se produise, un des paramètres les plus fondamentaux qui rentre en jeu est la concentration de protéines à un instant t au sein de la cellule. Comme abordé précédemment, si une protéine qui présente une affinité modérée pour un de ses partenaires voit son expression augmenter (et donc à supposer *in fine* sa concentration) localement ou temporairement ou à la suite d'un *stimulus*, la faible affinité entre les deux partenaires sera alors compensée car les concentrations locales, à cet instant, seront au-delà de la constante de dissociation (conditions stoechiométriques). Les études transcriptionnelles constituent un bon outil pour effectuer un premier point de contrôle de la présence ou de l'absence des transcrits. Dans cette PARTIE I, ces études se sont déroulées en deux temps. D'une part, par RT-PCR relative classique, l'absence de détection de certains transcrits de gènes *RR-B* (*RR15, 21* et *22*) traduisant la possible absence de leur protéine, et la co-expression de ceux présentant un partenariat d'interaction potentielle avec les trois HPt, nous a permis de sélectionner certains RR comme candidats en tant que possibles effecteurs de réponse en aval de HK1. D'autre part, l'utilisation de la technique de PCR en temps réel pour étudier la régulation des *RR13* et *RR18* au cours d'une cinétique complète (temps précoces et tardifs) de stress osmotique a permis de mettre en évidence une régulation différentielle de ces gènes. Etant donné la possible implication du RR18 dans la voie "osmosensing" et compte tenu de sa régulation par le stress dans certains organes à des temps tardifs, ces dernières données nous amènent donc à reconsidérer les RR-B, peu exprimés, précédemment écartés. Une étude de la régulation de ces gènes à partir du même matériel réalisée par la même technique est donc nécessaire.

Cependant, les processus de localisation cellulaire ou de dégradation des protéines prennent également une place considérable dans la faisabilité des interactions entre protéines. En effet, les protéines RR pour lesquelles les transcrits ont été détectés peuvent être dégradées en fonction de plusieurs paramètres, à la suite d'une contrainte ou d'une augmentation transcriptionnelle. Ainsi, il paraît évident que cette modification régule, du moins en partie, la combinatoire interactionnelle à un instant t dans la cellule. Il se peut, en effet, qu'à la suite d'une dégradation contrôlée un

interacteur puisse se retrouver dépourvu de son partenaire préférentiel (de haute affinité) et interagisse avec un autre pour lequel son affinité d'interaction est moindre.

Partie II

Caractérisation du mode de fonctionnement des régulateurs de réponse de type-B

Bien que de nombreuses études aient caractérisé le rôle des régulateurs de réponse de type-B dans la voie de signalisation cytokinine, l'élucidation du mode de fonctionnement de ces protéines, en tant que facteur de transcription, n'est que partiellement réalisée.

Dans cette partie, les mécanismes de régulation qui peuvent intervenir chez les RR-B des plantes ont été décortiqués. L'analyse de la séquence protéique d'un RR-B de peuplier, le RR13, a permis de confirmer d'une part l'existence de deux domaines fonctionnels qui composent le RR, un domaine receveur ou DDK en charge de la réception du phosphate et un domaine de fixation à l'ADN dont la présence n'est retrouvée principalement que chez les plantes, le domaine GARP. D'autre part, l'existence d'une séquence non structurée en extrémité C-terminale nous a renseignés sur son probable rôle dans le recrutement de partenaires spécifiques pour la transcription de gènes de réponse. L'ensemble de ces caractéristiques présument de la fonction de facteur de transcription de ce RR13, d'ailleurs confirmée *in planta*. Les rôles de la dimérisation couplée à l'évènement phosphorylation dans l'activation de cette protéine ont été étudiés *via* une approche pluridisciplinaire.

Dans le chapitre I, un modèle du mode de fonctionnement généraliste d'un RR-B au moment de la réception du phosphate a pu être dégagé. Les RR-B apparaissent, de prime abord, comme des modulateurs généralistes capables d'agir après réception d'un signal comme effecteurs de réponse. Cependant, la mise en place de réponse adaptée à un signal donné *via* les phosphorelais multiples s'effectue entre autre par l'activation de RR-B particuliers, capables par certains mécanismes de

déclencher ou de participer à la transcription de gènes de réponses spécifiques prenant part à des complexes multifactoriels de régulation génique.

Dans le chapitre II, des éléments de réponse ont été avancés sur la façon dont ces RR-B pourraient cibler avec précision les gènes cibles qu'ils activent.

Chapitre I

Mécanismes de régulation du fonctionnement du RR13

De nombreux processus biologiques sont contrôlés au niveau de la transcription. La régulation de l'expression des gènes passe en effet par la contribution de nombreux facteurs, les uns interviendront par exemple sur la compacité de l'ADN en le déroulant et en remodelant la chromatine, les autres interviendront par exemple en prenant part à la formation des complexes de transcription à différentes étapes de celle-ci (Burley & Kamada, 2002). Dans les complexes de pré-initiation ou complexes de l'ARN polymérase II, les facteurs de transcription recrutés modulent l'expression de gènes par leur capacité à reconnaître spécifiquement une séquence dans une région de contrôle de l'expression (ou région promotrice) et d'en réguler l'initiation (Phillips, 2008). Ils peuvent ainsi constituer des activateurs ou des répresseurs (Ogata *et al.*, 2003), et jouer variablement ces deux rôles en fonction de l'environnement dans lequel ils se trouvent. Cette notion de combinatoire est déterminée à la fois par les différents éléments de réponse sur le promoteur du gène et par la présence ou non de ces facteurs de transcription dans le même espace et au même moment.

I. INTRODUCTION

I.1 Les RR-B, des facteurs de transcription uniques retrouvés chez les plantes, à l'architecture conservée

Les régulateurs de réponse de la famille des RR de type-B ont une architecture (ou organisation de domaines) clairement conservée (FIGURE 18) et qui n'est retrouvée que chez les plantes. Ils sont bipartites, c'est-à-dire, composés d'une part d'un domaine receveur RD ou DDK (base de données Pfam : Response regulator receiver Domain (PF00072)) (à l'extrémité amino-terminale) et d'autre part d'un domaine de liaison à l'ADN ou DBD (**D**NA **B**inding **D**omain) appelé GARP (base de données Pfam : Myb DNA-binding Domain (PF00249)) (partie centrale de la protéine). La présence conjointe de ces domaines fonctionnels et d'une extrémité C-terminale probablement *trans*-activatrice confèrent aux RR-B une fonction présumée de facteur de transcription.

I.1.a *Le domaine GARP, domaine de liaison à l'ADN*

Les facteurs de transcription peuvent être classés en plusieurs familles, et ce en fonction notamment du motif structural du ou des domaines de liaison à l'ADN (Phillips, 2008). Par exemple, chez les bactéries, l'ensemble des RR (capables de se fixer sur l'ADN) sont séparés en cinq familles caractérisées par leurs représentants respectifs qui sont les protéines OmpR, NarL, NtrC, LytR et Misc (Gao & Stock, 2009) d'ailleurs impliquées, entre autre, dans le contrôle de la tolérance à

divers stress (ROS, chocs osmotiques, chute de pH), de la motilité, de la virulence, de la synthèse d'éléments de la membrane externe. Chez *Arabidopsis*, 5% du génome code des facteurs de transcription représentés par un grand nombre de familles communes entre organismes eucaryotes ou spécifiques des plantes. Malgré la conservation des domaines de fixation à l'ADN en termes de séquence et de structure, les FT appartenant à des familles communes entre eucaryotes ne partagent pas forcément les mêmes organisations et architectures avec celles retrouvées dans d'autres règnes. Ces organisations peuvent être spécifiques et propres à chaque embranchement ou *phylum* avec des variations nettes entre deux FT relativement proches (Shortridge *et al.*, 2011). En effet, les DBD peuvent être arrangés de différentes façons avec toute une variété de domaines fonctionnels, conduisant à la création de nouvelles protéines spécifiques à certaines espèces (Riechmann *et al.*, 2000).

Le domaine de liaison à l'ADN GARP semble n'être présent que chez les eucaryotes notamment chez les plantes (FIGURE 29). Il est également retrouvé chez certaines protéines de mycètes et de métazoaires (base de données Pfam), dans lesquelles il est couplé à des domaines autres que le RD. Les FT qui possèdent ce domaine GARP sont rattachés à la famille des protéines "Myb-related" (Stracke *et al.*, 2001) et le domaine lui-même appartient à la superfamille SANT (SWI3, ADA2, N-CoR and TFIIIB" DNA-Binding Domains). Ils divergent au niveau du nombre de répétitions du motif de séquence Myb trouvé à l'origine dans l'oncoprotéine C-Myb chez les mammifères. Chez cette dernière, le domaine Myb est répété trois fois (R1, R2, R3) et chaque répétition adopte le motif structural appelé "hélice-tour-hélice" avec trois résidus tryptophane régulièrement espacés, pour former le cœur hydrophobe de chaque sous-domaine. Deux d'entre eux situés en partie C-terminale sont connus pour être capables de venir s'insérer dans le grand sillon de l'ADN au niveau d'un motif 5' C/TAACG/TG 3' (Jin & Martin, 1999; Zargarian *et al.*, 1999; Ogata *et al.*, 2003). Le domaine GARP d'environ 60 résidus, lui ne présente qu'une seule copie du motif Myb et peut être décrit par cinq zones successives différentes dont des séquences consensus ont pu être dégagées (FIGURE 29) (Tamai *et al.*, 2002). Ce domaine correspond notamment au DBD chez les RR-B de plante. Il est composé de trois hélices α stabilisées par des interactions hydrophobes au niveau de résidus spécifiques (Hosoda *et al.*, 2002) (FIGURE 30). Ce sont les hélices α2 et α3 (basiques) séparées d'un connecteur qui forment le motif structural "hélice-tour-hélice", unité de reconnaissance de motifs de séquence ou éléments de réponse dans l'ADN (Hosoda *et al.*, 2002). Notons que les résidus tryptophane ne sont pas en totalité retrouvés.

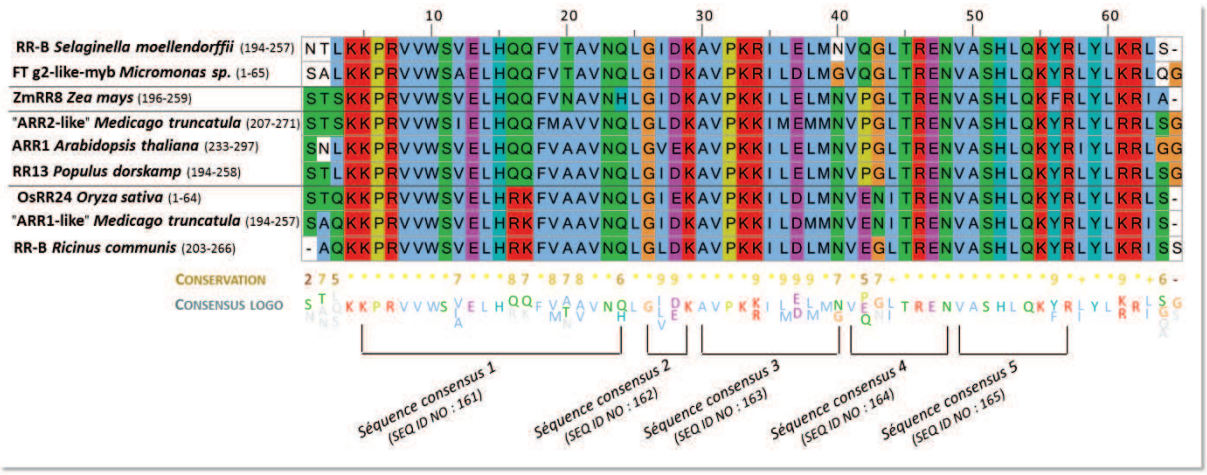


FIGURE 29 – Alignement du domaine GARP chez plusieurs espèces de plantes

L'alignement de séquences du domaine GARP de RR-B appartenant à plusieurs espèces de plantes prises dans la banque de données non redondantes RefSeq à partir de la réalisation d'un blast (psi-blast), a été réalisé avec le logiciel ClustalW. Les numéros d'accession des protéines (NCBI) sont, dans l'ordre, les suivants : gi|302770951|ref|XP_002968894.1, gi|255084361|ref|XP_002508755.1, gi|162460014|ref|NP_001104861.1, gi|357449081|ref|XP_003594816.1, gi|42570473|ref|NP_850600.2, gi|115444635|ref|NP_001046097.1, gi|115444635|ref|NP_001046097.1, gi|357466055|ref|XP_003603312, gi|255565035|ref|XP_002523510.1. Cette image a été générée par Jalview 2.8 avec le masque d'affichage de couleur "Clustalx" (ANNEXE 4). La conservation des résidus est représentée par une note de 0 à 9, par un astérisque lorsqu'un résidu est strictement conservé, et par un signe "+" quand la nature des résidus est conservée. La séquence consensus "logo" est donnée sous l'alignement, ainsi que la localisation des cinq zones correspondant aux séquences consensus (ANNEXE 5) (Tamai *et al.*, 2002).

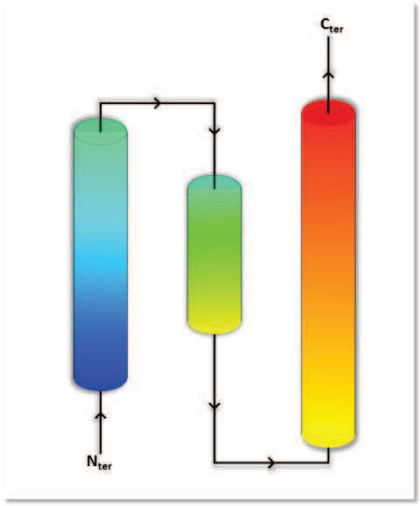


FIGURE 30 – Schéma topologique des structures secondaires du domaine GARP

Le domaine de fixation à l'ADN GARP est composé de trois hélices α. Les extrémités N- et C- terminales sont représentées respectivement en bleu et rouge. L'hélice carboxy-terminale est riche en résidus basiques et interagit directement et spécifiquement avec son élément de réponse en s'insinuant dans le grand sillon de l'ADN (Hosoda *et al.*, 2002).

I.1.b *Le domaine receveur DDK : structure prototype et activité régulatrice*

Comme précédemment abordé, le domaine receveur DDK commun entre les RR bactériens et les RR-B de plantes montre une conservation de structure appréciable (malgré des identités de séquences parfois entre 20 et 30 %).

Chez les bactéries, il est associé à toute une variété de domaines effecteurs suggérant qu'il ait avant tout un rôle régulateur. Les protéines en question peuvent avoir un domaine de fixation à l'ADN ou à l'ARN ou des domaines d'interaction protéine-protéine, voire des domaines catalytiques avec une fonction enzymatique (Gao & Stock, 2009).

Chez les plantes, notamment chez le peuplier, le domaine receveur DDK apparaît dans d'autres architectures, différentes de celles des RR-B. Il peut effectivement être retrouvé seul ou avec une combinaison de domaines, dont le domaine Histidine Kinase associé à des domaines CHASE, CASH, GAF, et des domaines de fixation à l'ADN dont LytTR (FIGURE 31). Il faut également noter qu'il entre également dans la composition des RR de type-A et -C dont la partie C-terminale est dépourvue de domaine effecteur. La base de données Pfam présente d'ailleurs 3468 architectures connues avec cette famille de domaine, tout organisme confondu (FIGURE 31).

Ce domaine est composé d'environ 120 résidus organisés en cinq brins ß et cinq hélices α selon la topologie $(\alpha/ß)_5$ (FIGURE 32). Son repliement appartient à la classe de Rossman avec un feuillet parallèle pris en sandwich par des hélices parallèles (deux d'un côté : α1 et α5, et trois de l'autre côté : α2, α3 et α4). Il se caractérise par des motifs de séquences hautement conservés, comme le DDK, motif fonctionnel (que l'on retrouve sur le RR13 aux positions D24-D69-K119) (Sakai *et al.,* 1998b).

Etant défini comme un domaine régulateur de l'activité du domaine effecteur chez les bactéries, on peut s'interroger sur les conditions de cette régulation, puisqu'il est capable de gouverner l'activité de plusieurs domaines effecteurs structuralement et fonctionnellement différents. La grande conservation des séquences mène à l'hypothèse d'un mécanisme de fonctionnement commun et également conservé parmi les domaines DDK, illustré par la nécessité d'une phosphorylation sur l'aspartate conservé au sommet du brin 3 (ou aspartate central du motif DDK). La présence de ce domaine DDK est sans doute indispensable au bon fonctionnement des protéines en question. D'ailleurs, chez *Arabidopsis*, lorsqu'il est "délété" de la séquence de RR-B, une activité constitutive est constatée indépendamment de l'apport de CK (Sakai *et al.,* 2001; Imamura *et al.,* 2003; Tajima *et al.,* 2004; Ginis *et al.,* 2012; Liang *et al.,* 2012). Liang et ses collaborateurs (2012) ont réalisé une série de délétions du domaine receveur DDK de l'ARR18 et ont conclu que la délétion des 45 premiers résidus mimait la forme active de la protéine complète et que ces résidus étaient sûrement impliqués dans le maintien de la conformation inactive de ce RR.

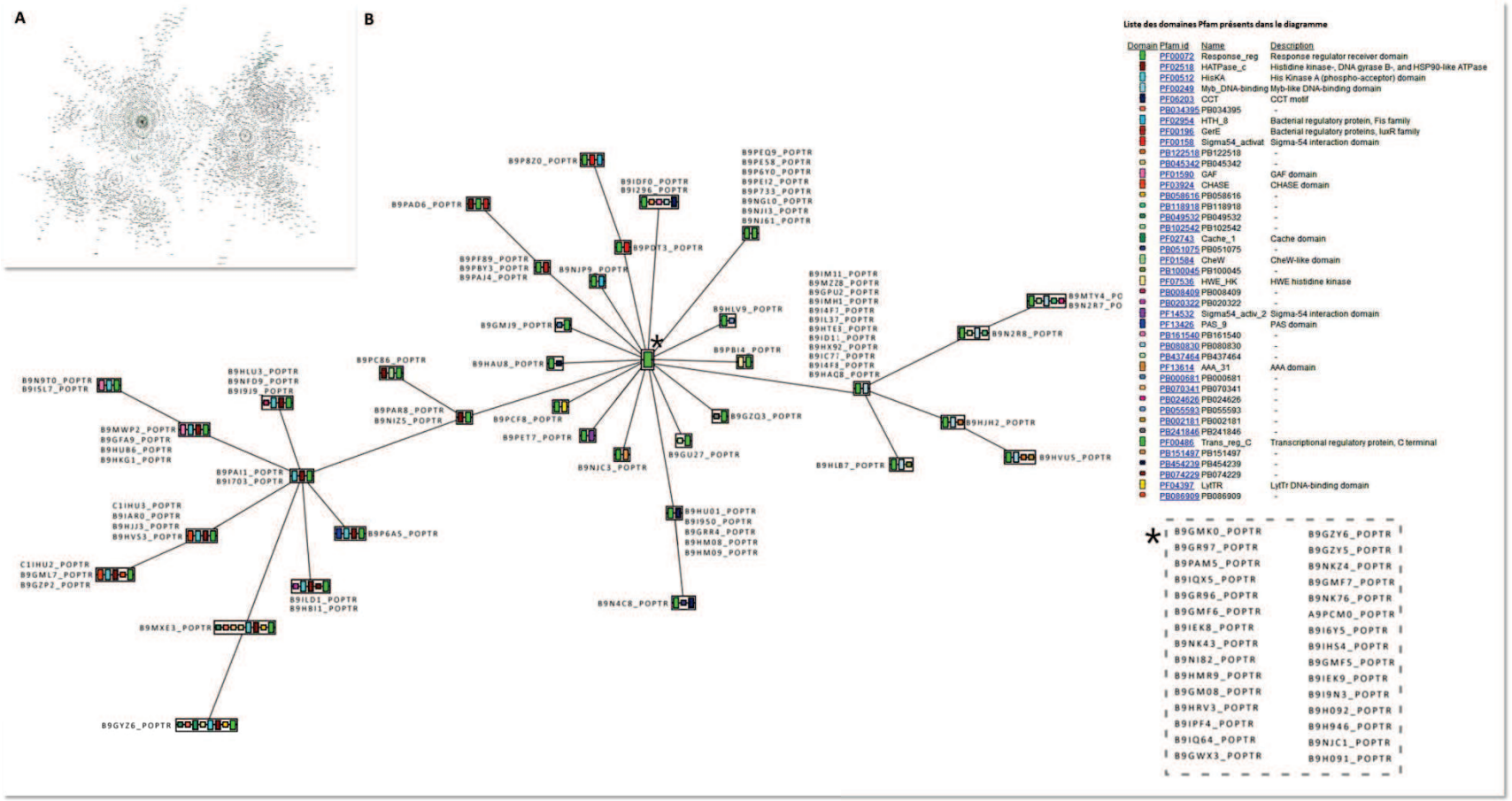


FIGURE 31 – **Diagramme des architectures contenant le domaine receveur présentes chez les organismes référencés notamment chez *Populus* dans la banque de données Uniprot**

A-Aperçu du diagramme des 4274 architectures différentes (parmi les 6555 répertoriées au total) qui présentent un domaine receveur RD (PF00072), existantes dans la base de données Uniprot. Ce type de domaine est retrouvé dans des arrangements avec 375 autres domaines dans 144780 des protéines indexées dans cette banque. B-Diagramme des différentes architectures avec un domaine receveur RD (PF00072) chez *Populus trichocarpa*. Il présente 37 arrangements qui associent ce domaine avec 2 autres domaines différents. Au total, 106 séquences relatives à cette espèce sont trouvées dans cette banque en septembre 2013.

En replaçant les RR-B comme membres à part entière des phosphorelais multiples histidine-aspartate, il est attendu que la phosphorylation soit susceptible de jouer un rôle déclencheur dans leur activation. Elle survient par transfert de phosphate d'une histidine phosphorylée d'un partenaire sur un résidu aspartate strictement conservé. La phosphorylation est susceptible d'apporter localement (en fonction du pH) deux charges négatives. Il s'en suit, afin d'atténuer cet apport de charge, une redistribution de la répartition des charges électrostatiques à la surface de la protéine ou en d'autres termes une redistribution dans le réseau donneur-accepteur de liaisons faibles à partir de ce point. Le changement conformationnel induit est d'ailleurs bien décrit par de nombreux auteurs qui relèvent notamment le changement d'orientation d'une chaine latérale aromatique bien conservée sur le milieu du brin 5, des résidus tyrosine ou phénylalanine (FIGURE 32), reflétant l'état d'activité du domaine régulateur (Davies *et al.*, 2009). A l'échelle du domaine, le changement conformationnel détermine les aptitudes d'interaction protéine-protéine dans les voies de signalisation. Globalement chez les bactéries, les RR sont en état d'équilibre entre deux conformations limites, une dite "inactive" et une autre dite "active", chacune offrant des surfaces d'interaction protéine-protéine intra- ou inter-moléculaire différentes qui induisent soit l'inhibition soit l'activation des domaines effecteurs (Gao & Stock, 2010).

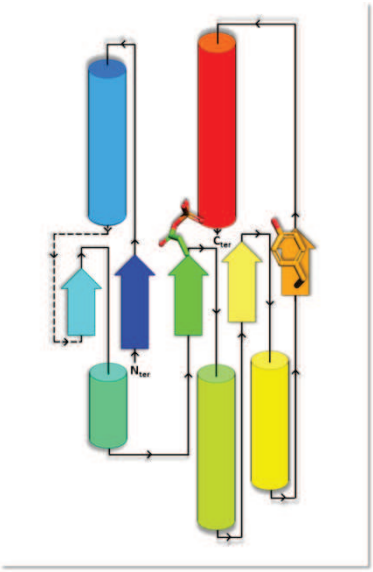


FIGURE 32 – Schéma topologique des structures secondaires du domaine receveur DDK

Le domaine receveur DDK est composé de cinq hélices α parallèles et cinq brins β qui forment un feuillet β parallèle pris "en sandwich" par les hélices (deux sur une face du feuillet et trois de l'autre). La progression dans la chaîne se fait selon un gradient de couleurs qui va du bleu (extrémité amino-terminale) au rouge (extrémité carboxy-terminale). Les localisations respectives du résidu aspartate phosphorylé (brin 3) et du résidu témoin de l'état d'activation du DDK (résidu phénylalanine ou tyrosine, brin 5) sont montrées.

I.2 La dimérisation des domaines DDK : un mécanisme envisagé pour une régulation des RR

Globalement, les membres de la famille de RR OmpR/PhoB sont majoritairement activés par leur phosphorylation (au niveau du domaine receveur) réalisée par leur HK partenaire. Cet événement induit un changement conformationnel de la protéine et son homodimérisation par le domaine DDK. Ce changement de forme se transmet allostériquement jusqu'au domaine effecteur et s'achève par la fixation du RR sur l'ADN par son domaine de fixation, comme c'est le cas notamment de PhoB (Mack *et al.*, 2009), de OmpR (Barbieri *et al.*, 2013), ArcA (Toro-Roman *et al.*, 2005). L'analyse de la surface d'interaction α4-ß5-α5 du domaine receveur, a montré une conservation des résidus impliqués dans la formation de contacts intra-moléculaires seulement au sein de la famille OmpR/PhoB (Toro-Roman *et al.*, 2005). Il est cependant difficile, malgré la conservation de structure tridimensionnelle du domaine régulateur receveur, de dégager un mécanisme commun de fonctionnement des RR (ENCADRÉ 1). D'ailleurs, l'état préalable à la phosphorylation en tant que monomère ou en tant que dimère semble différer en fonction du RR étudié, et ce même au sein d'une famille unique. En effet, pour les uns, la phosphorylation provoquerait la dimérisation chez certains RR comme ArcA (Toro-Roman *et al.*, 2005), OmpR (Barbieri *et al.*, 2013), FixJ (Birck *et al.*, 1999) jusqu'alors monomériques, tandis que pour les autres, comme avec l'exemple de PhoB, elle induirait le basculement d'un dimère déjà existant vers un autre impliquant toutefois des interfaces différentes (inactif : interface α1/α5, actif : interface α4-ß5-α5) (Mack *et al.*, 2009). Si on s'accorde à dire que l'élément déclencheur est lié à la phosphorylation/déphosphorylation, les événements de changements d'état et autres changements de conformation sont encore discutés puisque plusieurs études de structure de RR, toutes familles confondues, révèlent l'existence d'un certain nombre de combinaisons entre forme inactive ou active avec des interfaces de dimérisation différentes pour les domaines receveurs (FIGURE 33).

La dimérisation apparaît donc également comme un mécanisme de régulation supplémentaire ou du moins combiné à l'événement de phosphorylation dans l'activation des RR. Chez *Arabidopsis*, quelques exemples de dimérisation de RR-B ont été rapportés et obtenus grâce à différentes techniques (TABLEAU 6), l'homodimérisation de l'ARR14 ainsi que son hétérodimérisation avec l'ARR2 ont été montrées par des expériences de "GST pull-down" (Dortay *et al.*, 2006). Plus récemment, la capacité du facteur de transcription ARR18 à homodimériser a été démontrée chez la levure et *in planta* (Veerabagu *et al.*, 2012). Les auteurs ont étudié l'impact de la phosphorylation du résidu aspartate (D70) de ce RR sur la formation d'un homodimère, sur sa capacité à se fixer sur l'ADN et sur son activité transcriptionnelle. Globalement, les auteurs ont conclu : i) à la nécessité des

monomères de l'ARR18 d'être dans le même état de phosphorylation pour interagir, ii) à l'indépendance de l'état de phosphorylation sur l'aptitude de fixation de l'ARR18 sur le promoteur de l'ARR5 (RR-A), iii) à la dépendance de l'état de phosphorylation sur les capacités d'activation transcriptionnelle du gène rapporteur p_{ARR5}:*uid*A par l'ARR18.

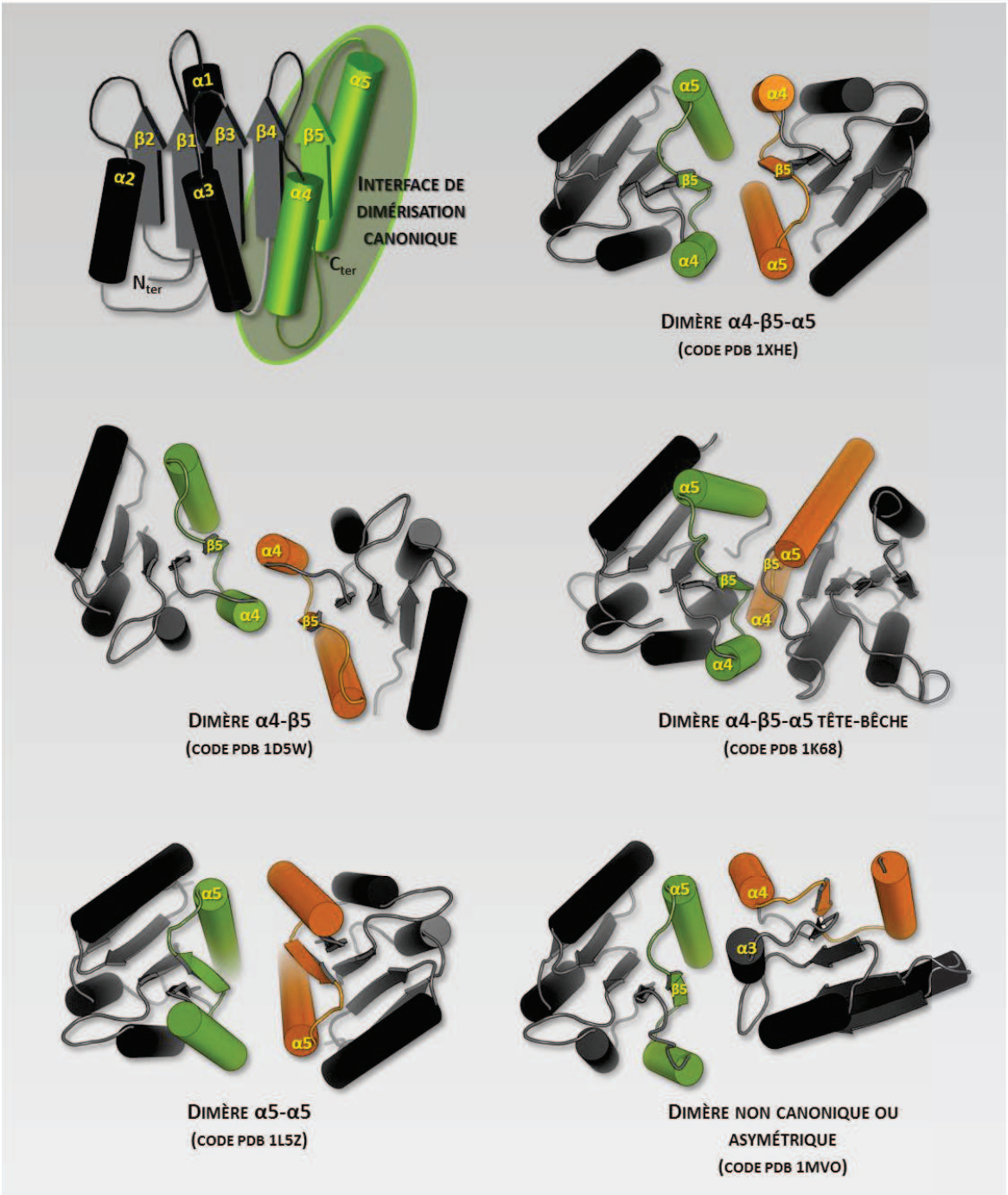


FIGURE 33 – **Les différents modes de dimérisation des domaines receveurs des RR bactériens**

La répresentation schématique en rubans de domaines receveurs dimériques illustrant les différents modes de dimèrisation communément rencontrés. L'interface α4-ß5-α5, désignée comme "interface de dimérisation canonique" est colorée en vert et orange pour chaque monomère composant le dimère. Les codes PDB des structures visualisées sont mentionnés sous chaque cas.

ENCADRÉ 1 — **Intérêts d'une approche de modélisation 3D pour rationnaliser la caractérisation fonctionnelle des protéines**

Il est désormais admis que **la connaissance du repliement ou arrangement des atomes dans l'espace de sa chaine polypeptidique permet de regarder la forme active d'une protéine et offre un avantage appréciable dans la caractérisation fonctionnelle** de celle-ci, quand beaucoup reste encore à découvrir. Cette caractérisation passe par l'étude structurale dès l'obtention des coordonnées atomiques, ce qui est essentiellement accompli par les deux techniques phares, à savoir la radiocristallographie et la résonance magnétique nucléaire ou RMN. Ces approches de biologie structurale ont été largement récompensées pour leur portée sur la compréhension du vivant avec plus 15 Nobels, dont dernièrement, celui de Chimie décerné à Martin Karplus qui a entre autre développé l'outil de modélisation CHARMM. A ce jour, de par la lourdeur expérimentale à mettre en œuvre pour chaque nouvelle étude, moins de 1% des protéines connues est déterminé structuralement alors que 95000 structures sont déjà accessibles dans la banque de données Protein Data Bank. Cependant, ces méthodes de biophysique requièrent des instruments dispendieux, des concentrations élevées d'échantillon suivies des analyses structurales et fonctionnelles des coordonnées déterminées.

Parallèlement, des approches informatiques ont été progressivement développées ces quarante dernières années pour d'une part réduire l'écart entre le nombre de séquences connues et celui des structures tridimensionnelles et d'autre part, pour parvenir un jour à proposer une loi physico-chimique exhaustive du repliement. Pionnier dans le repliement des protéines, Chris Anfinsen (Nobel de Chimie, 1972) a montré que les plans de l'édifice structural sont contenus dans la séquence, et que celle-ci suffit à elle seule à l'obtention de la structure native, généralement la forme la plus stable thermodynamiquement (ou de moindre énergie).

Basé sur ce constat, **la modélisation d'une protéine revient donc à essayer de trouver un minimum énergétique de stabilité** (en fonction de l'environnement), requiert essentiellement un bon champ de forces (qui quantifie l'énergie du système moléculaire à tout moment) et une bonne stratégie pour échantillonner l'espace conformationnel. Cela peut vite devenir excessivement consommateur en temps de calcul sachant que même pour de petites protéines le nombre de conformations possibles (à tester par essai/erreur) dépasse le nombre d'atomes de l'univers (paradoxe de Levinthal, 1969). Une manière de **réduire la zone de recherche dans l'espace conformationnel est de tenter de contraindre le modèle par des données expérimentales** qui peuvent soit être mesurées (mesures biophysiques et des données de biologie), soit **dériver directement des coordonnées atomiques relatives d'une protéine homologue de structure connue**. Cette dernière approche tire son efficacité du fait de la conservation évolutive de la structure dans les unités fonctionnelles que sont les domaines structuraux. En effet, pour schématiser, **l'évolution tend à conserver, chez une famille, deux caractères : les résidus qui constituent la charpente de la forme (invariants structuraux) et les résidus fonctionnels (impliqués dans une fonction)**. La protéine de structure connue et apparentée à la séquence de l'étude est alors utilisée comme "patron" et le positionnement des résidus équivalents dans un alignement devient déterminant dans la conformité du modèle à être prédit. Cette méthode prend le nom de "modélisation par homologie" ou "modélisation comparative". Ce type d'approches peut être choisi pour appréhender des problématiques comme la nôtre.

I.3 Interactions spécifiques inter- ou intra-moléculaire dans l'obtention de conformations active ou inactive : le niveau de régulation supplémentaire

Présentée de manière succincte précédemment, une stratégie de régulation supplémentaire existe, et réside dans la capacité du RR à établir des interactions protéine-protéine spécifiques en fonction de sa conformation, active ou inactive.

Premièrement, ce phénomène a pu être observé déjà au niveau de la formation du dimère. En effet, beaucoup de RR bactériens utilisent l'interface α4-ß5-α5 comme siège d'interaction entre partenaire ou sous-unités d'une même protéine.

Deuxièmement, plusieurs interactions de RR avec d'autres protéines régulatrices ou leur propre domaine effecteur ont été relevées chez les bactéries et les plantes.

I.3.a *Chez les bactéries*

Chez *E. coli*, le RR CheY impliqué dans le processus de chimiotaxie est phosphorylé par CheA, senseur de molécules attractives ou répulsives présentes dans le milieu. Une fois activé, CheY se fixe sur FliM, un composant des complexes des flagelles moteurs, ce qui provoque l'inversion du sens de rotation des flagelles (Djordjevic & Stock, 1998). Il est finalement désactivé par rétro-contrôle dans lequel la protéine CheZ stimule sa déphosphorylation (FIGURE 6). La résolution des structures des complexes CheY~P/CheZ (Zhao *et al.*, 2002) et CheY~P/FliM (Lee *et al.*, 2001) par cristallographie ont montré qu'une fois phosphorylé, CheY interagit par sa surface α4-ß5-α5 avec ces deux interacteurs.

Les domaines receveurs non phosphorylés des RR NarL (*E. coli*) (Baikalov *et al.*, 1996) et CheB (*E. coli* et *Salmonella typhimurium*) (Djordjevic & Stock, 1998) possèdent la capacité d'interagir avec leur propre domaine effecteur de façon à empêcher la fixation constitutive du domaine de liaison à l'ADN (NarL) ou inhiber l'activité méthyl-transférase en diminuant l'accès au site actif (CheB). Dans la famille OmpR/PhoB que l'on retrouve chez *Chlamydia, Helicobacter, Myxococcus, Streptomyces, et Synechococcus*, ce même mécanisme de régulation aurait été avancé pour DrrB (Robinson *et al.*, 2003). Cette fois encore, à la suite de la phosphorylation sur le résidu Aspartate, l'interface α4-ß5-α5 serait libérée de son interaction avec le domaine effecteur pour devenir alors disponible pour la formation d'un dimère. Une fois, désengagé de cette interaction protéine-protéine, le domaine de liaison à l'ADN pourrait alors se fixer sur ses cibles.

I.3.b *Chez les plantes*

Chez les plantes, moins d'informations existent à propos de ces régulations.

Chez *Arabidopsis*, Hwang & Sheen (2001) ont proposé qu'une protéine répresseur puisse se fixer sur le domaine receveur des RR-B non phosphorylés, afin d'inhiber l'activité du domaine effecteur. Cette répression serait alors levée avec la phosphorylation du RR. Cette hypothèse a d'ailleurs été approuvée par Liang et ses collaborateurs (2012) qui ont conclu que la délétion des 45 résidus du domaine receveur de l'ARR18 entrainait la perte du site de fixation du répresseur.

De plus, il apparaît également plausible que le RR-B puisse exercer lui-même un rôle répresseur ou activateur de la transcription de gènes de réponse par interaction avec d'autres facteurs de transcription. Deux études (Choi *et al.*, 2010; Veerabagu, 2011) ont montré d'une part, des interactions entre des RR-B d'*Arabidopsis* avec des FT de la famille des bZIP, bien que ceux-ci ne présentent pas de domaine receveur et d'autre part, des régulations transcriptionnelles distinctes par la présence des RR-B dans le complexe de transcription.

L'ARR18 (Veerabagu, 2011) serait capable d'interagir par son domaine receveur avec des FT bZIP appartenant au groupe C (Jakoby *et al.*, 2002). Ces FT bZIP forment eux-mêmes des hétéro-dimères avec des FT bZIP groupe S1 (Jakoby *et al.*, 2002; Ehlert *et al.*, 2006), et sont capables, d'agir en synergie pour activer la transcription de gènes cibles. Ces derniers présentent une régulation différentielle dans des plants sauvages en réponse à un stress osmotique ou dans des plants mutants délétés d'*ahk1*, mais également dans des graines dépourvues du gène *AHK1*. Ces gènes sont entre autre des gènes codants des albumines (*2S1* et *2S2*), le gène codant la proline déshydrogénase (*ProDH*) et certains gènes *LEA* (*Late Embryogenesis abundant*). La présence de l'ARR18 dans le complexe bZIP53 (groupe S1) et bZIP63 (groupe C) diminuerait significativement l'activité transcriptionnelle du complexe et donc le niveau de transcription du gène rapporteur *p2S1:uidA*. La phosphorylation du RR serait nécessaire pour son interaction avec le FT bZIP, et également dans l'exécution de son rôle répresseur de la transcription.

L'ARR2 (Choi *et al.*, 2010) serait, quant à lui, capable d'interagir avec TGA3, bZIP du groupe D (Jakoby *et al.*, 2002) qui est un régulateur de réponse impliqué dans la voie de transduction de l'acide salicylique, et donc dans la transcription de gènes de défense face aux attaques biotiques. Cette interaction se situerait dans la partie C-terminale du RR comprenant le domaine de fixation à l'ADN et la région *trans*-activatrice. L'ARR2, recruté par TGA3, formerait un complexe avec TGA3 et une protéine activatrice de la transcription NPR1, et ce trio de protéines activerait la transcription d'un gène de réponse *PR1*. Les auteurs ont montré par utilisation de la technique "GST pull-down",

que la phosphorylation du RR n'était pas nécessaire pour cette interaction, mais ont également argumenté sur la nécessité du signal CK dans l'augmentation de la résistance des plantes face à l'agent pathogène. Bien que l'ARR1 et l'ARR2 présentent une forte similitude de séquences (identité de séquence : 64%) (Mason *et al.*, 2004), seul l'ARR2 est capable d'interagir avec TGA3.

II. OBJECTIFS ET STRATÉGIES

Malgré les nombreux travaux portant sur les RR bactériens, des incertitudes persistent toujours, et bien que leur nature soit diversifiée, la question est de savoir si on peut dégager un mode de fonctionnement commun qui s'appliquerait également aux RR-B de plantes. Les connaissances concernant le mode de fonctionnement des RR-B ne sont pour le moment que partielles, et on peut ainsi s'interroger quant à la nécessité des RR-B à former un dimère pour accomplir leur fonction.

- Comment dimérisent t-ils ? Quelle interface mettent-ils en jeu ?

Nous connaissons déjà les capacités d'un RR-B à dimériser *in planta*, l'impact de la phosphorylation sur cette dimérisation et sur l'activité de *trans*-activation des RR-B (Veerabagu *et al.*, 2012), et également la capacité du domaine GARP seul à se fixer sur sa cible ADN en monomère (Hosoda *et al.*, 2002). Au vu de ces résultats, plusieurs questions se dégagent :

- Un RR-B doit-il être sous sa forme monomérique ou dimérique pour activer la transcription des gènes de réponse ?
- Si la dimérisation est nécessaire, quel rôle joue-t-elle dans la capacité du RR à se fixer sur sa cible ADN ?

Dans cette partie de travail, nous nous sommes focalisés sur un RR-B, le RR13 et l'objectif de ce travail est de décortiquer les mécanismes de régulation du fonctionnement d'un RR-B. Une analyse bio-informatique de ce RR a été réalisée, d'une part pour définir avec exactitude les bornes de chaque domaine et de statuer sur les constructions à utiliser pour effectuer cette étude, et d'autre part pour servir de base à l'élaboration d'un modèle du domaine receveur (DDK) du RR13, exploité par la suite pour proposer un mode de dimérisation *via* ce domaine DDK. Afin de valider ce modèle, premièrement les capacités de dimérisation de ce RR-B ont été testées *in vitro*, en levure et *in planta*. Par la suite, l'identification des acides aminés potentiellement impliqués dans cette interaction a été confirmée par une stratégie de mutagénèse. De plus, afin de comprendre le rôle du dimère dans l'activation des gènes de réponse, des expériences d'expression transitoire dans des cellules de plante sont prévues prochainement.

Un mécanisme de régulation potentielle du fonctionnement d'un RR-B a été proposé *in silico* *via* un modèle conceptuel basé sur l'analyse structurale de la modélisation. Les tests permettant de

valider cette hypothèse ont été réalisés en "GST pull-down" (ou "6xHIS pull-down").

L'ensemble des travaux n'est actuellement pas finalisé, mais l'obtention des résultats devrait prochainement pouvoir être envisagée.

III. RÉSULTATS

III.1 Le RR13 est un facteur de transcription

L'analyse comparée de l'ensemble des RR-B du peuplier en vue globale présentée en première partie (FIGURE 18) nous a permis de montrer l'appartenance de ces protéines, notamment le RR13, à la famille des RR de type-B. Nous avons zoomé sur chaque domaine et la séquence charnière les reliant afin de pouvoir comparer l'ensemble des RR-B de peuplier entre eux et ainsi compléter cette étude (FIGURE 34). Tous possèdent bien les deux domaines conservés et fonctionnels requis : le domaine receveur de la phosphorylation (DDK) et le domaine de liaison à l'ADN (GARP), relié par une charnière flexible, arborant un échelonnement d'environ 50 acides aminés allant de résidus basiques, à son extrémité amino-terminale (côté DDK), vers des résidus acides, à son extrémité carboxy-terminale (côté GARP) (FIGURE 18, 34). Le long segment qui vient après le domaine GARP et qui correspond probablement à la séquence de *trans*-activation (qui d'ailleurs comme le domaine GARP n'est pas présente chez les RR-A), apparaît être polymorphe entre RR-B et non structurée du fait de sa composition en acides aminés propices à la non structuration (FIGURE 18). Une analyse supplémentaire de la séquence du RR13 (FIGURE 35) à l'aide du logiciel IUPred (Dosztányi *et al.*, 2005) a permis de montrer qu'entre les résidus 140 et 200, et les résidus 260 et 670, la propension au désordre est significative. Cette analyse a été confirmée également par le logiciel DisProt (*Peng et al.*, 2006) (ANNEXE 6). De plus, la localisation nucléaire du RR (ARTICLE III, FIGURE 8) a confirmé la présence de séquences putatives de localisation nucléaire retrouvées de part et d'autre de la charnière.

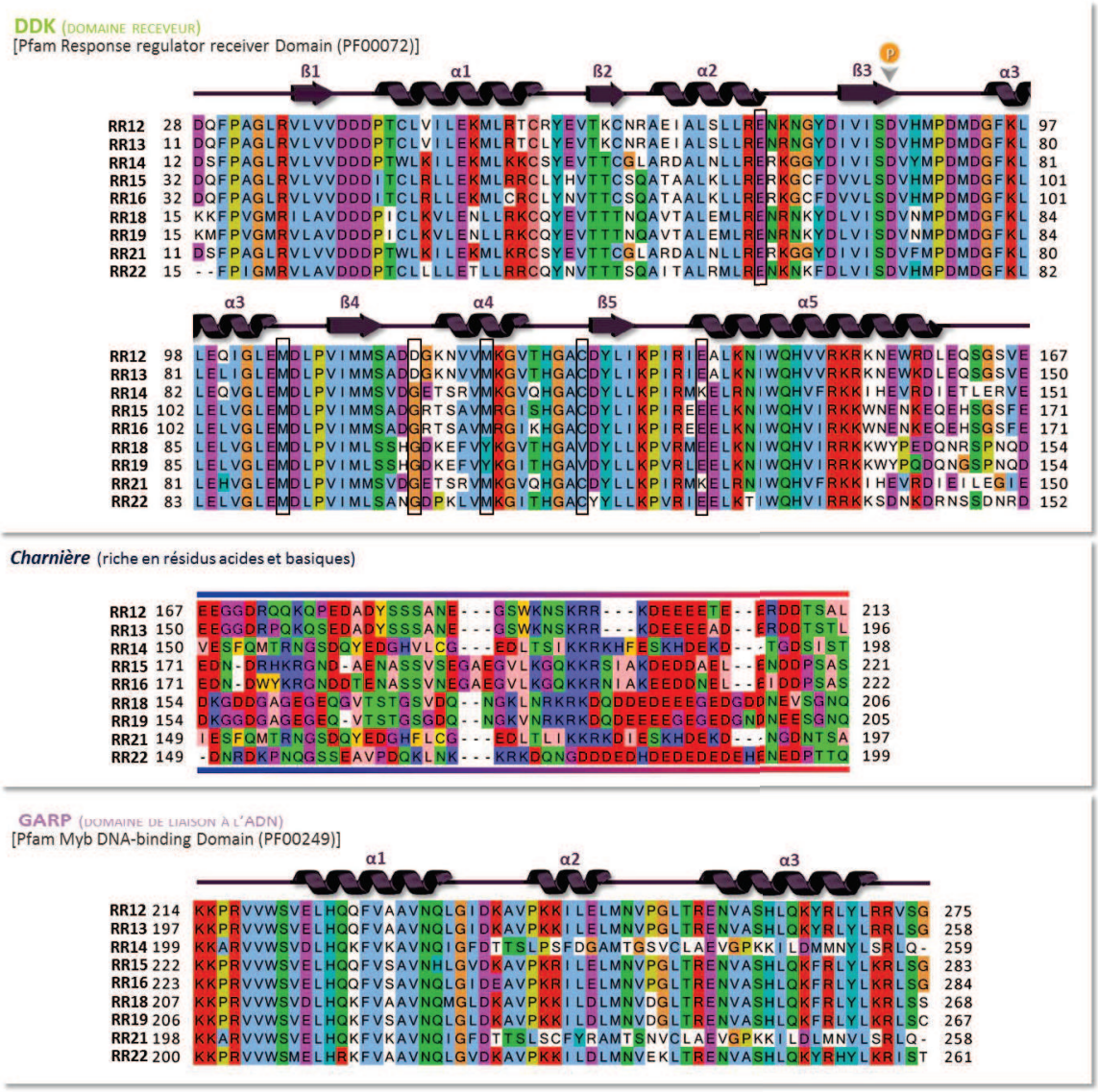


FIGURE 34 – Alignement des séquences des domaines receveur DDK et GARP, et de la partie charnière les séparant, des différents RR-B de peuplier

Cette figure se réfère à la FIGURE 19 (PARTIE I), et présente l'alignement des séquences des deux domaines receveur DDK et de liaison à l'ADN GARP, et celle de la partie charnière de l'ensemble des RR-B de peuplier. Les alignements ont été réalisés à l'aide du logiciel ClustalW, et leurs visualisations ont été générées par Jalview 2.8 avec le masque d'affichage de couleur "Clustalx" (ANNEXE 4) pour les domaines DDK et GARP, et celui de couleur "Taylor" (ANNEXE 4) (permettant de créer un contraste entre les résidus acides (rouges) et les résidus basiques (bleus)) pour la séquence charnière. Le résidu aspartate strictement conservé qui est phosphorylé lors de l'activation des RR est localisé. Les bornes des structures secondaires pour les domaines DDK et GARP sont représentées schématiquement au-dessus de l'alignement. Les résidus putatifs impliqués dans la formation du dimère considérés dans le cadre de cette étude sont encadrés dans la séquence du domaine DDK (Cf. III.2.b).

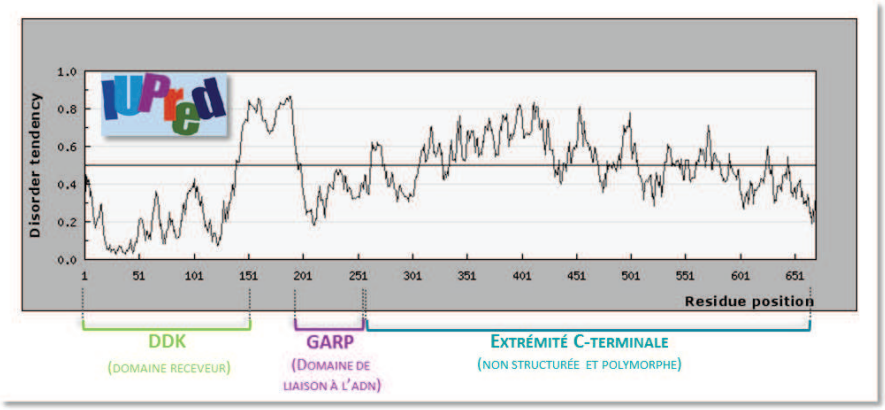


FIGURE 35 – **Profil de la propension au désordre de la protéine RR13 prédit par IUPred**

Cette représentation, qui décrit la tendance au désordre selon la progression dans la séquence, permet de retrouver les zones de structuration (utiles entre autre à l'étude par domaine fonctionnel d'une protéine) recouvrant les domaines DDK et GARP dont l'indice est inférieur à 0,5. Tandis que, deux zones sont prédites comme largement non structurées, la boucle "charnière" et la séquence *trans*-activatrice en carboxy-terminal, avec un indice supérieur à 0,5. Le RR13 peut donc être rattaché aux protéines partiellement non structurées ou PUP (**P**artially **U**nfold **P**roteins) (Tompa, 2002).

Vu l'architecture de cette protéine, on peut s'interroger quant à la capacité de ce RR à activer la transcription de gènes. Chez *Arabidopsis*, il est admis que les RR-B sont capables de réguler la transcription des gènes RR-A, et notamment concernant l'ARR6 possédant dans son promoteur le motif de fixation 5'(A/G)GAT(T/C)3' des RR-B (Rashotte *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2006). Etant donné, la similitude de séquences non négligeable entre l'ARR2 et le RR13 de peuplier (ARTICLE III, FIGURE1) (identité de séquence 52,94%), la capacité de la protéine complète du RR13 à se fixer sur l'ADN et à activer la transcription de l'ARR6 a été analysée par expériences d'expression transitoire *in planta* (FIGURE 36). Cette étude a été menée dans des cellules de *Catharanthus roseus*, co-transformées transitoirement avec le vecteur rapporteur P_{ARR6}:*LUC*, dans lequel est placé sous le contrôle du promoteur ARR6 "complet" le gène rapporteur de la luciférase, et avec les vecteurs effecteurs de surexpression soit pour l'ARR2 soit pour le RR13. Lors de ces expériences, le vecteur P_{UBI}:*GUS* a été utilisé en contrôle interne pour nous renseigner sur l'efficacité de transformation. L'activité du promoteur de l'*ARR6 via* les mesures d'activité du gène *luc* a été normalisée par les valeurs d'activité GUS du contrôle interne et la concentration de protéines contenues dans les cellules, en présence soit de l'ARR2 (contrôle positif) soit du RR13. Nous observons une augmentation de l'activité du gène rapporteur P_{ARR6}:*LUC* quand les deux protéines ARR2 et RR13 sont utilisées comme protéines effectrices (FIGURE 36). Ces résultats montrent donc que le RR13 est capable de reconnaître *in vivo* le promoteur ARR6 et d'activer sa transcription, de la même manière que l'ARR2 démontrant ainsi que les deux protéines sont au moins des orthologues.

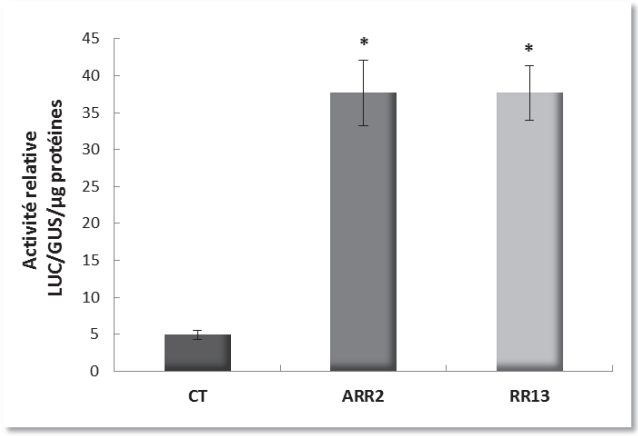


FIGURE 36 – Le RR13 de peuplier active le promoteur d'un gène de RR de type-A d'*Arabidopsis*

Les cellules de *Catharanthus roseus* ont été co-transformées avec un vecteur rapporteur luciférase contenant le promoteur entier de l'ARR6 (P_{ARR6}:LUC), associé à un vecteur contenant le promoteur Ubiquitine associé au gène rapporteur *gus* qui reflète l'efficacité de transformation (P_{UBI}:*GUS*), en absence (Contrôle : CT) ou en présence d'un plasmide effecteur (pRT104) exprimant soit l'ARR2 (35S:ARR2) d'*Arabidopsis* soit le RR13 (35S:RR13) de peuplier. L'activité LUC de chaque transformation a été normalisée par l'activité GUS, et les ratios LUC/GUS ont été rapportés à la quantité de protéines exprimées dans chaque cellule transformée. Les moyennes de chaque ratio LUC/GUS/µg de protéines données avec leurs erreurs standards de trois expériences de transformations indépendantes sont présentées pour chaque combinaison de transformation. Les valeurs moyennes sont comparées pour chaque condition au contrôle (CT) par un test-t. Les astérisques représentent des différences significatives (*P<0,05).

III.2 Le RR13 dimérise *via* une interface d'interaction α4-ß5-α5 conservée

III.2.a *Analyses bio-informatiques et modèle de dimérisation du RR13 par le DDK*

III.2.a.1 *Recherche de séquences homologues à celle du RR13 de peuplier à partir d'une banque de données*

Afin de rechercher des orthologues des RR-B, leur séquence protéique entière a été, premièrement soumise à un BLAST (PSI-BLAST) qui a criblé une banque de données non redondante, la RefSeq (Pruitt *et al.*, 2009) (ENCADRÉ 2). Ce qui a permis l'identification de protéines homologues chez tous les organismes répertoriés dans cette base de données. Notons que chez les plantes, aucune d'entre elles n'a été caractérisée structuralement concernant la protéine complète ou le domaine receveur. En effet, les seules données qui existent actuellement concernent le domaine GARP de l'ARR10 d'*Arabidopsis* dont la structure a été résolue (Hosoda *et al.*, 2002). La stratégie a donc été de réaliser une analyse comparative avec des protéines dont la structure du domaine receveur est

connue, notamment des RR appartenant aux systèmes bactériens. Ces recherches ont permis de borner avec précision les différents domaines de RR13, afin de garantir la production de protéines recombinantes repliées.

En ce qui concerne le domaine receveur seul, la même procédure a été effectuée (PSI-BLAST de la RefSeq) (ENCADRÉ 2) en prenant en considération le constat (suite au premier crible réalisé avec les séquences entières des RR-B, voir plus haut) qu'un motif localisé au niveau du brin 5 de l'interface de dimérisation (ACDY) est fortement conservé. Le nouveau crible avec cette fois, la séquence du domaine receveur du RR13 et ce motif, a été effectué lors d'une itération par PHI-BLAST, (**P**attern **H**it **I**nitiated BLAST, permet d'introduire un motif pour contraindre la recherche). Puis, la recherche de séquences s'est poursuivie par un PSI-BLAST (ENCADRÉ 2) jusqu'à convergence (c'est-à-dire qu'aucune nouvelle séquence ne soit trouvée) au bout de 19 itérations, qui ont permis de mettre en évidence 489 séquences. Un alignement effectué avec MUSCLE (Edgar, 2004) en utilisant la matrice de substitution Blosum62 a été réalisé avec toutes les séquences retenues possédant le motif considéré comme un crible, ce qui permet d'avoir une trace évolutive par position. La visualisation de cet alignement a été réalisée avec Jalview 2.8 (Waterhouse *et al.*, 2009) présentée en FIGURE 37.

III.2.a.2 *Elaboration d'un modèle de dimérisation du RR13*

Un crible (PDB-BLAST) de la banque de données PDB (**P**rotein **D**ata **B**ank), où sont consignées les coordonnées atomiques des structures résolues, a permis d'identifier plusieurs candidats pour la construction de modèles par comparaison de séquences (ENCADRÉ 2). Cette approche est renforcée par l'analyse exhaustive des séquences de protéines orthologues des RR-B mises en évidence précédemment. Le modèle retenu en sortie de Modeller (Fiser *et al.*, 2000) a été entre autre évalué par Prosa (ANNEXE 7) (Wiederstein & Sippl, 2007). Une étude structurale a ensuite été menée et une plausible complémentarité de charges, attendue chez les domaines receveurs, a été observée. Des outils (couple PDB2PQR/APBS, Baker *et al.*, 2001; Dolinsky *et al.*, 2007) qui permettent de calculer le potentiel électrostatique de surface ont été exploités pour apprécier la répartition des charges disponibles pour des interactions. L'analyse en détail de la surface pouvant être impliquée dans la dimérisation du RD a permis de proposer des résidus pouvant jouer le rôle de donneur ou accepteur de liaisons faibles. Par la suite, ceux-ci ont été utilisés comme contrainte ambiguë (ANNEXE 8) de modélisation conjointement à l'ordre deux de symétrie (étant attendu que le dimère le plus probable soit symétrique, FIGURE 33) dans le logiciel HADDOCK (Karaca *et al.*, 2010) dédié à l'amarrage moléculaire *in silico* (ENCADRÉ 3). Sur le modèle retenu, il apparait que 32 résidus

concourent directement à la stabilité du dimère. Les énergies de dissociations (ΔG_{diss}) ont été établies par PISA (ANNEXE 9) (Krissinel & Henrick, 2007). Elles correspondent à la différence d'énergie, entre la forme dissociée et la forme associée, et donc réflète une stabilité thermodynamique. Dans le cas de notre modèle, la surface enfouie dans l'interface fait 1232,4 $Å^2$ et met en jeu 12 ponts hydrogène et 9 ponts salins. A titre de comparaison, le domaine receveur Drr-B (code PDB : 3NNS), RR bactérien, évalué par PISA affiche une surface enfouie dans l'interface de 799.0 $Å^2$ et met en jeu 13 ponts hydrogène et 11 ponts salins (Janin *et al.*, 2008). Dans le cas de notre modèle le ΔG_{diss} est donné positif et évalué à 9,8 kcal/mol, tandis que celui de la structure prise ici en référence est négatif avec une valeur de -4,8 kcal/mol. Ce qui signifie qu'une valeur, lorsqu'elle est positive indique une stabilité thermodynamique avérée, autrement dit qu'une force extérieure devrait être appliquée pour dissocier le complexe (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/cgi-bin/piserver).

Le résidu à la base du brin 5 dans l'interface de dimérisation est une cystéine conservée qui fait face à celle de l'autre sous-unité. Etant donné leur enfouissement, il est envisageable de voir le complexe encore plus fortement associé par la formation d'un pont disulfure inter-chaines malgré le potentiel réducteur de l'environnement intracellulaire.

III.2.b *Choix de mutations pour l'obtention d'un RR monomère constitutif*

III.2.b.1 *Stratégie de détermination des acides aminés à muter*

La stratégie ici est de modifier graduellement la répartition des charges électrostatiques de surface à l'interface de dimérisation du DDK (FIGURE 39, A-C) et notamment d'exacerber la polarité positive afin de créer une répulsion entre les deux sous-unités au moment de leur synthèse dans la cellule. Par analyse des 32 résidus qui concourent directement à la stabilité du dimère modélisé, certains résidus se montrent particulièrement intéressants de par leur nature et leur position (FIGURE 39, B).

- Le résidu glutamate 123 (E123), chargé négativement, est situé au début de l'hélice α5 dans le motif PIRIE du RR13 (FIGURE 34, FIGURE 39, B). Dans le modèle d'interaction putatif, ce résidu est relié par un pont salin au résidu lysine 106 (K106) situé dans l'hélice α4 de l'autre monomère (FIGURE 38, C, D). Par analyse des alignements des RR-B de peuplier (FIGURE 34) et des domaines DDK d'autres espèces (FIGURE 37), on s'aperçoit que le résidu E123 peut être substitué par des résidus lysine ou glutamine ou asparagine. Vu le haut degré de conservation du résidu K106, on peut supposer un mode d'assemblage légèrement différent pour les complexes concernant ces protéines où cette substitution est trouvée (E123Q et E123N ou pour les bactéries E123K). L'apport d'une charge

positive, notamment par un résidu K, à la place du résidu E123 contrarierait l'attraction des deux monomères (FIGURE 39, C), sans compensation possible de l'environnement de ce résidu. Cependant, dans le cas contraire c'est-à-dire la mutation de K106 en résidu chargé négativement (E), l'apport de charge négative serait compensée par le résidu R121 du monomère en vis-à-vis. Il semble donc que localement la mutation E123K soit le meilleur choix pour diminuer l'affinité de l'interaction. De plus, l'existence de formes avec une lysine à cette position chez les bactéries notamment, permet de garantir une faible incidence sur le repliement d'une protéine de peuplier mutante.

- La méthionine 105 (M105) est un résidu non chargé hydrophobe (FIGURE 34, FIGURE 39, B), qui joue le rôle de verrou avec les deux résidus L116 et I117, eux-mêmes hydrophobes situés à la fin du brin 5 sur l'autre monomère (FIGURE 38, C, D). La création d'une charge positive à la place de ce résidu par un résidu lysine permettra de créer une répulsion suffisante pour abolir l'éventualité d'une dimérisation, en collaboration avec la mutation E123K précédente. Le mutant de cette position en résidu basique existe également parmi les séquences retrouvées dans la base de données RefSeq (*Cucumis savitus* ou *Solanum lycopersicum* par exemple), ce qui suggère une faible incidence sur le repliement de notre protéine RR-B mutée.

- Le résidu méthionine 88 (M88), situé à l'extrémité de l'hélice α3 (FIGURE 34, FIGURE 39, B), serait en interaction hydrophobe avec la partie aliphatique des résidus R134 et K135 faisant partie du motif très conservé chez les plantes HVVRKR (FIGURE 34, FIGURE 38, C, D). Un excès de charges positives (par résidu R) est donc envisagé également pour remplacer cette méthionine.

- Le résidu aspartate 99 (D99) du RR13 chargé négativement, situé entre le brin 4 et l'hélice 4 (FIGURE 34, FIGURE 39, B), fait un pont salin avec le résidu K101 (FIGURE 38, C, D). A noter que chez tous les autres RR-B de peuplier (sauf le RR12), le D99 est changé en résidu glycine impliqué lui dans un pont hydrogène avec globalement des résidus thréonine. L'absence de charge compensatoire à celle positive apportée par un résidu arginine devrait être en faveur de la répulsion des deux monomères.

ENCADRÉ 2 – **La démarche de la modélisation comparative**

La première étape consiste à rechercher parmi les structures existantes celles qui présentent un bon degré de similitude de séquence avec notre séquence d'intérêt. Cela s'effectue par comparaison de séquences deux à deux ("pairwise"), en utilisant le programme dédié **BLAST** (**B**ASIC **L**OCAL **A**LIGNMENT **S**EARCH **T**OOL). La trace évolutive peut être introduite sous la forme d'un alignement multiple dans lequel figurent les séquences apparentées à la séquence d'intérêt, trouvées lors d'une première requête. De cette manière, les positions conservées par l'évolution ou invariants structuraux dans une famille de domaines peuvent être mis en évidence. Ce résultat peut être obtenu en utilisant le programme PSI-BLAST (**P**OSITION-**S**PECIFIC **I**TERATED **BLAST**) qui utilise un algorithme de recherche de petits motifs. Lors des itérations de recherche, il est possible d'affiner la sensibilité par l'établissement d'une matrice de comparaison séquence-séquence basée sur l'itération de recherche précédente. Si le nombre de séquences apparentées connues ou de patrons possibles est faible, la modélisation peut être envisagée par une simple comparaison duale (séquence-séquence) avec une seule structure connue. Lorsqu'une liste de structures patrons est disponible, il faut en sélectionner une ou plusieurs pour construire un modèle. Outre les informations de l'alignement, qu'il est possible d'optimiser si nécessaire manuellement dans les cas de basse identité de séquences, certaines considérations biochimiques peuvent être prises en compte par l'expérimentateur comme par exemple l'environnement de la protéine *in situ* ou la fixation d'un ligand particulier. Ces informations peuvent servir à choisir parmi les différents candidats celui ou ceux qui partagent ces caractéristiques fonctionnelles, notamment quand des divergences en termes de structure sont dégagées parmi les patrons RSMD (**R**oot **M**ean **S**quare **D**eviation, distance appréciable lors de superpositions des différents homologues).

En général, la qualité de la structure de départ doit aussi être considérée. La modélisation à partir de plusieurs structures peut optimiser la précision du modèle en sortie (quand il existe différentes zones dans la séquence avec des ressemblances dans telle ou telle séquence de référence, la précision locale est augmentée). Le logiciel MODELLER (développé par Andrej Šali) l'autorise et est par ailleurs le plus utilisé pour la modélisation comparative. Gardons à l'esprit qu'un écart de position d'à peine un résidu va conduire à une erreur, un décalage dans l'espace sur le modèle prédit par rapport à sa structure réelle. Ainsi, le travail de ce logiciel repose sur la qualité de l'alignement de départ. Il incorpore une approche qui dérive des contraintes spatiales ("restraints", permissives contrairement aux "constraints" qui sont *a priori* inviolables) des structures patrons guidées par l'alignement des séquences. Ces relations spatiales des distances et angles sont exprimées sous la forme de fonctions de densité de probabilité conditionnelle (pdfs) utilisées au cas par cas comme des contraintes. Cela est finalement couplé à une fonction cible variable (expression énergétique du champ de forces) que le programme cherche à minimiser par des approches de gradient conjugué, de dynamique moléculaire et de recuit simulé. Une fois les modèles construits, ils sont évalués pour déterminer l'existence d'erreurs potentielles. La conformité avec les contraintes utilisées est un des critères. Il est possible d'évaluer la conformité de stéréochimie (longueur de liaisons, angles dièdres, distances interatomiques entre atomes non covalemment liés) avec des programmes dédiés. D'autres évaluations existent telle que l'évaluation de PROSA qui calcule un profil de pseudo-énergie qui renseigne sur l'énergie pour chacune des positions dans la structure. Une fois ces étapes passées, il est possible de regarder avec confiance le modèle pour essayer de dégager des pistes de recherches quant au fonctionnement singulier, à l'échelle moléculaire, de cette entité fonctionnelle.

ENCADRÉ 3 – **L'amarrage *in silico* par HADDOCK**

Logiciel d'amarrage, HADDOCK (**H**IGH **A**MBIGUITY **D**RIVEN BIOMOLECULAR **DOCK**ING) a été développé par Alexandre Bonvin à Utrecht (Pays Bas). A l'origine, il servait à **modéliser sous contraintes**, issues de mesures RMN, des complexes impliquant des macromolécules biologiques. Il dérive de CNS (**C**RYSTALLOGRAPHIC AND **N**MR **S**YSTEM), une suite de programmes de traitement de données biophysiques acquises par radiocristallographie et RMN afin d'uniformiser le calcul de structures, développée dans les années 90 par Axel Brunger, Marius Clore, Waren DeLano et Michael Nilges. La mise en forme des contraintes d'HADDOCK est typiquement celle requise en entrée de CNS. Il permet d'utiliser, **en point de départ d'un calcul d'amarrage, deux molécules dont la forme libre est connue et quelque information sur les interfaces au centre des complexes moléculaires.** Ces informations peuvent provenir de travaux de cartographies par RMN, de données de diffusion aux petits angles (SAS), d'analyse de cross-linking par spectroscopie de masse ou de données de mutagenèse, entre autre. Si ce genre d'information est manquant, **des prédictions assistées par des logiciels tels que WHISCY, Protein-protein Interface Prediction ou par l'analyse structurale peuvent permettre de diriger un amarrage**. HADDOCK ne requiert donc que les coordonnées atomiques (ou coordonnées cartésiennes PDB) et une délimitation d'interfaces.

L'un des points fort de ce programme est de considérer une suite de résidus (actifs et passifs) comme des contraintes dites "ambiguës" (permettant l'exploration combinatoire pour dégager des solutions plausibles) et **d'introduire de la flexibilité reproduisant en quelque sorte les changements conformationnels qui se produisent naturellement lors d'interactions au niveau des chaines latérales mais aussi de la chaine principale** HADDOCK, en permanente évolution, est accessible au monde académique par une simple demande à son auteur.

En 2010, étant donné l'efficacité prédictive, il est le logiciel le plus cité en matière de Docking *in silico* et plus de 650 laboratoires l'utilisent à travers le monde. Les résultats sont interprétables grâce à un classement par "fonction cible" qui correspond à la somme pondérée de différents termes énergétiques du système, comme les énergies de liaison (van der Waals, électrostatiques, désolvatation, violations de contraintes, surface enfouie…) et à une "clusterisation" de familles de conformères par superposition des structures en sortie.

Plusieurs outils concourent à son utilisation et sont livrés tels quels ou disponibles sur le site HADDOCK Software web portal (http.//haddock.science.uu.nl/), comme WHISCY évoqué précédemment ou 3D-DART qui permet de générer les coordonnées d'acides nucléiques courts (AN) en vue de les utiliser en guise d'interacteurs dans la génération de modèles de complexe protéine/AN.

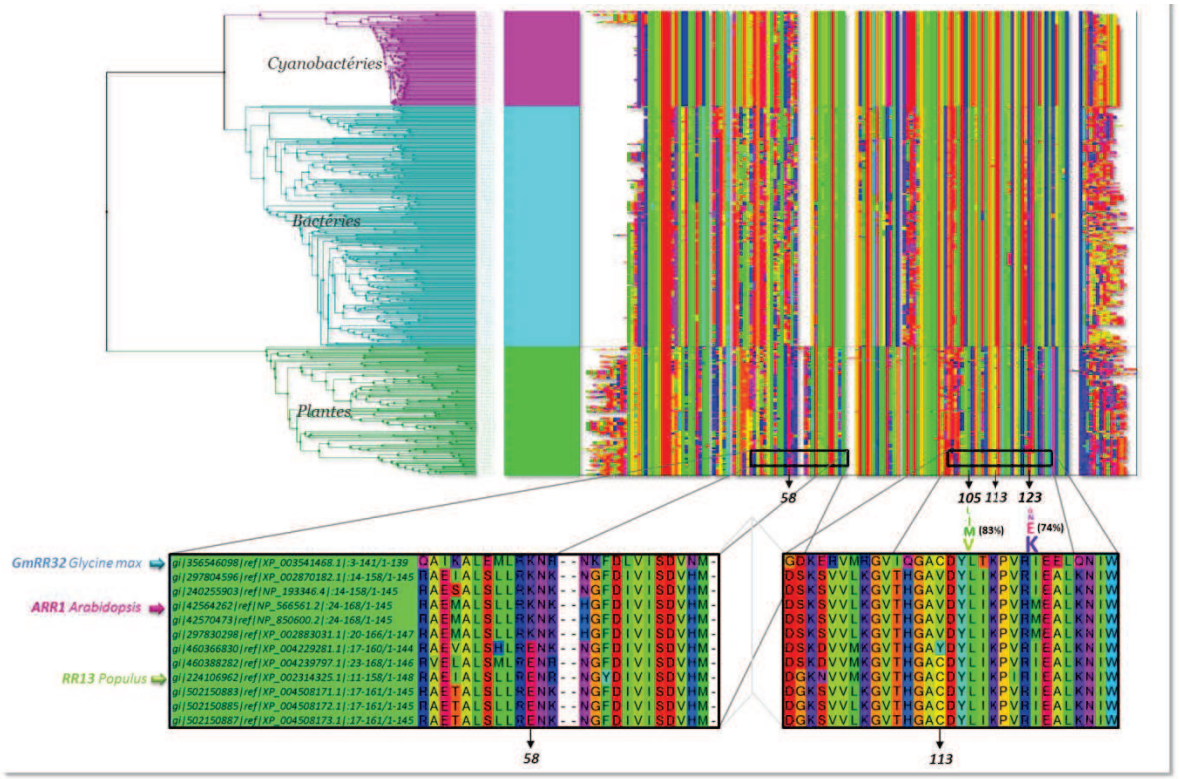


FIGURE 37 – Alignement de séquences des domaines receveurs de protéines, sélectionnées à partir d'une base de données, appartenant à plusieurs espèces

Cet alignement de séquences a été réalisé à partir de la banque de données non-redondante RefSeq. Son crible a été exécuté à partir de la séquence du RD de RR13 lors d'une première itération avec le logiciel PHI-BLAST contraint au motif ACDY. Les itérations ont été poursuivies jusqu'à convergence (19 itérations) avec un PSI-BLAST (seuil de 0,001). Il apparaît sur l'alignement global qui comporte 496 séquences issues de cyanobactéries, bactéries et plantes classées par distance moyenne inter-séquences sur une matrice BLOSUM62, que certaines positions sont très conservées et intéressantes pour notre étude : E123, M105, E58, C113. **Les positions E123 et M105** montrent un pourcentage de conservation respectif de 74% et 83% au sein du sous-groupe plantes. **La position E58** de RR13 apparaît strictement conservée dans 40% des séquences trouvées avec cette approche (PSSM). On constate qu'une mutation existe parmi certains organismes, comme *Glycine max*, où la mutation E58K (position de RR13 de *P. dorskamp*) peut survenir sans remaniement ni compensation locale (fin de l'hélice 2). **La position C113** de RR13 est également conservée (89%) dans le sous-groupe des plantes. Cette position à la base du brin 5 pourrait permettre la formation d'un dimère constitutif. Il est remplacé par un résidu apolaire (V) dans ce groupe tandis qu'il provient d'un résidu chargé (donc très probablement exposé) chez les bactéries et cyanobactéries.

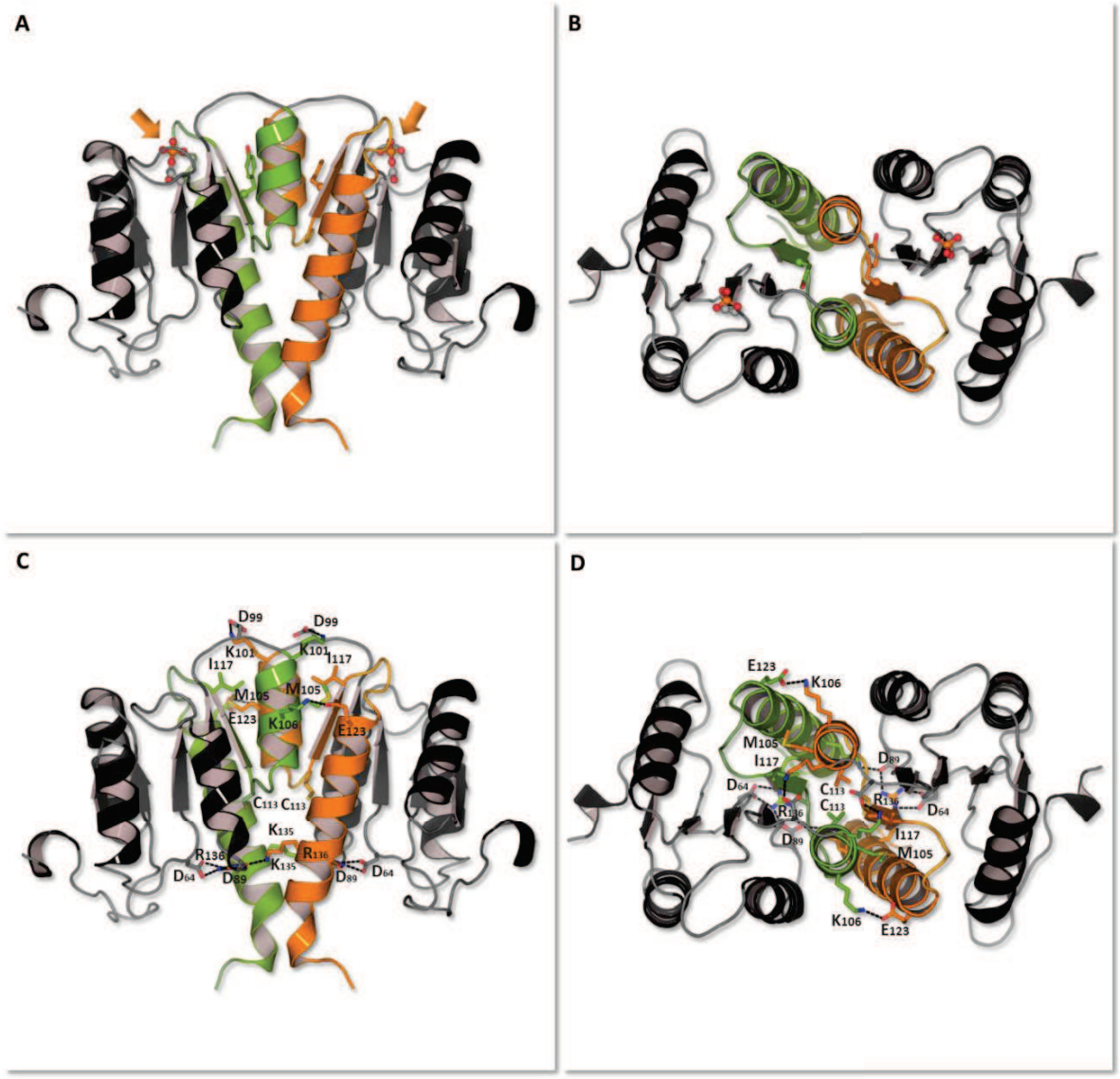


FIGURE 38 – **Visualisation en 3D du modèle de dimère formé par le DDK du RR13 de peuplier**

Les représentations schématiques en rubans de la structure 3D du dimère α4-ß5-α5 en sortie du calcul HADDOCK vues de côté (A) et du dessus (B) montrent l'orientation relative des deux DDK monomères. L'interface α4-ß5-α5 d'un monomère est représentée en vert et celle de l'autre monomère est représentée en orange. Les sites de phosphorylation D69 y figurent par représentation en "boules et bâtons" et sont montrés par une flèche orange (A-B). Des vues plus détaillées de l'interface de dimérisation (C-D) désigne les résidus impliqués dans la stabilisation du dimère et utilisés en partie dans nos expériences de mutagénèse, également par représentation en "boules et bâtons". Les ponts salins sont représentés par des lignes pointillées. Les images de cette figure ont été générées avec PyMOL (DeLano & Bromberg, 2004).

- Le résidu cystéine 113 d'un monomère se retrouve face à celui de l'autre monomère dans le modèle d'interaction (FIGURE 37, C, D), ce qui suggère la possibilité d'un pont disulfure rendant stable le dimère néoformé. Afin d'empêcher sa formation, la mutation de ce résidu en résidu basique, chargé négativement (K) a été envisagée. A noter que ce résidu est très conservé (89%) dans le sous-groupe des plantes (FIGURE 37) sauf chez quelques représentants trouvés chez *Arabidopsis*. (ARR1 et ARR2, C113V), *Solanum persicum* ("ARR2-like", C113Y), *Ricinus communis* (RR putatif, C113V) et *Medicago trunculata* ("ARR1-like", C113R). Ceci suggère que l'apport d'un résidu basique à cet endroit n'est pas délétère pour le repliement de cette protéine et que pour ces RR dépourvus de cystéine, s'ils fonctionnent en dimère, l'interface mise en jeu n'est sûrement pas identique à la nôtre.

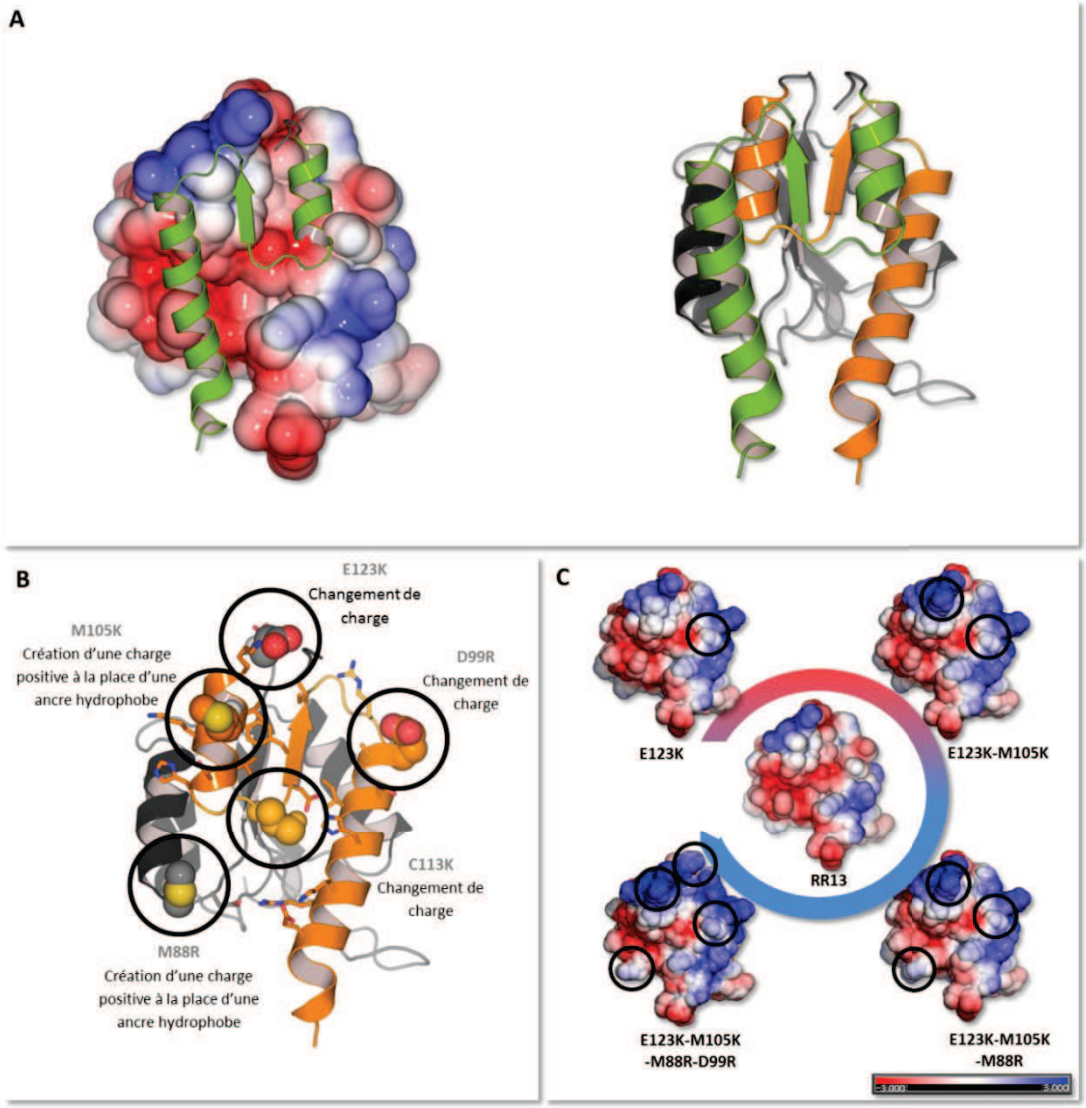


FIGURE 39 – Basculement du RR13 d'un état dimérique vers un état monomérique : choix des mutations à réaliser

A-Vue d'ensemble de la répartition des charges électrostatiques de la surface d'interaction potentielle α4-ß5-α5 du DDK d'un monomère représenté en orange, superposée à la structure 3D du domaine DDK de l'autre

monomère représenté en vert. Par convention, les charges basiques (positives) sont en bleu et les charges acides (négatives) sont en rouge. Les calculs de potentiels électrostatiques ont été réalisés avec le couple PDB2PQR/APBS (Baker *et al.,* 2001; Dolinsky *et al.,* 2007). Les résultats sont présentés comme un gradient à trois couleurs qui vont du bleu (+3 kT) en passant par le blanc (neutralité) au rouge (-3 kT).
B-Localisation sur la structure 3D du DDK des résidus impliqués dans la stabilité du dimère et sélectionnés pour réaliser la mutagénèse dirigée. Les résidus sont présentés par une représentation atomique (orange ou gris : carbone, rouge : oxygène, bleu : azote, jaune : soufre).
C-Evolution de la répartition des charges électrostatiques de l'interface potentielle de dimérisation α4-ß5-α5 du DDK, par cumul de charges positives apportées par l'addition de mutants (calculées avec APBS et représentées de +3 kT à –3 kT).

III.2.b.2 *Confirmation de l'état dimérique du RR13 et validation des résidus impliqués dans cette interaction*

Au regard de la bibliographie (Hosoda *et al.,* 2002) et du modèle sur le mode potentiel d'interaction, le DDK serait le domaine impliqué dans la dimérisation de la protéine entière, contrairement au domaine GARP (Hosoda *et al.,* 2002). Afin de tester la pertinence biologique du modèle de dimérisation par le DDK, des expériences d'interaction *via* le système double-hydride et le BiFC *in planta* ont été réalisées.

In vivo chez la levure par utilisation du système double-hybride

L'utilisation de notre système double-hybride afin de montrer cette interaction, est rendue possible par le fait qu'on utilise uniquement le domaine DDK du RR13, ce qui nous permet de contourner la nature auto-activatrice du RR. L'interaction a donc été testée, par co-transformation de levure exprimant le DDK fusionné au domaine d'activation de la transcription Gal4 et le DDK fusionné au domaine de fixation à l'ADN LexA. Comme montré sur la FIGURE 40 (B-C), le domaine DDK du RR13 a la faculté de dimériser dans un système hétérologue.

Dans un premier temps, nous avons testé l'impact de deux mutations ponctuelles présentées précédemment et choisies sur critères physico-chimique et structural, les mutations E123K et M105K, suspectées être suffisantes pour décrocher l'interaction DDK/DDK. Nous avons utilisé les mêmes types de constructions que pour le DDK non muté, en fusionnant les DDK mutés aux deux mêmes domaines Gal4 et LexA. Nous pouvons observer que les simples mutations E123K et M105K sont suffisantes pour empêcher l'interaction (FIGURE 40, B-C). Nous avons cependant généré le double mutant (E123K-M105K), qui comme attendu n'interagit pas non plus avec son homologue.

L'absence d'interaction nous a amené à nous demander : i) si les protéines étaient correctement produites, ii) si ces protéines se repliaient correctement point essentiel pour interagir avec d'autres protéines et exercer leur fonction. Pour répondre au premier point, la détection des protéines produites au moyen de la technique du western-blot a été réalisée à partir des clones de levures utilisés pour les tests double-hybride. Des anticorps spécifiques aux domaines LexA et Gal4 ont permis de confirmer la présence des protéines DDK non mutées et mutées (FIGURE 40, D). Le deuxième point sera confirmé par une méthode biophysique qui est l'utilisation du dichroïsme circulaire présenté ultérieurement.

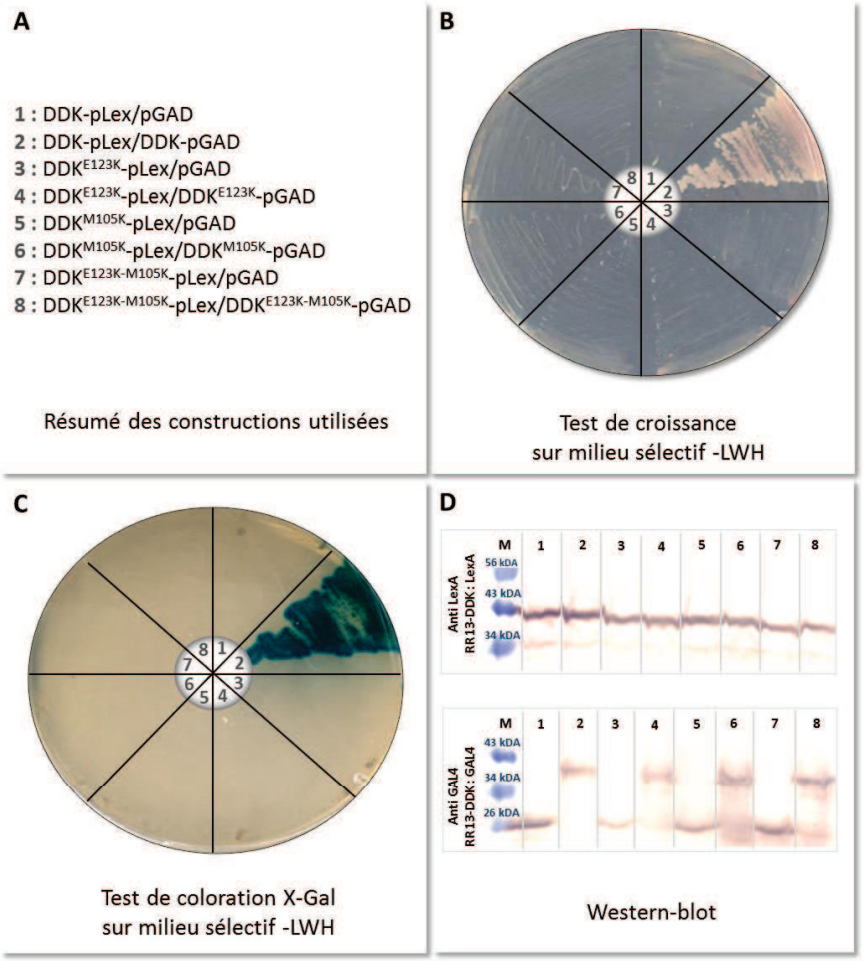


FIGURE 40 – **Validation de la dimérisation du RR13 par son DDK et du choix des positions clés de son état monomérique en levure**

Les tests double-hybride ont été conduits avec des levures co-exprimant le DDK non muté ou muté (E123K et M105K) fusionnés au domaine de fixation à l'ADN LexA (DDK-pLex) et fusionnés au domaine d'activation de la transcription Gal4 (DDK-pGAD) comme décrit (A). Les levures co-transformées ont été sélectionnées sur un milieu -LW, et étalées sur un milieu sélectif –LWH. Les interactions ont été testées par : croissance pendant 4 jours à 30°C sur ce milieu sélectif (B) et par coloration par ajout de X-Gal pendant 3 heures à 30°C (C). La présence des protéines de fusion exprimées a été vérifiée par western-blot par des anticorps spécifiques aux domaines LexA et Gal4 (D).

In planta par utilisation de la technique du BiFC

Afin de valider ce résultat de l'interaction du DDK sur lui-même, observée chez la levure, et montrer que la protéine complète RR13 est capable de former un dimère *in planta*, des tests d'interaction par expériences BiFC ont été réalisés. De plus, la vérification de l'absence d'interaction entre deux mutants RR13-EM (E123K-M105K) a également été menée au moyen de cette technique. Les séquences codantes du RR13 sauvage et du RR13 mutant (protéines entières) ont été fusionnées chacune aux parties N-terminale (YFP^N) ou C-terminale (YFP^C) de la protéine fluorescente YFP. La co-expression de la combinaison YFP^N-RR13/ YFP^C-RR13 mène à la formation d'un complexe BiFC dans les cellules de plante (FIGURE 41, A-B et I-L). Ce signal se superpose parfaitement à celui du marqueur nucléaire CFP (FIGURE 41, I-L), indiquant une localisation nucléaire de cette interaction. Au contraire, aucun signal de fluorescence n'est détecté dans le cas du test d'interaction du mutant RR13-EM par utilisation de constructions similaires (FIGURE 41, G-H).

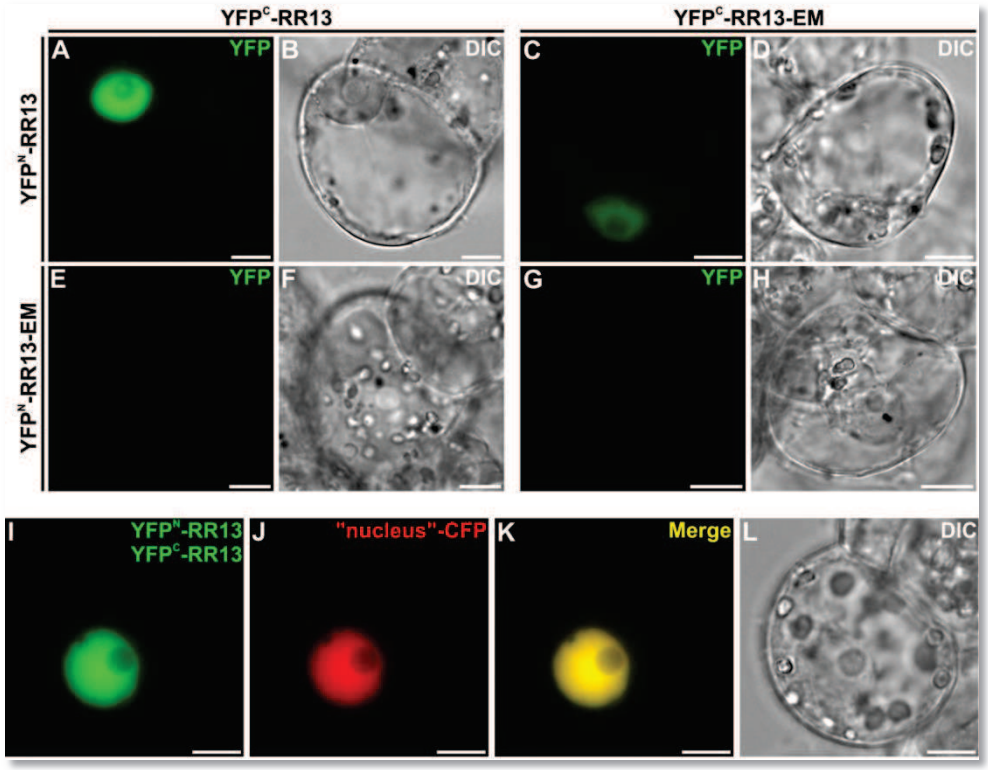


FIGURE 41 – **Validation de la dimérisation du RR13 *in planta*, et du mutant E123K-M105K**

Les cellules de *C. roseus* ont été transformées par une combinaison de plasmides exprimant RR13/RR13 (A-B et I-L), RR13/RR13-EM (mutant DDK E123K-M105K) (C-D et E-F), RR13-EM/RR13-EM fusionnées chacune aux parties N-terminale (YFP^N) ou C-terminale (YFP^C) de la YFP comme indiqué. Les encarts A, C, E, G, I et B, D, F, H, L montrent un signal de fluorescence et la morphologie de la cellule par microscopie de contraste inter-différentiel (DIC) respectivement. Afin de localiser au sein de la cellule l'interaction RR13/RR13, une co-transformation supplémentaire a été réalisée avec le marqueur nucléaire CFP (J) et la co-localisation des deux signaux de fluorescence est montrée dans l'encart K. La barre d'échelle représente 10 µm.

Subtilement, les deux combinaisons YFP^N-RR13-EM/ YFP^C-RR13 (FIGURE 41, E-F) et YFP^N-RR13/ YFP^C-RR13-EM (FIGURE 41, C-D) n'aboutissent pas aux mêmes résultats, l'une montre une reconstitution de la YFP (C-D) et l'autre pas (E-F). Ceci suggère dans un premier temps que la répulsion des charges n'est pas suffisante entre un monomère DDK non muté et l'autre monomère muté, et qu'ils sont toujours capables d'interagir entre eux, mais que l'affinité a tout de même été impactée. Dans un deuxième temps, la différence de résultat observée au niveau des constructions croisées (C-D et E-F) peut provenir d'un effet lié à la construction elle-même. Il semble que dans le cas où l'hémidomaine YFP (amino-terminal) est fusionné au RR13-EM, la reconstitution du complexe BiFC, observée dans l'autre configuration, ne soit plus possible. On peut supposer que cette nature de protéine de fusion (les deux constructions n'étant pas équivalentes) est déstabilisée perturbant possiblement son repliement et son association avec la protéine YFP^C-RR13 sauvage. Ceci suggère que l'absence de signal observée dans le test d'interaction entre les deux protéines mutantes pourrait également provenir d'une reformation difficile de la YFP. Cependant, les résultats obtenus dans le système double-hybride conforte cette absence d'interaction par baisse d'affinité.

III.3 La fonction de facteur de transcription du RR13 serait régulée par interaction du domaine GARP sur le domaine DDK

III.3.a *Analyses bio-informatiques et modèle d'interaction du domaine GARP sur le domaine DDK*

III.3.a.1 *Modélisation de la structure du domaine GARP*

Afin d'avoir un aperçu à l'échelle atomique de la relation entre le domaine DDK et le domaine de liaison à l'ADN, le domaine GARP, nous avons décidé de construire également un modèle moléculaire par "enfilage" (ou "threading", sur la base d'un alignement "pairwises"). La structure de ce domaine de liaison à l'ADN, résolue en solution par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est connue depuis 2002 (Hosoda *et al.*, 2002) et ses coordonnées atomiques sont disponibles dans la banque de données PDB (Code PDB : 1IRZ).

La modélisation a donc été effectuée à partir d'un alignement deux à deux (64% d'identité de séquence et 92% de similitude) avec une certaine confiance à l'aide du logiciel MODELLER (Fiser *et al.*, 2000) et a été validée avec le logiciel PROSA (ANNEXE 7) (Wiederstein & Sippl, 2007) (ENCADRÉ 2). Que ce soit sur la structure déterminée de l'ARR10 ou le modèle établi pour le RR13, un calcul du potentiel électrostatique de surface avec le couple PDB2PQR/APBS (Baker *et al.*, 2001; Dolinsky *et al.*, 2007) a permis de montrer qu'une des caractéristiques notables de ces domaines est la

prédominance d'un caractère basique, c'est-à-dire un excès de charges positives, attendu pour un domaine de fixation à l'ADN (DBD) (FIGURE 42, A). Ainsi, on suppose que cette caractéristique va entrer en ligne de compte pour toute interaction réalisée par ce domaine. En effet, d'une part, l'excès de charges de même nature n'est pas propice à une stabilité pour ce genre de protéine, et d'autre part, son existence sous une forme isolée est peu probable (d'ailleurs elle s'agrège non spécifiquement avec des acides nucléiques lors de purifications, MATÉRIELS ET MÉTHODES II.10). Par conséquent, la nécessité d'éteindre l'excès de charges passe forcément par une interaction avec une contrepartie qui possèderait des charges complémentaires à savoir négatives.

III.3.a.2 *Modélisation de la structure du complexe GARP/DDK*

D'autre part, l'examen du potentiel électrostatique de surface du domaine DDK permet de remarquer grossièrement l'existence de deux surfaces suffisamment étendues pouvant servir à éteindre, au moins en partie, l'excès de charges positives du domaine GARP quand il n'est pas fixé à son élément de réponse. La première surface est au sommet du feuillet parallèle et la deuxième à sa base (FIGURE 42, B). Cependant, le sommet du feuillet central forme le site d'interaction avec les HPt, et si l'on applique un principe d'exclusion selon lequel deux objets ne peuvent être au même endroit au même moment, cela tend à proposer le deuxième comme seul site possible pour une interaction stable GARP/DDK, si toutefois elle doit avoir lieu.

Pour explorer cette hypothèse et en apprécier la plausibilité, nous avons commencé par simuler l'interaction *in silico* des deux domaines, en donnant comme contraintes ambiguës au logiciel HADDOCK (Karaca *et al.*, 2010) (ENCADRÉ 3), les résidus à la base du DDK et les résidus impliqués dans la liaison du DBD avec son élément de réponse (FIGURE 42, C, ANNEXE 11). L'hypothèse supposée réside dans le fait que la régulation puisse s'effectuée, du moins en partie, par une compétition entre sites (DDK contre ADN) pour le recrutement et la stabilisation du GARP. Des structures cristallographiques de domaines receveurs sous la forme de complexe avec le DBD existent dans la base de données PDB et rendent intéressante cette hypothèse selon laquelle il pourrait y avoir une régulation de la fixation à l'ADN par ce même domaine receveur. La structure récente de spr1814 de la famille des RR bactériens NarL/FixJ (code PDB : 4HYE) montre une forme dimérique "tête-bêche" *a priori* dans sa forme inactive et dans laquelle prend place une sixième hélice formée à partir de l'élément charnière (Park *et al.*, 2013). Il existe dans ce cas deux formes d'interactions avec le domaine effecteur, la première par contact étendu sur le haut de l'hélice 4 (non loin du site de fixation de l'HK) et l'autre en cours de déploiement. Il est intéressant de noter deux choses, la première étant que les contacts sont de nature électrostatique entre le domaine

receveur et le domaine effecteur, et la deuxième que le mécanisme implique un changement conformationnel de grande amplitude à la suite du transfert d'un phosphate issu d'une interaction avec une HK. Une fois déployée, la protéine pourrait alors jouer son rôle de FT.

Le résultat obtenu pour l'interaction DDK/GARP du RR13 soumis à PISA permet d'évaluer l'interaction (ANNEXE 12). La surface enfouie dans l'interface fait 1011,9 $Å^2$ et implique 11 ponts hydrogène et 13 ponts salins. Contrairement au dimère constitutif, l'énergie de dissociation trouvée ΔG_{diss} est négative (-4,0), ce qui va dans le sens d'un système dynamique cohérent à notre hypothèse de déploiement.

III.3.a.3 *Modélisation de la structure de l'interaction du domaine GARP avec l'ADN*

Par ailleurs, pour explorer le mode d'interaction ADN/GARP *in silico*, l'aptitude de HADDOCK (ENCADRÉ 3) à modéliser finement des interactions protéine/ADN a été exploitée pour proposer le complexe d'interaction GARP et la séquence de reconnaissance des RR-B, 5' AGATT 3'. Cette boite a été modélisée automatiquement avec le module d'HADDOCK 3D-DART (Dijk *et al.*, 2006) avec en sens 12 bases (GCA**AGATT**CGGC). Nous avons exploité les résultats de cartographie RMN obtenus Hosoda et collaborateurs (2002) sur l'ARR10 pour la construction du modèle (FIGURE 42, B image du haut). L'hélice basique est prise dans le grand sillon et forme des contacts étendus sur toute sa longueur avec l'ADN. Quelques contacts sont observés pour l'hélice 1 et notamment l'engagement du tryptophane du motif MYB en liaison hydrogène avec le phosphate d'une adénosine au centre du motif du brin complémentaire.

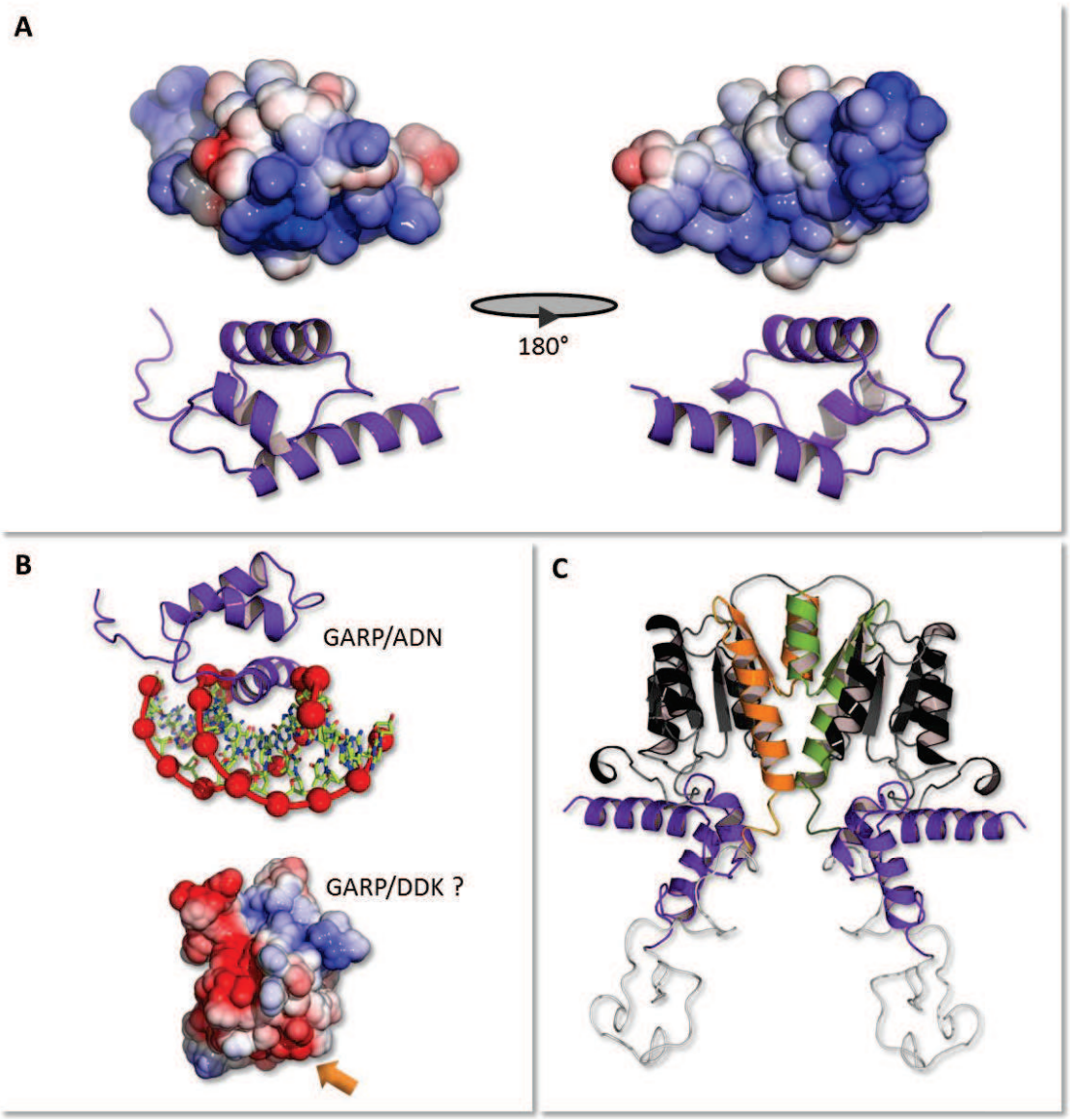


FIGURE 42 – **Modèle d'interaction des domaines GARP/DDK**

A-Représentation en vue latérale du modèle du domaine GARP du RR13, représenté en rubans (violet), puis tourné à 180° vers la droite, et de la répartition des charges électrostatiques. Comme vu précédemment, les charges basiques (positives) sont en bleu et les charges acides (négatives) sont en rouge. Les calculs de potentiels électrostatiques ont été réalisés avec le couple PDB2PQR /APBS (Baker *et al.*, 2001; Dolinsky *et al.*, 2007). Les résultats sont représentés comme un gradient à trois couleurs qui vont du bleu (+3 kT) en passant par le blanc (neutralité) au rouge (-3 kT).

B-Représentation de l'interaction du domaine GARP avec l'ADN (chargé négativement). La répartition des charges du domaine DDK est également montrée, offrant une surface possible d'interaction (chargé négativement) pour le domaine GARP, montrée par une flèche de couleur orange.

C-Représentation en ruban du modèle 3D d'une interaction potentielle entre le domaine GARP (violet) et le DDK (interface concernée représentée en noire).

III.3.b *Choix des mutations afin d'obtenir une conformation ouverte constitutive du RR13*

III.3.b.1 *Stratégie de détermination des acides aminés à muter*

Comme précédemment, la stratégie est de modifier la répartition des charges électrostatiques de surface à l'interface potentielle d'interaction GARP/DDK (FIGURE 40, A-B) et notamment créer une répulsion entre les deux sous-unités par l'augmentation du caractère basique de cette interface au niveau du DDK. La perte de l'interaction spécifique entre celles-ci doit permettre de pouvoir : i) confirmer la participation de cette interface dans cette interaction, ii) valider cette interaction et proposer un mode de régulation du fonctionnement du RR-B.

L'examen de la surface accessible de l'interface non engagée dans une interaction, que ce soit dans le dimère DDK/DDK ou dans le complexe DDK/HPt, laisse apparaitre plusieurs positions d'acides aminés qui participent à la charge négative globale de cette zone. Parmi ces résidus, le très conservé aspartate 64, localisé au début du brin 3 (FIGURE 43, A, B), apparait sur le modèle du dimère comme un point pivot du positionnement de l'hélice carboxy-terminale que nous soupçonnons à la base d'un mécanisme régulateur. En effet, ce résidu 64 retient cette hélice avec le concours de l'aspartate 89 par des interactions ioniques avec l'arginine 136, elle-même très conservée (FIGURE 43, B). Même si l'aspartate 64 intervient dans la formation du complexe modélisé, il le fait en se partageant entre son interaction avec l'arginine 136 en fin de domaine DDK et celle qui le lie plus ou moins de la même manière avec l'arginine 239 du domaine GARP, il ne peut être choisi.

Par conséquent, si l'on exclut ces deux positions de la liste de candidats immédiats à tester, il existe une position nullement engagée dans un interaction directe par sa chaine latérale pour stabiliser l'édifice structural et trouvée dans le modèle du complexe en interaction ionique avec l'arginine 250 du domaine GARP, il s'agit du glutamate 58 à la base de l'hélice 2 (FIGURE 43, A, B, C).

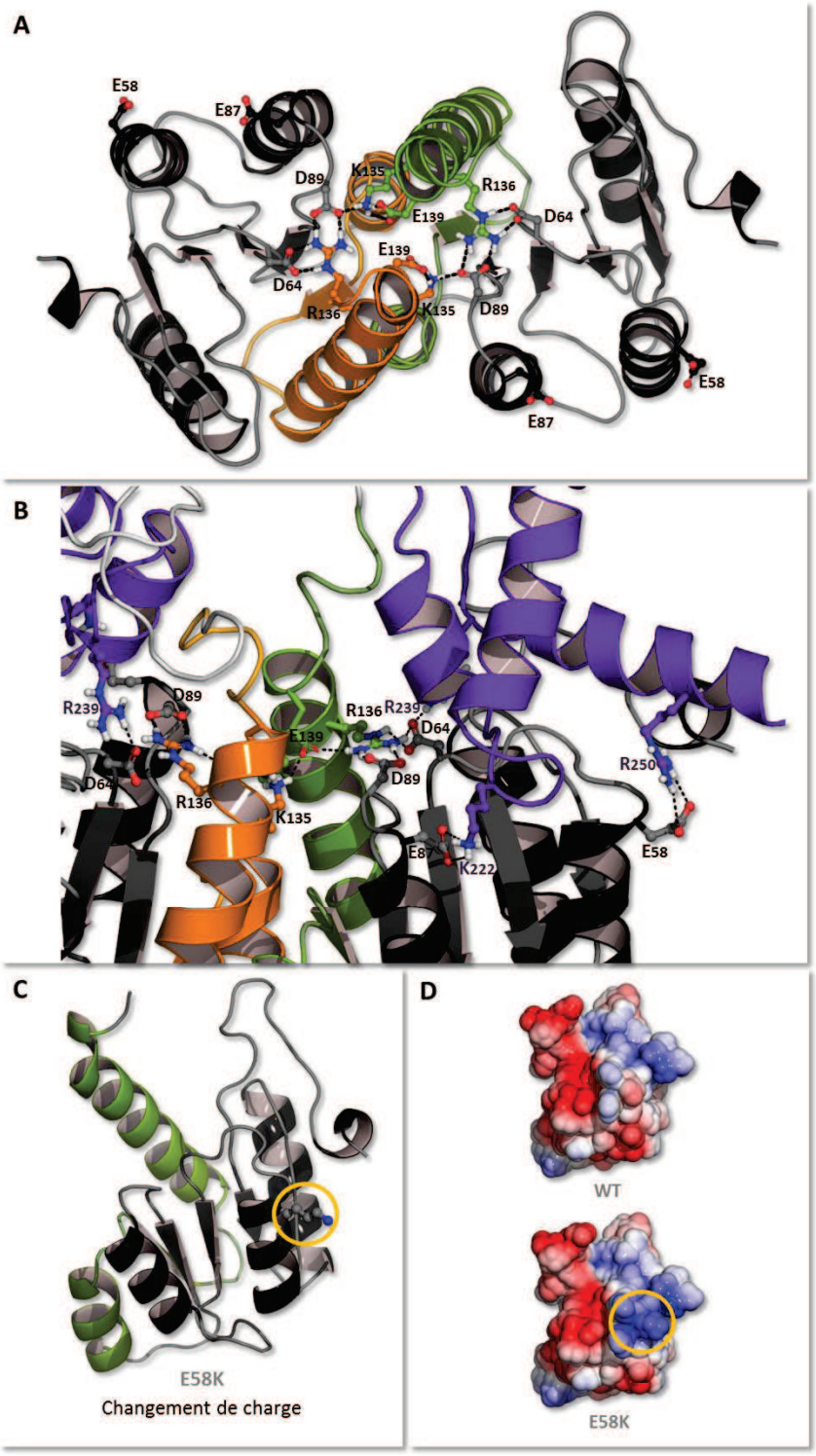


FIGURE 43 – Basculement du RR13 en conformation ouverte : choix des mutations à réaliser

Les images qui représentent schématiquement la structure 3D en rubans ont été générées avec PyMOL (DeLano & Bromberg, 2004).

A–Représentation schématique en rubans de la structure 3D du dimère α4-ß5-α5 en sortie du calcul HADDOCK. Cette vue du dessus montre les réseaux de ponts salins établis (pointillés) entre résidus, représentés en "boules et bâtons". Les résidus acides (E58, D64, E87 et D89) potentiellement considérés dans le choix de mutations à effectuer pour tester l'interaction GARP/DDK sont montrés soit en interaction (pointillés) avec des éléments clés pour la stabilité du dimère, soit libres lorsque l'incidence pour la stabilité du dimère est jugée

nulle.
B-Zoom sur les réseaux de ponts salins (pointillés) potentiellement impliqués dans la stabilisation de l'interaction GARP/DDK au sein du dimère.
C-Localisation sur le modèle de la structure 3D du domaine DDK d'un des résidus potentiellement impliqué dans l'interaction GARP/DDK. Cet acide aminé a été choisi et son implication testée par mutagénèse dirigée. L'interface α4-ß5-α5 impliquée dans l'interaction DDK/DDK est représentée en vert. Le résidu est présenté par une représentation atomique (gris : carbone, bleu : azote).
D-Evolution de la répartition des charges électrostatiques de l'interface potentielle d'interaction du DDK et du GARP, par cumul de charges positives apportées par la mutation ponctuelle du mutant E58K. Les calculs de potentiels électrostatiques ont été réalisés avec le couple PDB2PQR /APBS (Baker *et al.*, 2001; Dolinsky *et al.*, 2007). Les résultats sont représentés comme un gradient à trois couleurs qui vont du bleu (+3 kT) en passant par le blanc (neutralité) au rouge (-3 kT).

Afin de valider cette hypothèse, nous avons entrepris de modifier le résidu à cette position par mutagénèse dirigée. L'idée consiste à créer une répulsion entre les deux unités fonctionnelles, *a priori* initialement en attraction. Le résidu de remplacement est une lysine (mutation E58K) permettant d'impacter la répartition des charges de surface *via* augmentation des charges positives. La mutation a d'abord été faite *in silico* (mutation dans PyMOL suivie d'une minimisation avec GROMACS, Hess *et al.*, 2008), sur le modèle du domaine receveur et les potentiels électrostatiques de surface ont été comparés (FIGURE 43, D). Le renforcement du pôle basique (ou positif) généré doit permettre au minimum une baisse de l'affinité (voire une abolition de l'interaction) entre les deux partenaires putatifs. Sur la base de cette approche, la mutagenèse a été entreprise à partir du domaine DDK sauvage en prévision de tests d'interaction *in vitro*.

III.3.b.2 *Confirmation de l'interaction DDK/GARP du RR13 et validation du résidu impliqué dans cette interaction*

Afin de tester si le domaine GARP est capable d'interagir avec le domaine DDK, conformément à nos prévisions, des tests d'interaction *in vitro via* l'utilisation du "GST ou 6xHIS pull-down" ont été réalisés en utilisant le domaine DDK étiqueté en partie N-terminale par une suite de six résidus histidine (6xHIS) et le domaine GARP fusionné en partie N-terminale avec une protéine glutathion S-transférase (GST). De plus, l'impact des mutations portées par les deux mutants du domaine DDK ($DDK^{E123K-M105K}$ et DDK^{E58K}) sur cette interaction a également été testé.

Production et purification des protéines recombinantes

La production de ces protéines recombinantes 6xHIS-DDK et GST-GARP a été effectuée dans un système bactérien en clonant les séquences ADNc de 80 et 115 acides aminés respectivement dans les vecteurs pET15b et pGEX-5X-1. Dans un premier temps, les productions des protéines recombinantes sous induction de l'IPTG ont été vérifiées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (FIGURE 44 & 45, A), montrant effectivement une production satisfaisante des protéines recombinantes au bout de trois heures d'induction. Après lyse bactérienne, les protéines ont été purifiées par chromatographie d'affinité, et ont été récupérées par élution avec de l'imidazole (400 mM) ou du glutathion (150 mM) (FIGURE 44 & 45, B, C). Les échantillons récupérés en fin de purification (FIGURE 44, B piste 12 & FIGURE 45, B piste 9) ont été dosés et ont été utilisés directement pour les expériences suivantes. Concernant les protéines des deux mutants du domaine DDK (DDK$^{E123K-M105K}$ et DDK^{E58K}), leurs productions et purifications ont été réalisées dans les mêmes conditions que la protéine DDK non mutée.

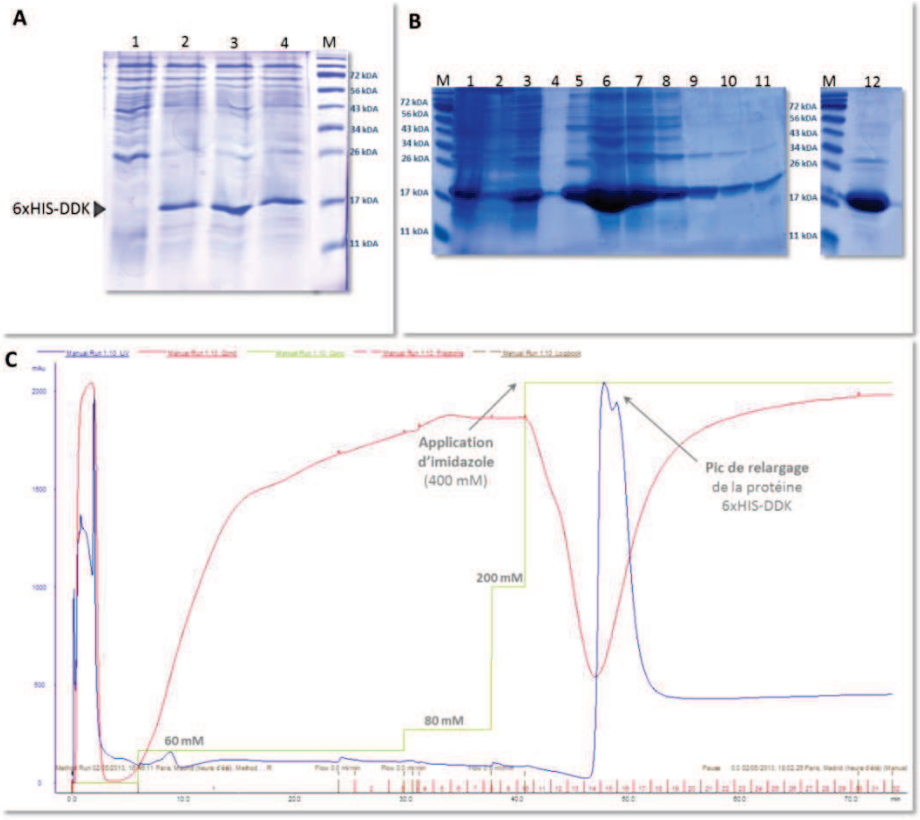


FIGURE 44 – **Analyses de la production et de la purification de la protéine recombinante 6xHIS-DDK**

A-Surexpression analysée par SDS PAGE au moment de l'induction (1) et trois heures après l'induction (2, 3 et 4) à l'IPTG (0,5 mM) de la protéine de fusion 6xHIS-DDK. Vingt microlitres de culture (milieu 2YT) de bactéries transformées par la construction DDK-pET15b ont été directement déposés avec 6 µl de tampon de charge. M : Marqueur de taille.

B-Gels SDS-PAGE contrôles des échantillons obtenus lors des différentes étapes de purification. La culture

bactérienne après induction à l'IPTG a été analysée (1), ainsi que le culot bactérien (2) et le surnageant (3) après centrifugation de la lyse bactérienne. Une fois, le surnageant passé dans la colonne, le ft ou "flow through" (4) a également été analysé. Les pistes 5 à 11 correspondent aux fractions successives récupérées lors de l'élution à 400 mM d'imidazole. Enfin, les fractions correspondant aux pistes 9, 10, 11 ont été concentrées sur concentrateur et dialysées par des cycles de concentration/dilution (12).

C-Chromatogramme suivant l'évolution de la purification. Les courbes bleues, rouges et vertes représentent respectivement les suivis d'absorbance à 280 nm, la conductivité et la concentration de l'imidazole.

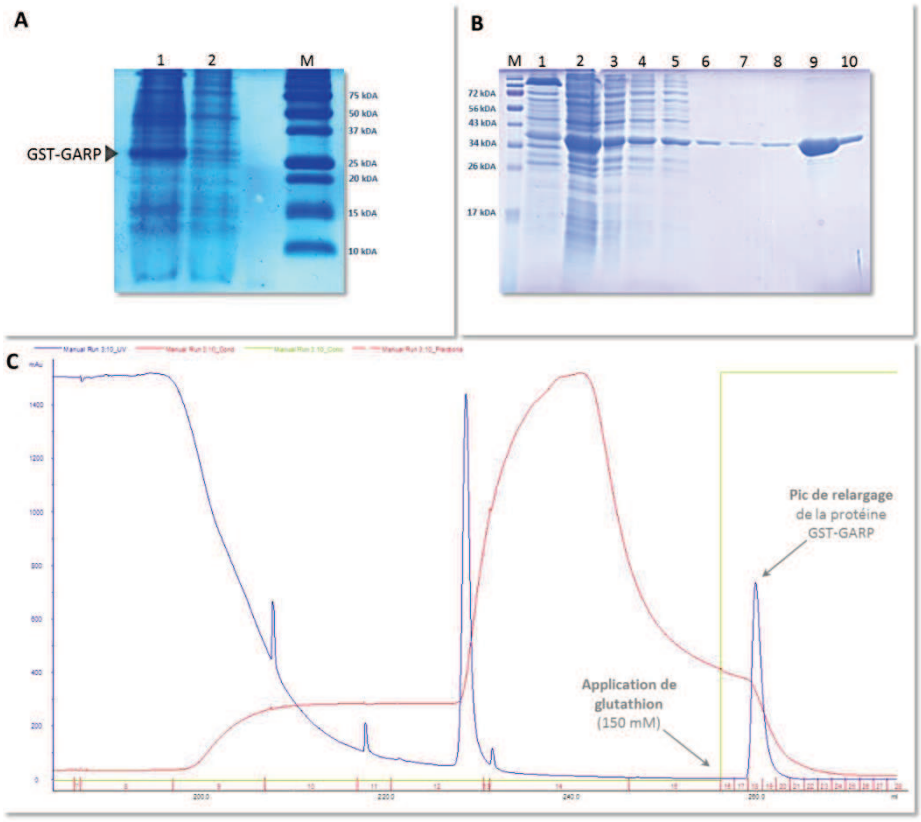


FIGURE 45 – **Analyses de la production et de la purification de la protéine recombinante GST-GARP**

A-Surexpression analysée par SDS PAGE au moment de l'induction (2) et trois heures après l'induction (1) à l'IPTG (0,5 mM) de la protéine de fusion GST-GARP. Vingt microlitres de culture de colonies de bactéries transformées par la construction GARP-pGEX-5X-1 ont été directement déposés avec 6 µl de tampon de charge. M : Marqueur de taille.

B-Gel SDS-PAGE contrôle des échantillons obtenus lors des différentes étapes de purification. Le culot bactérien issu de la centrifugation après lyse bactérienne a été analysé (1), ainsi que le surnageant (2). Ce dernier a ensuite été passé plusieurs fois dans la colonne, et deux aliquotes de ft ou "flow through" (3 et 4) et un lavage de la colonne (5) ont également été analysés. Les pistes 6 à 10 correspondent aux fractions successives récupérées lors de l'élution à 150 mM de glutathion.

C-Chromatogramme suivant l'évolution de la purification. Les courbes bleues, rouges et vertes représentent respectivement les suivis d'absorbance à 280 nm, la conductivité et la concentration de glutathion.

Interaction DDK/GARP, DDK$^{E123K-M105K}$/GARP et DDK^{E58K}/GARP testées *in vitro*

Deux séries d'expériences ont été réalisées.

Une première approche a permis de tester l'interaction du domaine DDK sauvage avec le DBD, GARP. Elle a consisté en deux expériences à savoir deux co-précipitations connues sous le nom de "GST et 6xHIS pull-down" (FIGURE 46). Une série de contrôles a été réalisée et analysée sur SDS-PAGE avec les phases Glutathion-Sépharose (GS) et Ni-NTA (chélaté par de l'acide nitrilo-triacétique) chargées avec soit la protéine GST-GARP soit la protéine 6xHIS-DDK après lavages. On s'aperçoit que la phase GS et Ni-NTA retiennent plus ou moins les protéines 6xHIS-DDK et GST-GARP respectivement (piste 1 et 3), suggérant que ces contrôles négatifs reflètent un léger biais du système, probablement dû à des lavages insuffisants. Après addition de la protéine 6xHIS-DDK sur la phase GS au préalable chargée de GST-GARP, on remarque que la phase retient les deux protéines (piste 7) et la même situation est observée pour la phase Ni-NTA (piste 8). Une fois, l'élution respective des deux phases réalisées, les deux protéines sont retrouvées sur gel, témoignant ainsi de leur interaction (piste 9 et 10).

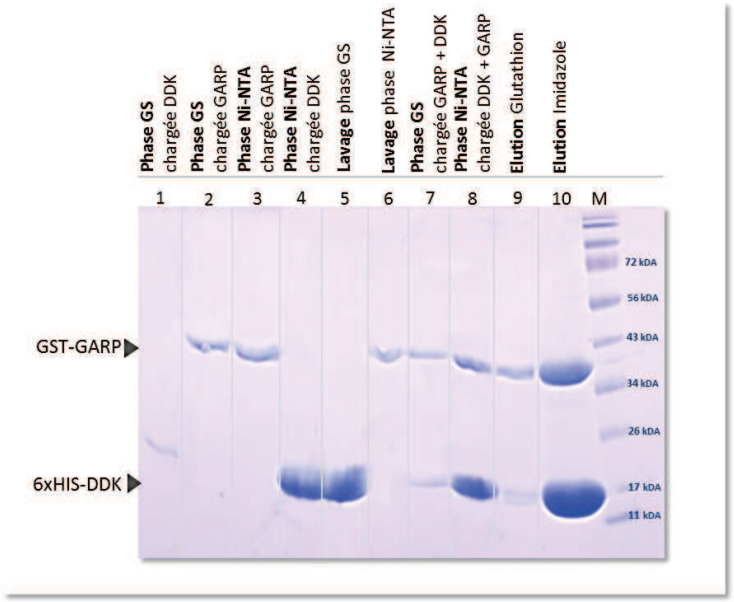


FIGURE 46 – Capacité du domaine GARP à interagir avec le domaine DDK *in vitro*

Tests d'interaction par "GST et 6xHIS pull-down" de la protéine GST-GARP avec la protéine 6xHIS-DDK non mutée. Des aliquotes correspondantes aux différentes étapes ont été testées sur gel :

1. les phases Glutathion-Sépharose (GS) et Ni-NTA chargées avec les protéines 6xHIS-DDK (GS : 1, Ni-NTA : 4) et GST-GARP (GS : 2, Ni-NTA : 3)

2. les lavages des phases après avoir été chargées des protéines GST-GARP pour la phase GS (5) et 6xHIS-DDK pour la phase Ni-NTA (6)

3. les phases, une fois chargées avec les deuxièmes protéines d'intérêt (7 : phase GS chargée GST-GARP + 6xHIS-DDK, 8 : phase Ni-NTA chargée 6xHIS-DDK + GST-GARP)

4. les fractions d'élution concernant la phase GS (9, élution au glutathion 20 mM) et la phase Ni-NTA (10, élution à l'imidazole 400 mM).

Nous pouvons ainsi en conclure que les deux domaines GARP et DDK sont capables d'interagir ensemble *in vitro*.

Une deuxième approche a permis de tester *in vitro* la capacité des deux mutants DDK à maintenir l'interaction GARP/DDK également par co-précipitation mais cette fois uniquement par "GST pull-down" (FIGURE 47).

Le mutant DDK^{E58K} a été, rappelons-le, généré afin de permettre un décrochement de l'interaction des domaines GARP/DDK visualisée en FIGURE 47. La validation de ce mutant passe par le test de son interaction avec le domaine GARP. On remarque que lorsqu'on rajoute cette protéine 6xHIS-DDK^{E58K} sur la phase GS préalablement chargée par GST-GARP "input", le flux sortant de la colonne ("flow through") (4) contient cette protéine. Deux possibilités sont alors envisageables, la première est que cette protéine a été ajoutée en excès, et la deuxième est qu'elle a perdu de l'affinité pour son partenaire GARP.

Il faut noter que la réponse nous vient en partie de l'analyse sur gel de cette phase chargée (5) qui nous montre que même s'il semble qu'une partie minime ait été retenue sur la phase chargée avec le partenaire GST-GARP, lors de l'élution (7) et après lavage, seule la protéine GST-GARP est retrouvée sur gel. Ce qui témoigne d'une perte d'affinité entre les deux interacteurs, les protéines 6xHIS-DDK^{E58K} et GST-GARP. La mutation est donc validée compte tenu du fait que l'interaction des domaines GARP/DDK n'est plus retrouvée.

Le test d'interaction du mutant DDK$^{E123K-M105K}$ avec le domaine GARP a été mené à bien afin de vérifier si la modification de l'interface impliquée dans la dimérisation α4-ß5-α5 n'entraine pas une perte d'interaction des domaines GARP/DDK. Premièrement, nous remarquons que le flux passant de la protéine 6xHIS-DDK$^{E123K-M105K}$ "input" (ft, 9) ne contient pas cette protéine en sortie, suggérant la rétention de la totalité des protéines chargées (13) sur le domaine GARP. De plus, la phase GS préalablement chargée avec la protéine GST-GARP, et additionnée de cette protéine montre lors de son dépôt sur gel, la présence des deux protéines (10). L'élution corrobore ce résultat et indique que les deux protéines sont capables d'interagir entre elles (12).

Ainsi, les mutations E123K et M105K réalisées au niveau de l'interface de dimérisation ne perturbent en rien l'interaction GARP/DDK, nous permettant de s'assurer que l'existence d'un dimère DDK/DDK n'interfère pas directement avec l'aptitude du domaine receveur à interagir avec le DBD.

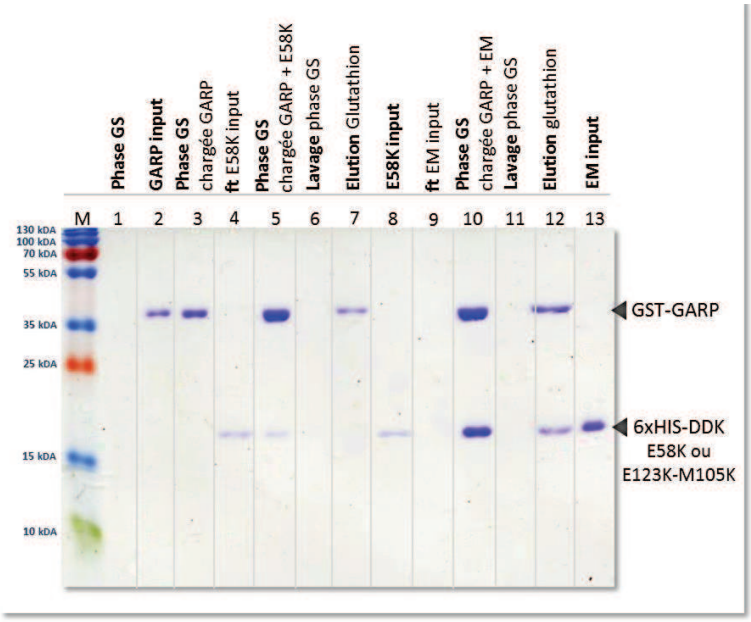


FIGURE 47 – Capacité du domaine GARP à interagir avec le domaine DDK mutant *in vitro*

Tests d'interaction par "GST pull-down" de la protéine GST-GARP avec les protéines mutées 6xHIS-DDK$^{E123K-M105K}$ et DDK^{E58K}. Des aliquotes correspondantes aux différentes étapes ont été testées sur gel :

1. la phase Glutathion-Sépharose (GS) seule (1)

2. Les protéines GST-GARP "input" (2), 6xHIS-DDK^{E58K} "input" (8) et 6xHIS-DDK$^{E123K-M105K}$ "input" (13), c'est-à-dire les échantillons de protéines utilisées pour cette analyse (sans passage sur colonne)

3. Les "flow through" (ft) des protéines 6xHIS-DDK^{E58K} "input" (4) et 6xHIS-DDK$^{E123K-M105K}$ "input" (9) qui correspondent au flux sortant des protéines chargées sur colonne

4. La phase GS chargée avec GST-GARP "input" supplémentée de la deuxième protéine d'intérêt 6xHIS-DDK^{E58K} "input" (5) ou 6xHIS-DDK$^{E123K-M105K}$ "input" (10).

5. Les lavages de la phase (6 : test GARP/E58K, 11 : test GARP : EM)

6. Les fractions d'élution avec glutathion 80 mM (7 : test GARP/E58K, 12 : test GARP : EM).

III.3.c *Maintien du repliement des protéines mutantes*

Afin de vérifier que les protéines mutées au niveau du domaine DDK produites et testées présentent une proportion de structures secondaires similaire au DDK sauvage, nous avons utilisé la technique du dichroïsme circulaire (CD) (ENCADRE 4).

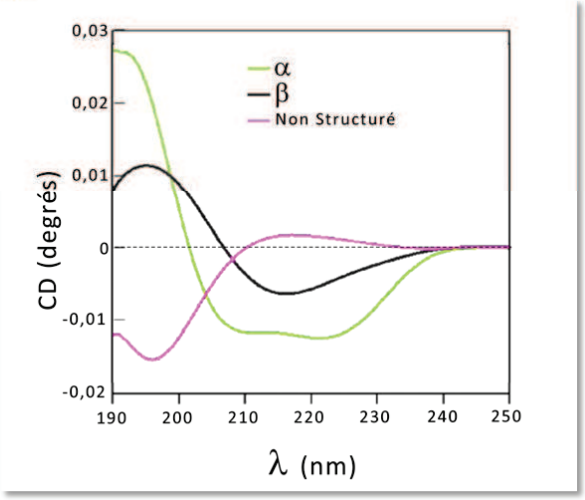
ENCADRÉ 4 – **Principe de la méthode du dichroïsme circulaire**

Petit rappel sur l'utilisation de cette méthode optique pour la détermination du degré de structuration secondaire dans une protéine.

Le dichroïsme circulaire dans l'UV lointain (CD) est une approche simple mais puissante pour évaluer la proportion de structures secondaires canoniques (hélice, brin, séquence non-structurée) d'une protéine. Elle repose sur le fait que le vivant a choisi des briques élémentaires chirales (ce sont les acides aminés de série L pour les protéines) et que ces molécules asymétriques sont susceptibles d'interagir avec la lumière. Elles peuvent en conséquence absorber inégalement la lumière circulairement polarisée et présentent des indices de réfraction différents pour les deux orientations (droite et gauche). La résultante est que le plan de l'onde lumineuse est dévié et, elliptiquement repolarisé par l'échantillon.

Ce degré d'ellipticité est fonction de la concentration de l'échantillon lui-même et, s'il s'agit d'une protéine, va pouvoir renseigner sur la composition en structures secondaires. En effet, il est établi que les trois types de structures (du fait de l'orientation de la liaison peptidique) *i.e.* hélices-α, brin-β et les portions non structurées ("coil") présentent des signatures spectrales caractéristiques discrètes en CD. En outre, il est admis le raccourci suivant : le spectre d'une protéine pure est pondéré par la proportion en ses différentes structures secondaires et il est possible de déconvoluer le signal par différentes méthodes pour prédire la proportion de chaque type de structure secondaire ayant contribué à ce signal moyen.

Cette méthode peut donc être communément utilisée pour vérifier qu'une protéine est structurée.



Signatures spectrales des trois types de structurations (α, β et coil) secondaires en dichroisme circulaire dans l'UV lointain

Pour cette approche, il est requis de disposer d'échantillons purs de protéines à tester dans un tampon aussi transparent que possible dans l'UV lointain. Il est rarement possible de faire l'expérience dans la condition idéale à savoir une condition dans laquelle la protéine est seule dans l'eau. En effet, l'eau pure est considérée comme la meilleure des solutions. Dans notre cas, les protéines relativement instables (ou réactives) par nature du fait de la présence de quatre cystéines en particulier (qui peuvent en inter-réagissant provoquer l'agrégation), n'autorisent pas d'envisager

une telle option. Nous avons donc opté pour un tampon phosphate à 20 mM pH 7,2 et 150 mM NaF connu pour être transparent à ces longueurs d'onde, et à la fois de dialyser le réducteur au dernier moment et travailler avec des concentrations moins élevées étant donné que la technique le permet. Malheureusement, cela ne s'est pas idéalement passé pour deux lots d'échantillons (qui ont précipité avec la dialyse du β-mercaptoéthanol, $DDK^{E123K-M105K}$ et DDK^{E58K}) le jour où nous avons eu accès au spectromètre CD au Centre de Biophysique Moléculaire dans l'unité du Professeur Petoud. Cependant, nous sommes parvenus à tester deux des versions du domaine DDK, c'est-à-dire le DDK sauvage et le DDK mutant E58K (dans un tampon moins adéquat au CD). Nos résultats obtenus suggèrent pour les deux versions de protéines un état structuré comme prédit lors des analyses bio-informatiques présentées en début de partie.

Nous ne manquerons pas de faire prochainement les spectres équivalents pour la version $DDK^{E123K-M105K}$ et également à nouveau ceux du DDK^{E58K}, afin d'obtenir des spectres plus complets c'est-à-dire des spectres continus et non bruités jusqu'à 190 nm pour la plupart (ou 185 nm pour quelques-unes). Ce qui nous permettra également de réaliser des prédictions par utilisation de méthodes empiriques basées sur des banques de données de spectres effectués sur des protéines de structures connues à haute résolution (Fasman, 1996).

Les spectres bruts sont présentés dans la FIGURE 48 (A et B). Sur ces spectres, nous pouvons voir la signature caractéristique d'une protéine structurée. Le spectre normalisé du domaine DDK est présenté en FIGURE 48 (C) et la prédiction effectuée avec CDSSTR (Sreerama & Woody, 2000) intégrée dans DichrOWeb (Whitmore & Wallace, 2004) est présentée en FIGURE 48 (D). Cette prédiction est très proche de ce qui est attendu pour le domaine receveur du FT RR13. Une analyse du modèle 3D dans le logiciel Yasara (Krieger *et al.*, 2002) permet de faire précisément l'inventaire structural secondaire. La structure modélisée comprend 48,6% d'hélice α, 15,3% de feuillet β, 33,4% de désordre (boucles et tours) et 2,8% hélice-3_{10} (premier ou dernier tour). Le logiciel CDSSTR donne des scores qui s'ajustent plutôt bien tant en termes de proportions qu'en termes de dimension (FIGURE 48, D).

Pour ce qui est du spectre de la version DDK^{E58K} réalisé dans des conditions moins idéales en termes de solvant, il apparaît néanmoins sur l'enregistrement que la protéine est structurée. La lecture a pu en effet se faire de manière correcte jusqu'à 200 nm avec une bande positive sur la gauche du spectre (dans le cas contraire nous aurions eu une bande négative, ENCADRÉ 4). Il est probable que l'ensemble des unités protéiques soit à la quasi-unanimité dans un état natif.

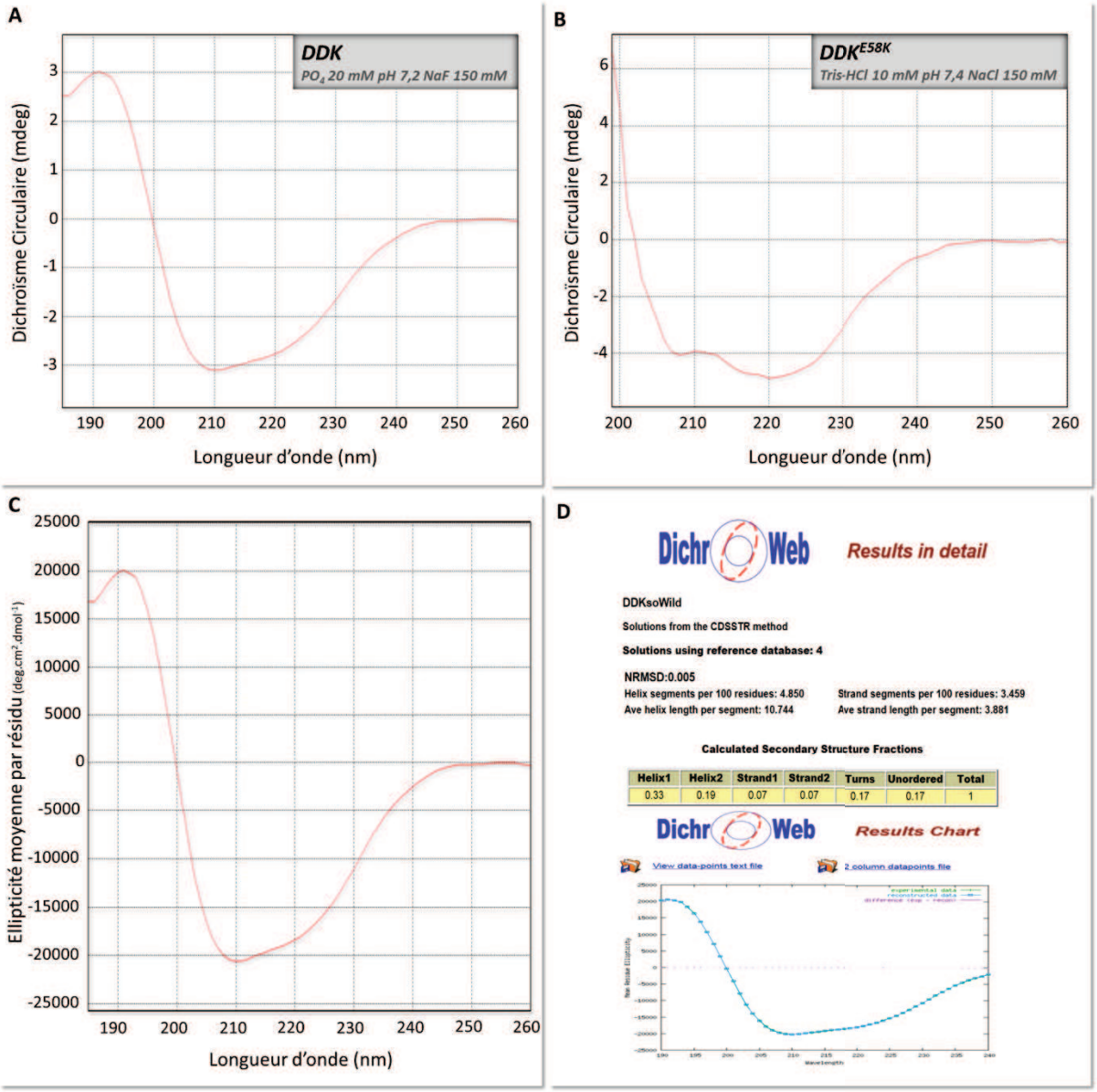


FIGURE 48 – **Dichroïsme circulaire dans l'UV lointain réalisé sur le domaine DDK du FT RR13**

A-Spectre CD en millidegrés de DDK sauvage après correction de ligne de base (soustraction du signal du tampon) entre 260 nm et 185 nm sur un échantillon concentré à 0,017 mg.mL^{-1}. L'allure générale et les bandes négatives à 222 nm et 209 nm, et la bande positive à 192 nm d'amplitude équivalente (aux négatives) sont à la faveur d'une protéine structurée en α et β.

B-Spectre CD en millidegrés du DDK^{E58K} sans correction de ligne de base, dans un tampon Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM. L'allure générale de ce spectre et notamment les bandes négatives à 222 nm et 209 nm indique que la protéine est structurée. La mesure étant fortement bruitée dès 200 nm du fait de l'absorbance du tampon utilisé, ne permet pas d'établir proprement qu'elle contient en plus des structurations α et structurations β.

C-Spectre CD converti et normalisé qui donne une ellipticité en deg.cm^2.dmol^{-1} en fonction de la longueur d'onde. Le trajet optique, la concentration de l'échantillon (établie par absorbance sur NanoDrop) et la masse moyenne d'un résidu ont été utilisé pour la conversion.

D-Prédiction de la teneur en structures secondaires avec le programme CDSSTR (Sreerama & Woody, 2000) intégré dans le service en ligne DichrOWeb (Whitmore & Wallace, 2004). Avec une bonne superposition du

modèle prédit aux données expérimentales (NRMSD de 0.005), la prédiction donne 52% d'alpha et 14% de beta, et 17% de désordre ce qui est conforme à ce qui est attendu pour un domaine receveur.

Au vu des résultats de ces deux expériences de dichroïsme circulaire, nous pouvons d'ores et déjà avancer d'une part que les protéines sont repliées dans des proportions de structures secondaires conformes à ce qui est attendu pour un domaine receveur. D'autre part, que la protéine mutée E58K *in vivo* est bien repliée avec une signature spectrale de CD dans l'UV lointain qui ressemble assez à celle de la version non mutée. Il n'est pas exclu de refaire l'expérience avec de nouveaux lots placés cette fois dans les mêmes conditions.

IV. Discussion

Par une approche interdisciplinaire, nous avons pu apporter des éléments de réponse quant à l'activité des RR-B de peuplier, facteurs transcriptionnels des cascades de signalisation dites de phosphorelais multiples. En effet, même si des informations sur des représentants parmi des RR sont accessibles chez d'autres organismes modèles, leur mode de fonctionnement propre n'est pas clairement établi.

Dans un premier temps, notre démarche a été de mener une approche comparative de leur séquence, étape clé et primordiale dans la caractérisation de protéine. Comme attendu, les RR-B sont les membres d'une classe particulière de FT, composés de plusieurs domaines fonctionnels, que l'on retrouve indépendamment depuis les organismes unicellulaires jusqu'aux eucaryotes supérieurs. Chez le peuplier comme chez d'autres plantes modèles, cette classe présente une architecture (organisation particulière en séquences fonctionnelles) identique : en partie N-terminale un domaine receveur de la famille REC (domaine receveur homologue à cheY) appelé DDK, et en partie C-terminale un domaine de fixation à l'ADN de la superfamille Myb/SANT appelé GARP. Ces domaines sont suivis par une séquence très longue et structuralement désordonnée en extrémité carboxy-terminale. Cette analyse permet de confirmer et de soutenir clairement trois points : i) la protéine en question est susceptible de subir une phosphorylation au contact de protéines relais phosphorylées sur une position histidine ou HPt, ii) la protéine a une propension à interagir avec l'ADN (*via* un motif extrêmement conservé "hélice-tour-hélice" basique), iii) la protéine participe à des complexes multifactoriels de régulation génomique.

Dans un deuxième temps, notre démarche a consisté à étudier chaque module de cette

protéine séparément, ainsi que la protéine entière *in silico*, *in vivo* et *in vitro* en prenant comme prototype la protéine RR13. L'ensemble de ces études nous a permis pas à pas de dégager un modèle de fonctionnement complet d'un RR-B à l'échelle de la molécule dans lequel chaque domaine joue un rôle précis et qui devrait être modulé par l'évènement phosphorylation.

Le DDK, siège probable de la formation d'un dimère constitutif

Une des premières conclusions que l'on peut apporter grâce à ce travail est que le RR13, et de façon générale la plupart des RR-B de plantes, forment des dimères constitutifs (*i.e.* protéine en état dimérique indépendant de son état de phosphorylation) *via* le domaine DDK. Ce dernier est le siège de la dimérisation, comme attendu sur la base des observations réalisées chez les RR bactériens. En effet, d'une part des interactions entre les deux sous-unités, sans signal de phosphorylation, ont été observées en système hétérologue (DDK, FIGURE 40) et *in planta* (protéine entière, FIGURE 41). D'autre part, la possible existence d'un pont disulfure central entre deux résidus cystéines au cœur du dimère DDK (FIGURE 38), nous suggère une éventuelle dimérisation durable avec des sous-unités moins disposées à se dissocier. Toutefois, la validation biochimique devra être réalisée ultérieurement.

Théoriquement, ce pont ne rend pas un changement conformationnel impossible en cas de phosphorylation, bien au contraire, il pourrait, s'il est avéré, confiner l'exploration conformationnelle à deux conformations majeures (Fass, 2012) et rendre plus efficace le fonctionnement de ce RR. D'un point de vue évolutif, l'analyse de la conservation de ce résidu au sein du RD (FIGURE 37) chez les cyanobactéries et les bactéries a montré qu'il était absent et qu'il remplaçait un autre résidu (aspartate). Ce dernier ne pourrait jouer le même rôle de "verrou" que la cystéine chez le sous-groupe des plantes, où il est d'ailleurs extrêmement conservé (89%, FIGURE 37). Ainsi, la présence de ce résidu cystéine va dans le sens de l'évolution, et suggère une possible amélioration des mécanismes d'action des RR-B.

En outre, l'existence d'un dimère en état non phosphorylé d'un domaine receveur de phosphate a été mise en évidence concrètement, dans le cas du RD d'ETR1 (récepteur éthylène), qualifié de "classique" du fait de sa ressemblance avec le RR bactérien CheY (Müller-Dieckmann *et al.*, 1999). De plus, chez *Arabidopsis*, l'ARR18 est également capable de former des homodimères sans signal (*i.e.* sans apport de contrainte ou de CK) et les auteurs ont montré que les deux sous-unités de cet ARR, lorsqu'elles sont dans un état non phosphorylé, *via* l'utilisation de la forme mutée D/N, peuvent interagir (Veerabagu *et al.*, 2012). Dans les systèmes bactériens, malgré l'établissement de modèle de fonctionnement des RR après phosphorylation, la présence d'un dimère préalable par le domaine receveur est confuse. Par exemple, selon son modèle,

le RR ArcA censé être retrouvé en forme monomérique avant la phosphorylation et basculé en forme dimérique à la suite de celle-ci, a tout de même été cristallisé sous forme de dimère en absence de fluorure de béryllium (BeF^{3-}) utilisé classiquement pour mimer la phosphorylation (Toro-Roman *et al.*, 2005). Ainsi, dans certains cas, l'observation des structures en cristallographie disponibles concernant ces RR, ne nous permettent pas de trancher de façon claire sur l'état monomérique ou dimérique avant et après les évènements de phosphorylation. Ces difficultés peuvent provenir de la cristallogenèse elle-même qui pourrait piéger des formes non majoritaires, mais qui existent cependant dans le vivant. Quoiqu'il en soit, l'analyse de la bibliographie concernant les données structurales des RR bactériens tend à rendre difficile l'établissement d'une règle commune à propos des relations entre les états monomériques et dimériques et l'événement de phosphorylation. Il faut garder à l'esprit que les RR bactériens sont extrêmement nombreux et diversifiés en termes de fonction. Ils ont été très étudiés et les pistes sur les relations structure/activité dégagées, lors de ces nombreux travaux, ont fournies une base à notre modèle. Cependant, les RR-B sont typiques des phosphorelais multiples des plantes et peuvent différer de ces derniers (RR bactériens) sur quelques points probablement à cause de l'évolution subie par ces protéines.

Dans ce travail, la prédiction *in silico* (FIGURE 38) de la surface impliquée dans la dimérisation du domaine DDK a pu être confirmée en systèmes *in vivo* (levure et *in planta*) *via* les mutations de certains résidus (E123K et M105K) potentiellement impliqués dans la stabilité de cette interaction (FIGURE 40 & 41). Les tests impliquant des pertes de signal BiFC ou d'activation de gènes rapporteurs en système double-hybride, la vérification du bon repliement des protéines de leur version mutée constituent des approches complémentaires. Pour le moment, concernant la protéine $DDK^{E123K-M105K}$, les expériences de dichroïsme circulaire n'ont pas abouti. Nous prévoyons de les réitérer afin d'obtenir la preuve formelle que cette version mutante est bien repliée. Bien que, nous détenons déjà un indice obtenu par les expériences de BiFC montrant un faible signal d'interaction dans une configuration testée (FIGURE 41), suggérant un bon repliement de cette protéine. L'interface α4-ß5-α5 a été relevée comme étant impliquée dans de nombreux cas de dimérisation des RR bactériens, ce qui corrobore donc nos résultats présentés ici.

Le bénéfice de la dimérisation constitutive

Le rôle de la phosphorylation du domaine DDK comme élément déclencheur de l'activité effectrice des RR est bien établi. Chez les plantes, de nombreuses études utilisant des formes mutées

de RR-B (D/E, mimant l'état de phosphorylation) ont montré une augmentation de l'activation transcriptionnelle de gènes rapporteurs (Kim *et al.*, 2006; Veerabagu *et al.*, 2012). Cependant, les interrogations suivantes se dégagent :

- Comment agit cette phosphorylation sur l'activité du domaine effecteur ?
- Qu'offre l'état dimérique couplé à la phosphorylation d'un point de vue du contrôle de son activité ?

Le domaine DDK, comme domaine régulateur du domaine effecteur GARP

Dans le but de valider les modèles putatifs présentés, la confirmation *in planta* du mode de fonctionnement proposé d'un RR-B est primordiale. Elle sera réalisée par des expériences d'expression transitoire dans des cellules de plante, afin de tester la capacité d'activation de la transcription des formes RR13 mutées. En effet, l'utilisation du mutant $RR13^{E123K-M105K}$, devrait nous renseigner quant au rôle régulateur du domaine DDK sur le déclenchement de la transcription du gène rapporteur. Cependant la question est : sera-elle déclenchée ? Etant donné que la forme sauvage est un dimère constitutif et qu'il est impliqué dans le mécanisme de relargage du DBD par des phénomènes allostériques, la réponse apportée par un tel système pourrait être difficile à interpréter. Notons cependant que, la mutation dans l'interface α4-ß5-α5 du mutant $RR13^{E123K-M105K}$ ne perturbe par la surface d'interaction GARP/DDK. Si le domaine GARP n'est pas libéré pour une raison ou une autre, à cause de l'utilisation du double mutant, l'activation de la transcription ne sera pas réalisée, et un biais pourrait être apporté. Pour lever ces difficultés, et évaluer si ce mutant $RR13^{E123K-M105K}$ se trouve ou non dans une conformation déployée (ou ouverte) indépendamment du signal de phosphorylation, la stratégie de l'utilisation couplée de ce mutant avec la présence de résidus mimant la phosphorylation ($RR13^{E123K-M105K-D69E}$) ou la non phosphorylation ($RR13^{E123K-M105K-D69N}$) est nécessaire. De plus, la mutation E58K, permettant de lever l'interaction GARP/DDK, devrait provoquer une activation constitutive du gène rapporteur témoignant de l'obtention par cette mutation d'une forme active indépendante de l'état de phosphorylation. Quoiqu'il en soit, les relations entre l'état dimérique, l'état de phosphorylation et les modalités d'activation du domaine effecteur seront mis au jour à la suite de ces expériences. Ces constructions sont réalisées, et la mise au point du protocole est en cours.

Dans l'attente de l'ensemble des résultats, un modèle de fonctionnement des RR-B tend d'ores et déjà à se dégager, entre autre, par l'interaction qui se produit entre les domaines DDK et GARP en système *in vitro* (FIGURE 46). L'analyse de cette même interaction entre le domaine GARP et les mutants "absence de dimérisation" ($DDK^{E123K-M105K}$) et "absence d'interaction GARP/DDK" (DDK^{E58K}), nous confirme d'une part que la surface d'interaction GARP/DDK est différente de celle engagée

dans la dimérisation et d'autre part, que les perturbations générées dans l'interface α4-ß5-α5 n'affecte pas l'interaction GARP/DDK (FIGURE 47). La vérification du repliement du mutant DDK^{E58K} par la méthode de dichroïsme circulaire a été réalisée (FIGURE 48), validant ainsi l'utilisation de ce mutant. Par conséquent, le rôle régulateur du domaine receveur s'effectuerait *via* une interaction directe avec le domaine effecteur GARP par des interactions majoritairement électrostatiques. Ce phénomène a déjà été relevé chez les RR bactériens notamment NarL (Baikalov *et al.*, 1996) et DrrB (Robinson *et al.*, 2003), cependant dans ce cas une seule et même interface α4-ß5-α5 serait impliquée à la fois dans la dimérisation et l'interaction DBD/DDK. L'événement de phosphorylation entrainerait une baisse d'affinité du domaine GARP pour le domaine receveur qui irait alors se fixer sur l'ADN (Robinson *et al.*, 2003). Chez *Arabidopsis*, les résultats obtenus par Liang et ses collaborateurs (2012) avec la délétion des 45 premiers résidus pourraient corroborés nos résultats, et être expliqués par le fait que les auteurs ont supprimé la première hélice et les deux premiers brins du domaine DDK, rendant impossible le repliement de ce domaine. Sa fonction régulatrice exercée sur l'activité du domaine GARP serait alors levée, ce domaine de fixation à l'ADN devenu constitutivement libre et serait susceptible de se fixer sans aucun contrôle sur ces éléments de réponse.

La phosphorylation comme potentiel chef d'orchestre du domaine régulateur DDK

Une question supplémentaire se dégage à présent : si les RR-B dimérisent par leur DDK, siège de la réception du phosphate par les HPt, est-ce que l'événement phosphorylation doit se produire effectivement sur les deux sous-unités ?

Chez la levure, l'activation du dimère du RR cytoplasmique Ssk1p repose sur le fait que les deux sous-unités doivent être toutes les deux déphosphorylées pour assurer l'activation du dimère Ssk2p ou Ssk22p, impliqué dans la voie HOG (rappelons que dans la voie de signalisation de la contrainte osmotique chez la levure, la voie Sln1p-Ypd1p-Ssk1p est inactive et les protéines non phosphorylées aboutissent à l'activation de la voie HOG permettant la protection cellulaire). La protéine Ssk1p serait constamment dans un état dimérique (constitutif), et en absence de stress osmotique les deux sous-unités doivent être phosphorylées. Cependant, si une des sous-unités subit une déphosphorylation, chose plausible vu l'instabilité de la phosphorylation, l'hétérodimère Ssk1p~P/Ssk1p-OH ne bascule pas vers sa forme active (Horie *et al.*, 2008). Ainsi, on peut supposer que la phosphorylation d'une sous-unité se répercute par allostérie sur l'autre, impliquant des changements de conformations subtiles pour créer un dimère stable.

Une autre étude chez *Arabidopsis* va dans ce sens, Veerabagu et ses collaborateurs (2012) ont montré que la dimérisation observée de l'ARR18 entre sous-unités étant dans le même état de phosphorylation, n'a plus lieu lorsqu'elle est testée avec deux sous-unités dans un état de phosphorylation différent, c'est-à-dire l'$ARR18^{D/E}$ et l'$ARR18^{D/N}$. En suivant notre hypothèse, cette

absence de transfert énergétique en FRET peut être expliquée par le fait que les sous-unités de mêmes formes (D/E ou D/N) vont préférer former des dimères entre elles, et n'interagiront pas entre sous-unités dans un état de phosphorylation différent. De même, ces expériences de FRET ont permis de tester les interactions entre l'ARR18 sauvage avec l'un des deux mutants $ARR18^{D/E}$ ou $ARR18^{D/N,}$ montrant un passage d'énergie entre le RR18 sauvage et $ARR18^{D/E}$, mais pas avec l'autre mutant. Ces résultats reflètent ce phénomène d'allostérie de la phosphorylation : seul l'état mimant la phosphorylation (D/E) interagit avec la sous-unité non phosphorylée (ARR18 sauvage) qui adopte en retour sa conformation active, contrairement à la forme mimant la non phosphorylation (D/N), ce qui en accord avec la précédente étude (Horie *et al.,* 2008). Si une seule phosphorylation est requise pour l'activation du RR, on peut s'interroger sur l'état dimérique d'une HPt qui transfèrait le signal (Punwani *et al.,* 2010).

Chapitre II

Caractérisation de l'implication de RR-B dans la voie "osmosensing"

I. INTRODUCTION

Le niveau de conservation du domaine de fixation à l'ADN, le domaine GARP, entre RR-B d'une même espèce ou entre espèces est en faveur d'une conservation réciproque des éléments de réponse. Il est ainsi attendu de retrouver des motifs *cis* identiques ou très similaires, qui sont caractérisés par la séquence 5' (A/G)GAT(T/C) 3' (TABLEAU 26). En effet, chez *Arabidopsis*, il a été démontré *in vitro*, que les domaines GARP des ARR1 et 2 se fixent majoritairement et de manière spécifique sur le motif 5' AGAT(T/C) 3' (Sakai *et al.*, 2000). Une autre étude a montré qu'une fixation optimale de l'ARR1 sur l'ADN nécessitait une extension de part et d'autre de ce motif considéré comme un motif de reconnaissance plus étendu, de séquence 5' AAGAT(T/C)TT 3' (Taniguchi *et al.*, 2007). Les domaines GARP des ARR10 et 11, quant à eux, présentent une plus forte affinité de liaison pour les séquences 5' (A/G)GATT 3' ou 5' GGATC 3' (Hosoda *et al.*, 2002), et 5' GGATT 3' (Imamura *et al.*, 2003) respectivement. La séquence cœur reconnue par les RR-B correspond sans aucun doute aux trois nucléotides centraux invariants GAT (5' AGAT(T/C) 3') (Sakai *et al.*, 2000; Hosoda *et al.*, 2002; Imamura *et al.*, 2003; Taniguchi *et al.*, 2007). De plus, chez *Medicago truncatula*, autre plante modèle, la séquence de reconnaissance du domaine GARP d'un RR-B, MtRR1, a été mise en évidence et suit le consensus établi (Ariel *et al.*, 2012). Ces motifs de reconnaissance des RR-B sont définis comme des séquences en *cis* sur les zones promotrices qui constituent les éléments de réponse aux CK, par conséquent désignées CRM ou ECRM pour "**C**ytokinin **R**esponse **M**otif" ou "**E**xtended **C**ytokinin **R**esponse **M**otif".

TABLEAU 26-Descriptif des séquences *cis* reconnues par les ARR de type-B

	CRM	ECRM
ARR1	AGAT(T/C) (a)	AAGAT(T/C)TT (b)
	(A/T/C/G)GATT (a)	
ARR2	AGAT(T/C) (a)	
	(A/T/C/G)GATT (a)	
ARR10	(A/G)GATT ou GGATC (c)	
	(C/T)GATT ou GGATA (c)	
ARR11	GGATT (d)	
	CGATT (d) ou GGATA (d)	

REFERENCES : (a) Sakai *et al.*, 2000; (b) Taniguchi *et al.*, 2007; (c) Hosoda *et al.*, 2002; (d) Imamura *et al.*, 2003

CRM : **C**ytokinin **R**esponse **M**otif, ECRM : **E**xtended **C**ytokinin **R**esponse **M**otif

Les séquences surlignées en bleu sont celles pour lesquelles la liaison des domaines GARP est la plus forte, et celles surlignées en vert fixent plus faiblement les domaines GARP.

La difficulté d'analyse de promoteurs de gènes concernant ce motif, réside notamment dans la petite taille de ces séquences (5 pb). De ce fait, elle est fréquemment retrouvée (toutes les 108 pb)

dans les promoteurs des gènes *a priori* non régulés par les CK (Zürcher *et al.*, 2013). Une analyse de promoteurs (1 kb en amont du site d'initiation) appartenant à 20 gènes de réponse aux CK les plus régulés, a montré que le motif CRM n'est pas significativement retrouvé dans ces gènes de réponses par rapport à des gènes non régulés par les CK (Brenner *et al.*, 2012). Cependant, Zürcher et collaborateurs (2013) ont observé que ce motif CRM serait un peu plus fréquent (toutes les 83 bp contre 108 bp) dans les promoteurs des gènes RR de type-A. De plus, certains auteurs ont recherché le nombre de motifs CRM dans une fenêtre de 100 paires de bases de part et d'autre des motifs étendus ECRM considérés dans 1000 pb du promoteur (en amont du site d'initiation), et ont montré leur enrichissement (5,5 fois) dans les gènes régulés par les CK (Ramireddy *et al.*, 2013). Les motifs étendus ECRM, quant à eux, lorsqu'ils sont présents, seraient enrichis de 16 fois par rapport à une valeur de base de l'occurrence du motif (Brenner *et al.*, 2012).

Une étude récente a permis de tester le rôle du nombre de répétitions du motif de reconnaissance, de la distance entre les motifs, de leurs orientations et la nature des résidus voisins de la séquence cœur (Zürcher *et al.*, 2013). Les auteurs ont créé un système rapporteur synthétique afin de ne visualiser que les réponses générées par les CK *in vivo*. Ce système est composé d'un promoteur minimal 35S, de plusieurs copies du motif CRM et du gène rapporteur codant la luciférase. L'optimisation du système a été réalisée sur la base d'analyse de promoteurs de RR de type-A afin de rassembler toutes les caractéristiques indispensables à l'obtention d'un système sensible et produisant des réponses stables face aux différents RR de type-B. L'orientation des séquences ne s'est pas révélée déterminante, contrairement au nombre de répétition et la distance séparant les motifs montrant qu'une augmentation du nombre de copies à 24 sites de fixation de séquence 5' AA(A/G)GAT(C/T)TT 3' espacés de 11 bp est optimale.

Actuellement, il existe peu d'études confirmant le rôle de ces séquences en *cis in planta*. Ross et ses collaborateurs (2004) ont montré que les CK sont capables d'activer le promoteur du gène *NSHB2* (**N**ON-**S**YMBIOTIC **H**EMOGLO**B**IN **2**) du riz dans des feuilles de tabac *via* l'ARR1 d'*Arabidopsis*. Des mutations générées dans le motif CRM reconnu par l'ARR1 au niveau du promoteur du gène conduit à une réduction de son activation, confirmant ainsi l'implication de ce motif et du FT ARR1 pour l'expression de *NSHB2*. Plus récemment, une étude réalisée par mutagénèse, se focalisant sur le promoteur de l'*ARR6* a montré la nécessité des motifs ECRM *in planta* afin que les RR-B puissent accomplir leur fonction de FT (Ramireddy *et al.*, 2013). Les différents motifs retrouvés au sein du promoteur du gène *ARR6* ne contribueraient pas tous de manière égale dans la régulation de l'activité de ce promoteur. De plus, l'implication de ces boîtes de reconnaissance serait différente entre RR-B, suggérant une spécificité non nécessairement directe (co-facteurs). Cette équipe a d'ailleurs également mis en évidence une séquence d'environ 27 bp en amont des sites de fixation

des RR-B, indispensable à l'activation complète du gène *ARR6*, qui appuie l'hypothèse de la nécessité d'une coopération entre différents facteurs pour déclencher efficacement une transcription d'un gène de réponse.

Ainsi, la plupart des études de caractérisation de la fonctionnalité des RR-B ont été réalisées dans le cadre d'une réponse à un signal CK. Cependant, l'existence de phosphorelais multiples impliqués dans des voies de transduction d'autres types de signaux perçus par des HK différentes de celles dédiées à la détection des CK, peuvent aussi activer les RR-B dans le cadre d'autres réponses, ce qui rend le découplage de la spécificité de réponse difficile. Comme précédemment présenté, l'ARR2 serait capable d'activer la transcription du gène *ERF1* impliqué dans la voie de transduction éthylène, possiblement par fixation sur des motifs PER (**P**RIMARY **E**THYLENE **R**ESPONSIVE). Cette capacité de fixation a été montrée *in vitro* (Hass *et al.*, 2004), bien que la séquence de ce motif corresponde à la séquence cœur des CRM. Concernant la contrainte osmotique, Veerabagu et collaborateurs (2011) ont analysé les promoteurs des gènes dont la régulation est dépendante d'AHK1 et n'ont identifié aucun élément de reconnaissance caractéristique des ARR de type-B. Cependant, l'implication de l'ARR18 dans cette voie de signalisation n'en est pas pour autant écartée, car il serait un modulateur de l'activité transcriptionnelle des FT bZIP recrutés au sein des promoteurs de gènes de réponses *via* leur propre élément de reconnaissance.

II. OBJECTIFS ET STRATÉGIES

Dans ce contexte, on peut s'interroger sur la spécificité des éléments de reconnaissance en *cis* des gènes sous le contrôle des RR-B, initialement définis comme éléments de réponse spécifique du signal CK :

- Les séquences des éléments de reconnaissance en *cis* des RR-B sont-elles toutes identiques et ce, quel que soit le signal ?
- D'où provient la spécificité de la réponse au niveau du complexe transcriptionnel face à un signal donné ?

Afin de répondre à ces interrogations qui se placent dans une problématique plus générale concernant les RR-B, des étapes préalables étaient nécessaires concernant les RR-B de peuplier, à savoir, de vérifier leur capacité de fixation sur les éléments de reconnaissance des ARR de type-B et tester leur capacité d'activation de leurs cibles potentielles au sein de cette voie de transduction de la contrainte osmotique.

Dans le cadre de cette étude, nous avons choisi d'utiliser deux RR-B, le RR13 et le RR18 sélectionnés notamment de par leur régulation face au stress osmotique. Des études antérieures au

sein du laboratoire ont montré que le gène *HK1* (Chefdor *et al.*, 2006) et un gène de *déhydrine peudhn1* (Caruso *et al.*, 2002) voyaient une augmentation de leurs transcrits dès cinq minutes de contrainte réalisée par un traitement au PEG_{6000} dans les racines et les feuilles respectivement. Compte tenu de ces régulations précoces, notre hypothèse de départ était que les RR-B pouvaient réguler la transcription de ces deux gènes de réponse à la contrainte osmotique. La régulation de l'expression du gène *HK1* pourrait indiquer que ces RR-B participeraient directement à la régulation de leur propre voie *via* la régulation du récepteur. Nous avons donc entrepris de vérifier dans un premier temps, la capacité de fixation d'un des RR-B sur leurs motifs de reconnaissance et d'autre part la régulation des transcrits des deux gènes de réponse *HK1* et *peudhn1* par un stress osmotique. Dans un deuxième temps, l'analyse des promoteurs des deux gènes afin de rechercher *in silico* la présence ou non de ces boîtes, étape supplémentaire nécessaire, a été réalisée. Pour finir, la capacité *trans*-activatrice des deux RR-B à déclencher la transcription de ces gènes sous une contrainte osmotique est envisagée afin d'en apporter la preuve fonctionnelle.

III. RÉSULTATS

III.1 Interaction *in vitro* entre le domaine GARP du RR13 et des sondes ADN comportant les séquences *cis* de reconnaissance des RR-B

Afin de vérifier l'interaction présumée entre le domaine GARP du RR13 et les boîtes ou éléments de réponse des RR-B, des expériences de retard sur gel ont été réalisées en utilisant la protéine de fusion GST-RR13-GARP produite précédemment (PARTIE II, Chapitre I). Les sondes ADN utilisées AV0 et AV2 (TABLEAU 26), correspondent à des amplifications PCR de séquences spécifiques du promoteur *hds* (*hydroxyl methyl butenyl diphosphate synthase*), gène de réponse aux CK, caractérisé par la présence de boîtes 5' NGATT 3' et 5' NGATV 3' où le N dans ce cas est T/A et le V est G (Ginis *et al.*, 2012). Une sonde synthétique nommée ERF et dépourvue d'élément de réponse RR-B, a également été utilisée comme sonde négative. Les tests d'interaction ont été visualisés et analysés à la suite d'une électrophorèse sur gel polyacrylamide en conditions natives (FIGURE 49). Les résultats montrent que la protéine GST-GARP du RR13 de peuplier provoque un retard de migration des deux sondes AV0 et AV2 (FIGURE 49, A). La protéine recombinante mise en évidence par coloration au bleu de coomassie co-localise exactement avec les sondes ADN retardées (FIGURE 49, B). En absence de protéine recombinante (FIGURE 49, A-D) ou en présence de la sonde ADN contrôle ERF (FIGURE 49, C, D), aucun retard de migration n'est observé.

Ces expériences nous permettent ainsi de valider et confirmer la capacité de liaison *in vitro* d'un RR-B de peuplier sur les motifs de reconnaissance des ARR de type-B.

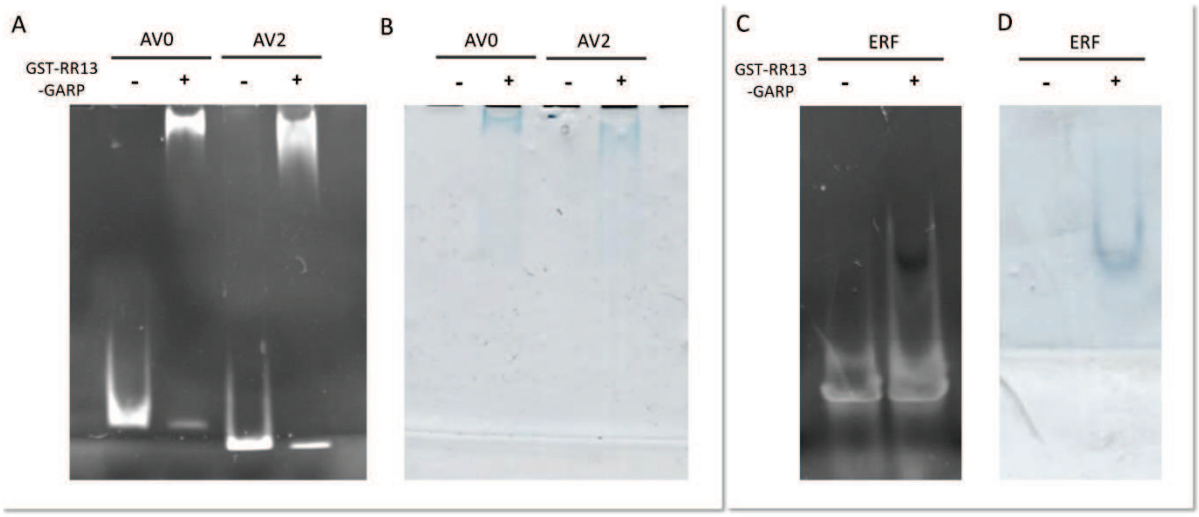


FIGURE 49 – Interaction entre le domaine GARP du RR13 et des sondes ADN comportant les éléments de réponse des ARR de type-B

Cette étude d'interaction entre le domaine GARP et les différentes sondes ADN a été réalisée par la technique de retard sur gel. Une quantité de 100 ng d'ADN (nature des sondes indiquées en haut des gels) a été incubée soit en absence de protéine GST-GARP de RR13 (-) soit en présence (+) de 2 µg de protéines. La sonde contrôle appelée ERF (C-D) est dépourvue de motif de reconnaissance des ARR. L'ADN a été visualisé sous UV après un bain de BET (A-C) et les protéines par une coloration au bleu de coomassie G-250 (B-D).

III.2 Analyse des régulations transcriptionnelles de deux gènes potentiellement régulés par la contrainte osmotique

III.2.a *Le gène peudhn1 codant une déhydrine*

Afin de confirmer et d'affiner le profil de régulation transcriptionnelle du gène *peudhn1* obtenu par la technique du Northern-blot dans une précédente étude (Caruso *et al.*, 2002), une analyse par PCR en temps réel a été menée. Identique à celle effectuée pour les deux RR-B, RR13 et RR18, cette étude a été réalisée à partir des quatre organes (racines, tiges, pétioles, feuilles) soumis à un stress au PEG_{6000} (100 g/L) lors d'une cinétique de temps courts et longs.

Une première analyse en condition contrôle au temps 0 (FIGURE 51), a montré que les organes racines, tiges et pétioles présentent trois à quatre fois plus de transcrits du gène *peudhn1* que les feuilles.

En considérant chaque organe de façon indépendante, on a observé globalement une augmentation significative des teneurs en transcrits au terme des six heures de contrainte dans tous les organes, d'un facteur sept dans les feuilles et, de un et demi à deux dans les autres organes

(FIGURE 51). Dans les tiges et les feuilles, au cours de la cinétique de contrainte, une tendance à l'augmentation progressive des transcrits jusqu'à atteindre leur niveau le plus haut à six heures a pu être dégagée (Figure 51, B, D). Les racines, quant à elles, ont montré qu'entre cinq et 60 minutes, les transcrits présentent des légères baisses significatives de leur taux d'expression (FIGURE 51, A). Pour les pétioles, le point 40 minutes présente une augmentation des teneurs en transcrits qui semble être aberrante (FIGURE 51, C). Quoique nous n'ayons pas quantifié réellement les transcrits, nous pouvons noter que malgré des teneurs en transcrits *peudhn1* en condition témoin dans les feuilles nettement inférieures à celles des autres organes (FIGURE 50), les niveaux atteints par ces transcrits au terme de la cinétique de contrainte dans les feuilles sont supérieurs aux autres organes considérés.

Dans cette étude, nous pouvons donc en déduire que le gène codant la déhydrine *peudhn1* est significativement régulé par le stress osmotique principalement à des temps longs de la cinétique dans les quatre organes considérés.

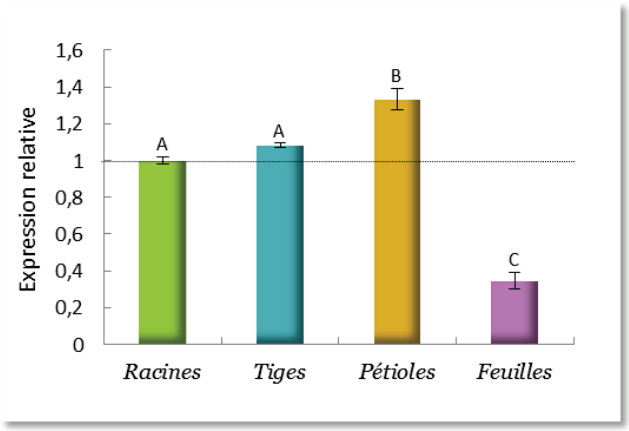


FIGURE 50 – Expression relative des transcrits de *peudhn1* dans les différents organes en condition témoin

Le niveau d'expression relative du gène *peudhn1* a été mesuré dans différents organes (racines, tiges, pétioles, feuilles) des boutures de peuplier au temps 0, sans apport de contrainte. Les calculs d'expression relative sont basés sur le niveau de transcrits de *peudhn1* dans les racines au temps 0 (calibrateur). Les valeurs moyennes (± erreurs standards) des expressions relatives de *peudhn1* au sein de chaque organe ont été comparées par une analyse ANOVA suivie d'un test Scheffe. Les valeurs portant une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de $P<0,05$.

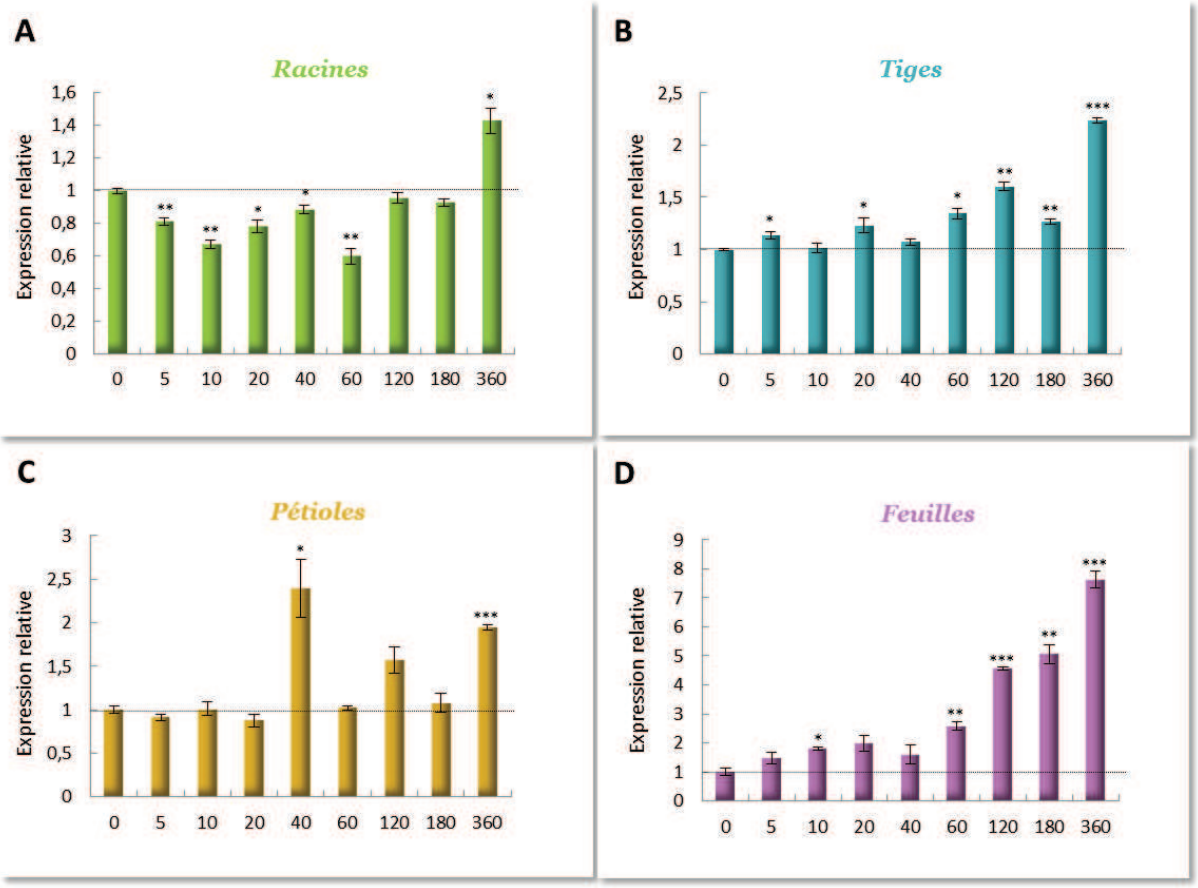


FIGURE 51 – **Expression relative des transcrits du gène *peudhn1* dans les différents organes de peuplier soumis à une contrainte osmotique au PEG_{6000}**

Le niveau d'expression relative de *peudhn1* a été mesuré dans différents organes : racines (A), tiges (B), pétioles (C), feuilles (D) de boutures de peuplier soumises à un traitement PEG_{6000} (100 g/L) au cours de la cinétique de contrainte. Les calculs d'expression relative se basent sur le niveau de transcrits de *peudhn1* au sein de chaque organe au temps 0 (calibrateurs). Les valeurs moyennes (± erreurs standards) des expressions relatives à chaque temps de la cinétique ont été comparées à celles du temps 0 respectivement pour chaque organe par un test-t, les astérisques indiquant une différence significative (*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001).

III.2.b *Le gène HK1*

De façon identique, l'étude de la régulation de *HK1* a été menée par la technique de PCR en temps réel dans le but de compléter et de confirmer l'analyse antérieure de l'expression de ce gène réalisée par RT-PCR relative classique (Chefdor *et al.*, 2006).

En condition témoin, les transcrits de *HK1* sont nettement moins présents dans les racines que dans les parties aériennes (FIGURE 52).

Une augmentation des transcrits, d'un facteur 20 de ce gène est constatée dans les racines

dès cinq minutes de contrainte, et cette régulation transcriptionnelle est maintenue jusqu'au terme des six heures avec un taux de transcrits cinq fois supérieur au témoin (FIGURE 53, A). On observe également une augmentation rapide des transcrits dans les feuilles et les tiges respectivement d'un facteur deux et trois à 10 minutes de contrainte (FIGURE 53, B, D), puis un retour graduel au niveau basal uniquement dans les feuilles (FIGURE 53, D). Par contre dans les tiges, cette régulation est globalement maintenue à l'exception de quelques points (FIGURE 53, B). Concernant les pétioles, un profil de régulation assez variable est observé. Malgré la significativité de certaines différences d'expression l'amplitude de régulation reste assez faible (FIGURE 53, C). Nous pouvons ajouter que le taux de transcrits atteint dès cinq minutes de stress dans les racines est au même niveau que ceux mesurés dans les autres organes (FIGURE 52). En effet, à 10 minutes, les niveaux d'expression du gène *HK1* atteints sont quasi-équivalents dans tous les organes (données non montrées).

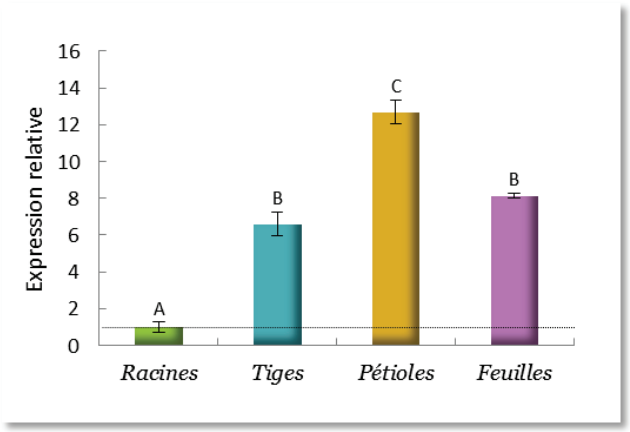


FIGURE 52 – **Expression relative des transcrits du gène *HK1* dans les différents organes en condition témoin**

Le niveau d'expression relative de *HK1* a été mesuré dans différents organes (racines, tiges, pétioles, feuilles) des boutures de peuplier au temps 0, sans apport de contrainte. Les calculs d'expression relative sont basés sur le niveau de transcrits de *HK1* dans les racines au temps 0 (calibrateur). Les valeurs moyennes (± erreurs standards) des expressions relatives de *HK1* au sein de chaque organe ont été comparées par une analyse ANOVA suivie d'un test Scheffe. Les valeurs portant une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de $P<0,05$.

Globalement, le gène *HK1* est régulé par la contrainte osmotique dans un laps de temps très court puisque cette régulation est observable dès cinq minutes de contrainte. D'autre part, les racines sont plus particulièrement concernées par cette régulation puisque l'on observe une augmentation conséquente des teneurs en transcrits qui sont multipliées par 20 dès l'application du stress.

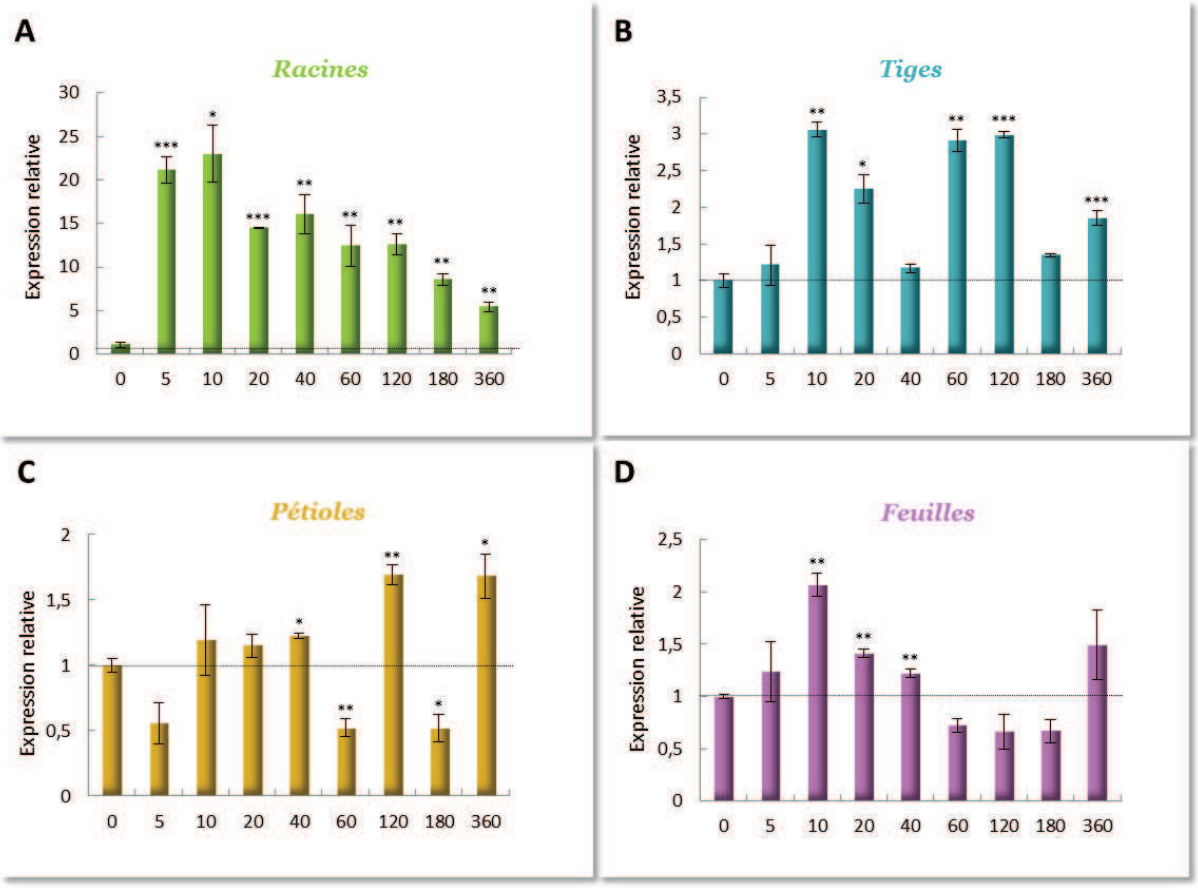


FIGURE 53 – **Expression relative des transcrits du gène *HK1* dans les différents organes de peuplier soumis à une contrainte osmotique au PEG_{6000}**

Le niveau d'expression relative de *HK1* a été mesuré dans différents organes : racines (A), tiges (B), pétioles (C), feuilles (D) de boutures de peuplier soumises à un traitement PEG_{6000} (100 g/l) au cours de la cinétique de contrainte. Les calculs d'expression relative se basent sur le niveau de transcrits de *HK1* au sein de chaque organe au temps 0 (calibrateurs). Les valeurs moyennes (± erreurs standards) des expressions relatives à chaque temps de la cinétique ont été comparées à celles du temps 0 respectivement pour chaque organe par un test-t, les astérisques indiquant une différence significative (*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001).

III.3 Analyses bio-informatiques des promoteurs des deux gènes régulés par la contrainte osmotique

Les logiciels de prédiction pour l'analyse des éléments en *cis* des gènes régulés par des ARR de type-B ont été conjointement utilisés et leurs résultats ont été par la suite croisés. Il s'agit des logiciels PLACE (Higo *et al.*, 1999) et PlantPAN (Chang *et al.*, 2008). Les analyses bio-informatiques ont porté sur des séquences promotrices des gènes *peudhn1* et *HK1* situées à environ 1,6 kb en amont du site d'initiation. Ces programmes ont identifié respectivement 25 et 18 motifs 5' NGATT 3' (Sakai *et al.*, 2000) positionnés indifféremment en orientation sens ou antisens (FIGURE 54 & 55).

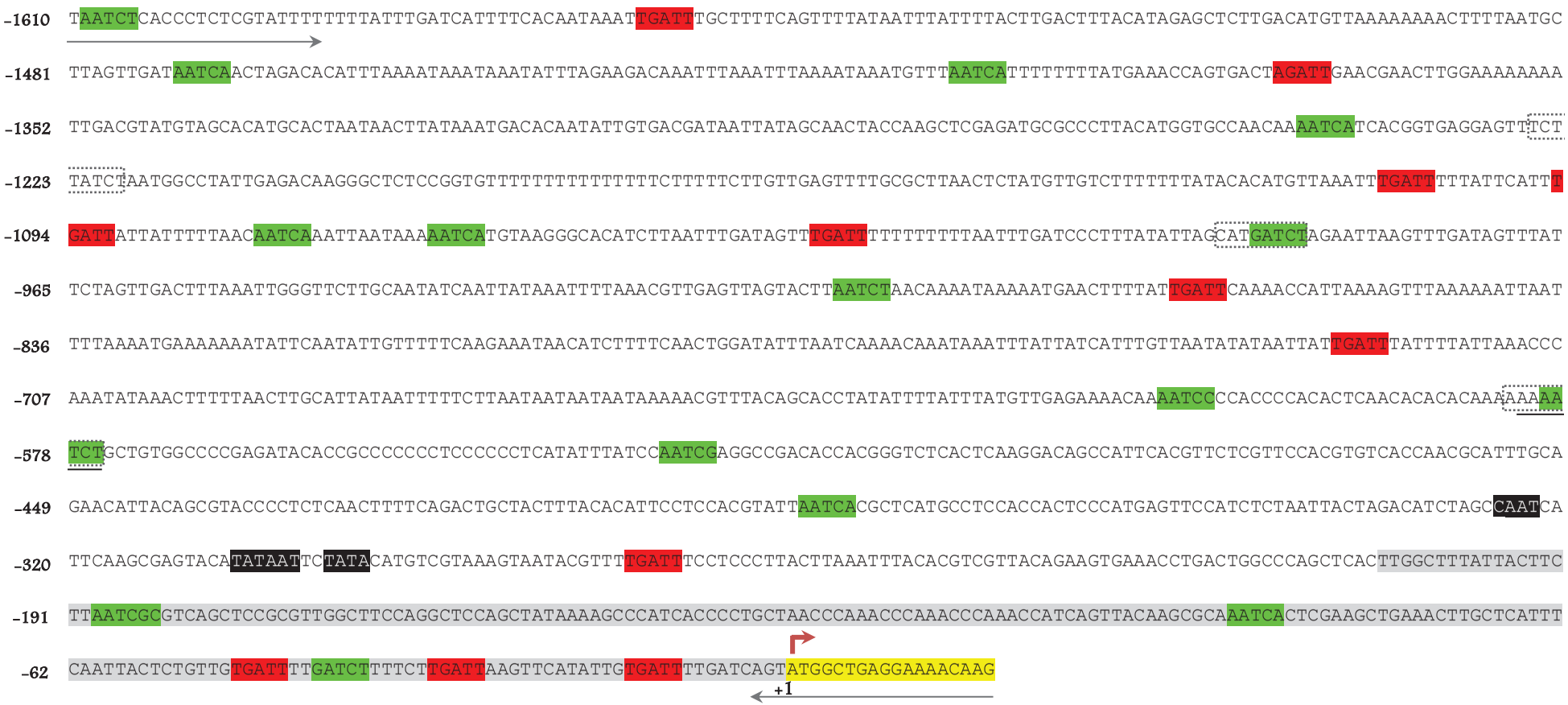


FIGURE 54 – **Séquence nucléotidique du promoteur en amont du gène *peudhn1* du peuplier génotype Dorskamp**

La position relative de l'adénine appartenant au codon d'initiation de la traduction (ATG) est numérotée +1. Les séquences codantes et 5' UTR sont surlignées respectivement en jaune et gris. Les amorces nucléotidiques utilisées pour isoler le promoteur sont surlignées par une flèche. Les boîtes potentielles TATA et CAAT identifiées sont surlignées en noir. Les différents motifs ARR sont soit encadrés en pointillé lorsqu'ils correspondent à une des séquences 5' **AAAATCT** 3', 5' **TCTTATCT** 3', 5' **CATGATCT** 3' (antisens) (Hosoda *et al.*, 2002), soit soulignés lorsqu'ils ont la séquence 5' **AAAATCT** 3' (antisens) (Taniguchi *et al.*, 2007) soit surlignés en rouge ou vert lorsqu'ils ont les séquences sens 5' **(A/T)GATT** 3' ou antisens 5' **AATC(C/G/A/T)** 3' respectivement (Sakai *et al.*, 2000).

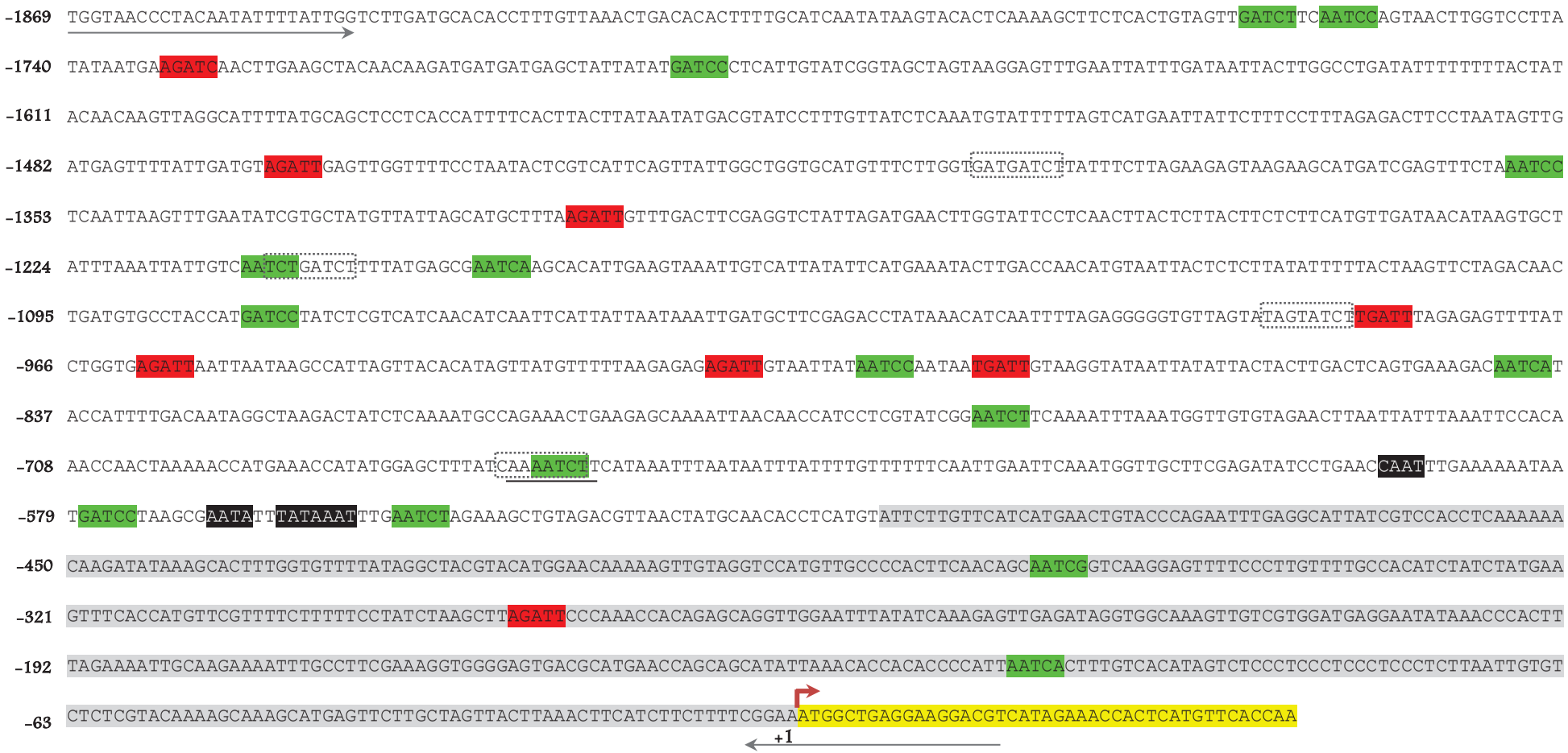


FIGURE 55 – **Séquence nucléotidique du promoteur en amont du gène *HK1* du peuplier génotype Dorskamp**

La position relative de l'adénine appartenant au codon d'initiation de la traduction (ATG) est numérotée +1. Les séquences codantes et 5' UTR sont surlignées respectivement en jaune et gris. Les amorces nucléotidiques utilisées pour isoler le promoteur sont surlignées par une flèche. Les boîtes potentielles TATA et CAAT identifiées sont surlignées en noir. Les différents motifs ARR sont soit encadrés en pointillé lorsqu'ils correspondent à une des séquences 5' **CAAAATCT** 3', 5' **TCTGATCT** 3', 5' **TAGTATCT** 3' (antisens) (Hosoda *et al.*, 2002), soit soulignés lorsqu'ils ont la séquence 5' **AAAATCTT** 3' (antisens) (Taniguchi *et al.*, 2007), soit surlignés en rouge ou vert lorsqu'ils ont les séquences sens 5' **(A/T)GATT** 3' ou antisens 5' **AATC(C/G/A/T)** 3' respectivement (Sakai *et al.*, 2000).

Plusieurs études ayant mis également en évidence un degré d'affinité important pour des résidus bordant la séquence cœur de nature différente du motif 5' NGATT 3', cette analyse a également été réalisée avec les motifs de séquence 5' NGATV 3' retrouvés pour les ARR1, 2, 10 et 11, et les motifs dits étendus de l'ARR1 (TABLEAU 26). Quatre motifs supplémentaires ont donc été rajoutés concernant *peudhn1* et cinq pour *HK1* (FIGURE 54 & 55).

IV. DISCUSSION

Cette étude préliminaire est la première étape d'une tâche beaucoup plus vaste qui concerne les RR-B en général. L'objectif initial de ce travail était d'initier une caractérisation de l'implication de ces deux RR-B, RR13 et 18, dans la voie de transduction du signal de la contrainte osmotique.

Nous avons pu dans un premier temps confirmer la capacité du RR13 à se fixer *in vitro* sur les motifs 5' NGATT 3' ou 5' NGATV 3'. Ces résultats ont été obtenus à partir d'un promoteur d'un gène de *C. roseus* impliqué dans la voie de signalisation CK et ne constituent qu'une première étape de ce travail. Ils seront complétés par la suite pour le RR18 entre autre, puisque la détermination exacte de la nature des résidus présents dans le motif de reconnaissance ou ceux qui les bordent pour chaque RR-B est décisive compte tenu des différences observées entre RR-B d'*Arabidopsis* (TABLEAU 26). En effet, ces différences minimes constatées pourraient bien être en partie à l'origine des comportements différents des RR-B face à l'activation de gène de réponse. Plusieurs études établissent ces différences de comportement des membres RR-B, lors d'un apport de CK, vis-à-vis de leur capacité à *trans*-activer *in planta* le gène *ARR6* (Hwang & Sheen, 2001; Heyl *et al.*, 2008). D'ailleurs le système rapporteur synthétique précédemment décrit est activé par tous les RR-B testés, avec toutefois quelques disparités notables entre ARR-B (Müller & Sheen, 2008; Zürcher *et al.*, 2013). Notons cependant que ces spécificités doivent être attendues et la modulation de l'expression d'un gène par les RR-B ne résulte pas uniquement d'une préférence de fixation sur certain motif de l'ADN, mais que d'autres paramètres sont à prendre en compte. Ces aspects seront abordés ultérieurement.

Dans un deuxième temps, afin de valider les régulations transcriptionnelles des deux gènes *peudhn1* et *HK1*, lors d'une contrainte osmotique, observées antérieurement, une nouvelle étude de la régulation a été réalisée. Nous la considérons comme étant plus complète, à la fois en terme de cinétique, puisque nous avons étudié cette régulation sur des temps courts et longs, et à la fois en terme de technique, puisque nous avons utilisé la technique de la PCR en temps réel permettant une analyse fine des régulations.

En ce qui concerne le gène *peudhn1*, nous avons pu montrer que :

- Ses teneurs en transcrits sont plus abondantes dans les racines que les autres organes en condition témoin. Ce résultat est contraire à celui trouvé dans une étude précédente (Caruso *et al.,* 2002), montrant un taux de transcrits plus abondant dans les feuilles. On peut noter que le gène *ERD14* chez *Arabidopsis,* homologue de *peudhn1*, a également été retrouvé plus abondamment dans les racines (Nylander *et al.,* 2001).
- Les augmentations des taux de transcrits dans les feuilles sont significatives à partir d'une heure de stress et corroborent les résultats observés par Caruso et ses collaborateurs (2002). Par contre, l'augmentation précoce observée lors de cette précédente étude n'est confirmée, dans notre étude, que pour le temps 10 minutes de contrainte.
- La régulation de son expression dans les racines montre de légères baisses significatives d'accumulation de transcrits de cinq minutes à une heure de contrainte, ce qui est contraire à ce qui a été observé précédemment (Caruso *et al.,* 2002). Dans notre étude, seule une augmentation significative est observée à six heures de stress.

Cette étude nous a permis de confirmer une régulation du gène codant la déhydrine principalement au niveau des feuilles lors d'une contrainte osmotique. Cependant, dans notre étude, cette régulation est tardive. Par conséquent, certains de nos résultats actuels ne valident pas totalement ceux préalablement observés. Ces différences peuvent s'expliquer d'une part en raison de la nature de la technique utilisée, la PCR en temps réel, et d'autre part, en raison de la contrainte plus forte appliquée. En effet, l'étude précédente a été réalisée en utilisant la technique du Northern-blot, technique par laquelle on ne peut s'assurer de l'unicité du produit détecté contrairement à la PCR en temps réel, dont le principe repose sur l'amplification d'un seul produit spécifique du gène étudié. D'autre part, la seconde étude a été réalisée en utilisant une concentration de PEG plus élevée en raison de la taille des boutures utilisées qui présentaient un diamètre plus important que dans l'étude précédente (pourtant du même âge). Cette différence de taille peut contribuer à expliquer une réponse physiologique différente, observée lors de nos tests réalisés à 50 g/L de PEG, nous ayant contraint à utiliser une concentration plus élevée de cet osmolyte.

En ce qui concerne le gène *HK1*, nous avons pu montrer que :

- Ses transcrits sont plus abondants dans les parties aériennes que dans les racines.
- L'augmentation de la teneur en transcrits du gène *HK1* est observée dès cinq minutes pour les racines, et dès 10 minutes pour les tiges et feuilles, perdurant dans le temps pour les racines et globalement pour les tiges. Chez le peuplier, une précédente étude a montré par RT-PCR relative

classique, une augmentation des transcrits de *HK1* de 24% à cinq minutes de contrainte par application de PEG (50 g/L), avec un retour à 10 minutes des teneurs en transcrits au même taux que le témoin (Chefdor *et al.,* 2006). L'augmentation du taux de transcrits dans les racines visualisée à cinq minutes est confirmée, cependant, à 10 minutes de contrainte cette augmentation est maintenue dans notre étude. Encore une fois, ces différences peuvent provenir de la nature des techniques utilisées et des conditions expérimentales.

Chez *Arabidopsis*, les transcrits d'*AHK1* sont majoritairement exprimés dans les racines par rapport aux tiges et aux feuilles (Urao *et al.,* 1999). De plus, ces transcrits sont globalement augmentés dès 10 minutes de déshydratation (dessiccation des plantes à 22°C à 60% d'humidité). Ces résultats ont été visualisés par la technique du Northern-blot à partir d'ARN provenant de plantes entières, pour des cinétique débutant à 10 minutes de contrainte (Urao *et al.,* 1999; Tran *et al.,* 2007). Dans cette présente étude, nous avons pu montrer que les transcrits du gène *HK1* sont majoritairement exprimés dans les organes aériens de peuplier, contrairement à ce qui a été observé chez *Arabidopsis*. D'autre part, l'étude de la régulation de l'expression du gène *HK1*, que nous avons réalisée, montre comme chez *Arabidopsis*, une régulation précoce dans la majorité des différents organes étudiés de peuplier. De plus, une régulation spatio-temporelle variable de ce gène au cours de la contrainte a également été observée, soulignant clairement la nécessité de traiter séparément les organes lors de futures études concernant ce gène.

Dans un troisième temps, l'analyse bio-informatique des promoteurs des gènes *peudhn1* et de *HK1* a permis de mettre en évidence la présence de nombreuses boîtes ou éléments de réponse reconnus par des RR-B. Ainsi, la régulation de ces gènes au cours de la contrainte osmotique, ainsi que la présence de ces boîtes de fixation des RR-B dans leurs séquences promotrices, font de ces gènes des cibles intéressantes sous le contrôle putatif d'effecteurs RR-B, tels que RR13 et 18. Cependant, seule l'étude *in planta* de la régulation de l'activité des promoteurs de ces gènes, *peudhn1* et *HK1,* par les deux RR-B sous l'impact d'une contrainte osmotique devrait nous permettre de conclure quant à cette potentielle activation orchestrée par les RR-B. Pour le moment, ces tests n'ont pas été réalisés et nous prévoyons de les conduire par des expériences d'expression transitoire *in planta*. La réalisation de l'ensemble des constructions plasmidiques, c'est-à-dire celles permettant la surexpression des deux RR-B et celles contenant les promoteurs de *peudhn1* et *HK1* en amont du gène rapporteur *gus,* est actuellement achevée. Dans l'attente de l'ensemble des résultats, nous pouvons néanmoins discuter certains points.

La confirmation d'une régulation précoce du gène *peudhn1* n'a pas été obtenue dans notre

étude, seule une régulation tardive a été observée. Chez *Phaseolus vulgaris*, le gène *PvSR3* codant pour une déhydrine, présentant 70% de similarité de séquences avec la déhydrine de peuplier étudiée dans cette étude, *peudhn1* (*Zhang et al.,* 2006), n'est pas régulé tant au niveau transcriptionnel (données non montrées donc conditions expérimentales inconnues) qu'au niveau protéique par un traitement PEG de 24 heures dans les racines (Yang *et al.,* 2013). Ces auteurs ont observé une augmentation du taux de phosphorylation de ces protéines et ce malgré une absence d'augmentation transcriptionnelle. Cette modification post-traductionnelle lui permettrait d'interagir avec des protéines de la paroi, où elle est d'ailleurs localisée dans la cellule, et ainsi jouer un rôle de prévention des dégâts mécaniques de la paroi causé par un stress hydrique (Yang *et al.,* 2013). Rappelons que les déhydrines appartiennent au deuxième groupe le plus vaste des protéines de la famille des LEA (**L**ate **E**mbryogenesis **A**bundant), connues comme étant impliquées dans la tolérance à la déshydratation cellulaire (Hundertmark & Hincha, 2008). Antérieurement, de nombreuses études ont rapporté que le groupe des protéines déhydrine serait également en charge de la tolérance à la sécheresse en protégeant les membranes plasmiques de processus de dénaturation (Vicré *et al.,* 2004), ainsi qu'en assurant le maintien de l'intégrité de la paroi cellulaire (Layton *et al.,* 2010). Dans cette étude, l'analyse du promoteur de ce gène a également révélé la présence d'un bon nombre d'éléments en *cis* impliqués dans la réponse à la sécheresse, notamment de boîtes ABRE, des motifs référencés dans le logiciel PlantPAN comme "ABRE like" (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2000) et "ABRELATERD1" (Simpson *et al.,* 2003), et également des éléments de réponse MYC (Abe *et al.,* 1997). Si nous constatons que les RR-B *via* le récepteur HK1 ne sont pas responsables de la régulation de la transcription de ce gène, sa régulation tardive pourrait être expliquée par le recrutement de FT impliqués dans la voie dépendante de l'ABA ou par d'autres FT en amont de la voie ABA.

Concernant *HK1*, la multitude d'éléments en *cis* considérés comme étant les sites de liaison pour les RR-B retrouvés dans sa séquence promotrice peut provenir également du fait que son homologue chez *Arabidopsis AHK1* fait partie des gènes les plus régulés par les CK chez *Arabidopsis* (Brenner *et al.,* 2012), et que sous l'impact de ce signal, les RR-B participeraient en tant qu'effecteurs à sa régulation. Cependant, concernant le stress osmotique aucune information n'existe. Sa régulation extrêmement précoce est en faveur d'une possible régulation par les RR-B et ce gène pourrait donc être un gène de réponse primaire au stress hydrique. Par ailleurs, seulement quelques séquences *cis* 5' ACGT 3' ont été retrouvées. Compte tenu de l'absence de régulation d'*AHK1* par l'ABA (Urao *et al.,* 1999; Tran *et al.,* 2007), l'accumulation rapide de ses transcrits suite à un stress hydrique et le faible nombre de boîtes ABRE observé, indique qu'*HK1* ne semble pas être régulé par la voie "ABA dépendante".

Discussion

Caractérisation du mode de fonctionnement de régulateurs de réponse de type-B

I. Quels avantages apporte la forme dimere constitutif aux RR-B de plantes ?

Du point de vue de l'évolution, l'existence potentielle des RR-B sous une forme dimérique permanente, démontrée dans le chapitre I de cette partie, prend du sens lorsque cet évènement confère des avantages quant à l'efficacité du système pour la transmission d'un signal, capitale pour la survie de la cellule. En effet, si les effets provoqués par un signal, quel qu'il soit, ne sont pas contrebalancés rapidement, ils peuvent causer des dommages irrémédiables à l'échelle de la cellule, du tissu et plus largement de la plante.

Les RR-B exercent leur fonction à la fin de cette cascade de signalisation du "phosphorelais multiple", dans laquelle interviennent différents intermédiaires de transmission du signal. Une fois le signal perçu, la transduction du signal doit être rapide et efficace, et les RR-B doivent être disponibles afin d'initier la réponse adéquate. L'état dimérique des RR-B apparaît comme une caractéristique nécessaire à leur fonctionnement, pour plusieurs raisons développées ci-dessous.

- Une des façons d'éviter la perte de temps qu'impliquerait la recherche d'un partenaire phosphorylé, est l'état dimérique préalable des RR-B, qui pourrait leur permettre d'agir instantanément après leur phosphorylation par l'HPt.

En ce qui concerne la sensibilité qui détermine l'efficacité de la réponse, cette formation "dimère constitutif" de deux protéines RR-B ne requiert qu'un seul évènement de phosphorylation pour basculer dans un état actif de la protéine selon notre hypothèse. Il s'agit véritablement d'un phénomène coopératif décrit par le modèle de Monod-Wyman-Changeux (Monod *et al.*, 1963) ou "allostérie entre deux sous-unités dépendantes l'une de l'autre" dans lequel le basculement de l'ensemble dans la conformation "active" s'opère dès la première phosphorylation sur l'une ou l'autre des sous-unités. Cependant, l'éventualité d'une deuxième phosphorylation peut contribuer à préserver le système d'une inactivation par hydrolyse spontanée par exemple, lorsqu'il doit être maintenu.

Dans le même contexte, à savoir une réponse à mettre en place urgemment, on comprend que l'état dimérique de la protéine navette HPt ne présente que peu d'intérêt biologique lors de la transmission du signal, voire même des inconvénients. Les caractéristiques énumérées par la suite portent des arguments en faveur d'un état monomérique de l'HPt : i) compte tenu de la distance probable entre les deux domaines RD d'un même récepteur HK dimérique, le potentiel dimère d'HPt ne peut interagir qu'avec un seul RD. Ainsi, un dimère ne possèderait au final qu'un seul groupement phosphate, autrement dit quatre protéines seraient donc nécessaires pour récupérer les deux

groupements phosphates disponibles suite à l'autophosphorylation du récepteur HK, ii) étant donné, leur rôle dans la transmission du phosphate qui doit s'effectuer rapidement entre ces deux partenaires HK et RR, l'avantage de la forme monomérique en terme de diffusion *via* les pores nucléaires apparaît évident, iii) s'il s'agit bien d'un mécanisme allostérique qui fait basculer le RR dimérique dans sa forme active à la suite de l'évènement phosphorylation, quel serait le bénéfice à ce que deux protéines transmettent un seul groupement phosphate ? Notons cependant que la dimérisation dans un système hétérologue (Dortay *et al.*, 2006) et *in planta* des HPt (Punwani *et al.*, 2010) a été observée, indépendamment de l'état de phosphorylation. L'analyse structurale d'Ypd1p (faite pour cette étude, données non montrées), HPt chez la levure, permet d'identifier un dimère cristallographique symétrique dans lequel l'interaction est localisée en partie N-terminale, ce qui est en accord avec des résultats de Punwani et ses collaborateurs (2010). Toutefois, étant donné que le site d'interaction avec l'HK ou les RR, et le résidu histidine phosphorylé (H64) se localisent au même niveau que cette interface potentielle d'interaction HPt/HPt, ce qui rend par ailleurs le résidu phosphorylable peu accessible, il pourrait s'agir d'un état possible pour les HPt inactives (en attente). Dans ce cas, l'interaction est la résultante de neuf ponts salins et neuf ponts hydrogène (donc interaction labile). L'existence de la structure du complexe Sln1p/Ypd1p (Xu *et al.*, 2003) montre d'une part, que c'est une HPt en état monomérique qui a été cristallisée (Waldburger, 2003) et d'autre part, que l'interaction entre l'HPt et le RD de Sln1p est plus stable que la précédente.

Ainsi, dans un tel système où l'HPt activée est un monomère, la transmission du signal de l'HK au RR devient efficace avec une diffusion plus rapide dans le noyau et un nombre maitrisé de molécules réquisitionnées pour acheminer le signal.

- Outre les bénéfices tirés de cet état dimérique concernant l'efficacité d'activation des RR-B, un point fondamental réside dans la capacité du domaine receveur siège de la dimérisation, à réguler en absence de signal l'activité effectrice, à savoir réprimer la fixation du domaine GARP sur les éléments de reconnaissance situés dans la zone promotrice des gènes de réponse. En effet, toute activation chaotique des complexes transcriptionnels n'est pas souhaitable pour tout organisme quel qu'il soit, comme cela est d'ailleurs illustré lors de l'utilisation des RR-B dépourvus de ce domaine régulateur où une expression constitutive des gènes rapporteurs dans les expériences d'expression transitoire est observée (Sakai *et al.*, 2001; Imamura *et al.*, 2003; Tajima *et al.*, 2004; Ginis *et al.*, 2012; Liang *et al.*, 2012). Ainsi, la dimérisation constitutive des RR-B, couplée à l'évènement phosphorylation quand le système nécessite une réponse face à un signal donné apparaissent comme un double contrôle qui empêche une activation erronée de ces protéines. D'un autre côté, le fait qu'un unique événement de phosphorylation suffise aux RR-B pour passer en conformation "active" peut paraître minime, suggérant ainsi l'existence d'autres mécanismes de régulation de cette activation. Parmi eux,

l'intervention éventuelle de protéines phosphatases peut être envisagée pour atténuer le signal voire l'éteindre, qui de façon identique aux systèmes bactériens, préviennent des activations indésirables et permettent de conserver une spécificité du signal transmis. Plusieurs propositions de régulation par des protéines peuvent être avancées : i) les HPt effectuant le lien entre le RD du récepteur et le RD des RR-B, peuvent tout aussi bien hypothétiquement permettre le transfert de phosphate des RR aux HK ou du moins récupérer le groupement phosphate des RR-B comme réalisé au niveau des HK, ii) les RR de type-A et –C se révèlent être de possibles compétiteurs (Kiba *et al.*, 2004; To *et al.*, 2007) au niveau des HPt pour récupérer le groupement phosphate.

- L'analyse du fonctionnement de quelques autres FT, montre que la dimérisation est une caractéristique commune de nombreux FT. La plupart des protéines MYB (R2R3-MYB et MYB3R) impliquent une dimérisation de deux hélices, responsables de la reconnaissance des motifs ADN, et intimement liées ensemble (Sakura *et al.*, 1989). Dans les systèmes bactériens, la plupart des RR appartenant à la famille OmpR/PhoB, utilisent la dimérisation de leur domaine receveur, REC, afin de rapprocher les DBD suffisamment près l'un de l'autre pour qu'ils puissent se fixer sur leur élément de reconnaissance organisé en deux motifs répétés (Gao & Stock, 2009). De plus, chez les plantes, les protéines bZIP, se fixent sur leur motif de reconnaissance et forment des "Leucines Zippers" au cours d'une dimérisation forcée par l'existence de boîtes en tandem (Jakoby *et al.*, 2002). Concernant les RR-B, aucune étude ne s'est intéressée à la nécessité de ces FT d'être en dimère pour pouvoir se fixer à leurs éléments en *cis*. Cependant, les résultats dégagés de deux études réalisées chez *Arabidopsis* abordées précédemment, nous permettent de ne pas écarter cette hypothèse. D'une part, la nécessité de la présence de motifs de reconnaissance des RR-B répétés a été relevée dans ces deux études (Zürcher *et al.*, 2013; Ramireddy *et al.*, 2013). Ramireddy et ses collaborateurs (2013) ont conclu à l'occupation des deux motifs ECRM impliqués dans l'activation du promoteur d'un gène RR-A, par deux RR-B différents en état monomérique. Cependant, il est tout à fait envisageable de suggérer que la mise en place des RR-B au niveau du complexe transcriptionnel nécessite l'intervention de RR-B de natures différentes, mais chacun organisé en dimère. D'autre part, la nécessité d'un espacement de 11 pb entre les motifs (Zürcher *et al.*, 2013; Ramireddy *et al.*, 2013), ce qui correspond à un tour d'hélice de l'ADN, est une distance franchissable pour deux domaines GARP d'un même RR, grâce au déploiement de la séquence charnière. Ainsi, la présence du dimère RR-B permettrait de maintenir à proximité les domaines GARP (notion de guidage dans l'interaction).

II. COMMENT INTERVIENNENT LES RR-B DE PEUPLIER DANS LA VOIE DE SIGNALISATION DE LA CONTRAINTE OSMOTIQUE ?

Chez les plantes, le nombre d'isoformes de RR-B est intéressant, et suggère des nuances possibles de spécificités. Chez *Populus,* l'existence de 11 protéines a été révélée *in silico* (Ramirez-Carvajal *et al.,* 2008). Cette spécificité pourrait provenir d'autres éléments. En effet, sur la base de comparaison de séquences chez le génotype Dorskamp, trois groupes se distinguent parmi les neuf membres isolés de cette famille (ARTICLE III, FIGURE 1 & FIGURE 18). L'élément discriminant qui semble émaner de ces différences est la partie C-terminale prédite comme étant polymorphe et non structurée entre RR-B. Ces caractéristiques font d'elle, une anse possible de recrutement de différents partenaires, supposés interagir en *cis* dans un complexe polymérase de transcription. Cette hypothèse permettrait en partie d'expliquer, malgré leur forte similitude de séquences protéiques globales, les différences observées entre RR-B quant à leur capacité d'activer avec plus ou moins d'amplitude tel ou tel gène de réponse (Hwang & Sheen, 2001; Heyl *et al.,* 2008; Müller & Sheen, 2008; Zürcher *et al.,* 2013). Une étude illustre précisément ce phénomène. En effet, Choi et ses collaborateurs (2010) ont conclu à la formation d'un complexe de transcription d'un gène *Pr1*, impliqué dans la réponse immunitaire des plantes et régulé également par les CK, qui nécessite les fixations de deux FT, l'ARR2 et TGA3 sur leurs motifs de reconnaissance respectif, maintenus ensemble majoritairement par leur interaction *via* la partie C-terminale du RR-B.

Le travail de cette PARTIE II nous a amené à nous poser une question fondamentale, quant au fonctionnement des RR-B au sein de la voie de transduction de la contrainte osmotique : "comment les RR-B, protagonistes qui apparaissent généralistes des systèmes de phosphorelais multiple, modulent-ils la spécificité de la réponse face à un signal donné, notamment la contrainte osmotique ? " Plusieurs hypothèses se dégagent.

- La première, précédemment abordée, se réfère à une spécificité de séquences des motifs reconnus par ces FT. L'exploration d'une spécificité de motif potentiellement impliqués dans la réponse face à une contrainte hydrique, pouvant porter sur la nature des résidus dans l'environnement de la séquence cœur reconnue ou sur la distance de la localisation de la boîte par rapport au site d'initiation de la transcription, pourrait permettre de dégager des différences intéressantes entre RR-B. Des disparités ont été observées quant aux préférences de fixation des RR-B sur certaines boîtes ECRM, localisées à des distances différentes du site d'initiation de la transcription dans le promoteur d'un RR-A (Ramireddy *et al.,* 2013).

- La deuxième émerge du constat de la première hypothèse. En effet, si aucune spécificité n'est liée à la nature des motifs de reconnaissance dans les gènes de réponse à la contrainte osmotique et que finalement ces séquences *en cis*, d'abord présentées comme les éléments de réponse aux CK, sont relativement identiques et non spécifiques d'un signal donné, alors cette spécificité de réponse passe par d'autres événements. Le recrutement de partenaires spécifiques, comme d'autres FT impliqués dans cette voie de signalisation "osmosensing" peut permettre, et ce, même si les RR-B sont fixés aux mêmes motifs de reconnaissance que les gènes de réponses aux CK, d'activer ou de réprimer la transcription de gènes de réponse à la contrainte hydrique. L'aspect combinatoire correspond alors à l'élaboration de la spécificité de la réponse.

- La troisième est basée sur l'étude de Veerabagu et ses collaborateurs (2012), qui ont mis en évidence la participation de l'ARR18 dans un complexe transcriptionnel de gènes de réponse à la contrainte osmotique *via* l'activation supposée d'AHK1 au préalable, non pas par la fixation de ce RR-B sur ces boîtes de reconnaissance mais par interaction, au niveau de son RD, avec des hétérodimères de FT bZIP. Les auteurs n'auraient retrouvés aucun motif de reconnaissance des RR-B en amont de ces gènes de réponse, malgré la faible taille et la fréquence non négligeable de ceux-ci. Ainsi, les motifs définis comme CRM seraient effectivement des motifs ADN spécifiques des réponses CK, et lors d'une contrainte hydrique, les RR-B participeraient au complexe de transcription uniquement comme protéine répresseur ou activateur d'autres FT, eux, fixés sur leurs boîtes. La plasticité de l'ADN permet toutefois d'envisager des fixations spécifiques à plusieurs milliers de paires de bases sur leurs éléments de réponse et la participation à de tels complexes ("enhancers/silencers").

III. Quel est le mécanisme de fonctionnement d'un RR-B de la réception de son phosphate à sa fixation sur l'ADN ?

L'ensemble des travaux réalisés par la présente étude, a suggéré l'existence d'un modèle de fonctionnement d'un RR-B. Certaines étapes ont été validées *in vitro* ou *in vivo* et d'autres sont avancées sur la base d'analyses structurales de la modélisation et seront validées en systèmes vivants ultérieurement.

Les HPt, en forme monomérique, feraient la "navette" entre le récepteur HK membranaire et les RR-B localisés dans le noyau de la cellule. Une fois le transfert du groupement phosphate provenant de l'HK effectué, elle transmettrait celui-ci aux RR-B, organisés en dimères constitutifs

dans lesquels, rappelons-le, le domaine RD (ou DDK) inhibe le domaine DBD (ou GARP) par interaction directe (FIGURE 56, A). Le phosphate serait ainsi transféré du résidu histidine (H80) de l'HPt à l'un des résidus aspartate (D69) de l'une des sous-unités RR-B constituant le dimère. Finalement, sur le dimère de DDK se dégagent trois interfaces protéine-protéine différentes et spécifiques au rôle désormais établi : i) une surface de dimérisation α4-ß5-α5, ii) une surface d'interaction GARP/DDK, iii) une surface de réception du phosphate. Par la suite, l'événement de la phosphorylation, considéré comme déclencheur, se répercuterait *via* la modification progressive du réseau de liaisons faibles (changement conformationnel), au sein du dimère DDK. Basé sur l'analyse structurale de la modélisation, un modèle conceptuel peut être avancé dans lequel un mécanisme lié au mouvement d'une hélice serait à l'origine de la levée d'inhibition du domaine DDK sur le domaine GARP. Sur le modèle, deux résidus clés, les résidus lysine 135 et glutamate 129 localisés à l'extrémité de l'hélice 5 (FIGURE 43), formeraient un pont salin et seraient reliés au GARP indirectement *via* un réseau de liaisons faibles en absence de phosphorylation, forçant cette hélice à rester "débobinée" d'un tour. La phosphorylation provoquerait la ré-organisation de la répartition des charges, qui induirait un mouvement qualifié de "mouvement de ressort" de l'hélice, provoquant son rembobinage et le relargage du domaine GARP de façon simultanée. Ainsi, l'hélice disposerait de l'espace nouvellement disponible grâce à la levée de l'interaction avec le domaine GARP. Une fois libéré, le domaine GARP dont l'affinité pour l'ADN est plus grande que pour son inhibiteur ainsi modifié, irait se fixer à ses éléments de reconnaissance en amont des gènes cibles grâce à sa séquence charnière. Une fois fixé, son anse de recrutement localisée en partie C-terminale permettrait de mettre à proximité des facteurs ou protéines impliqués dans la régulation de gènes de réponse face à une contrainte et participer au démarrage du complexe de la transcription (FIGURE 56, B).

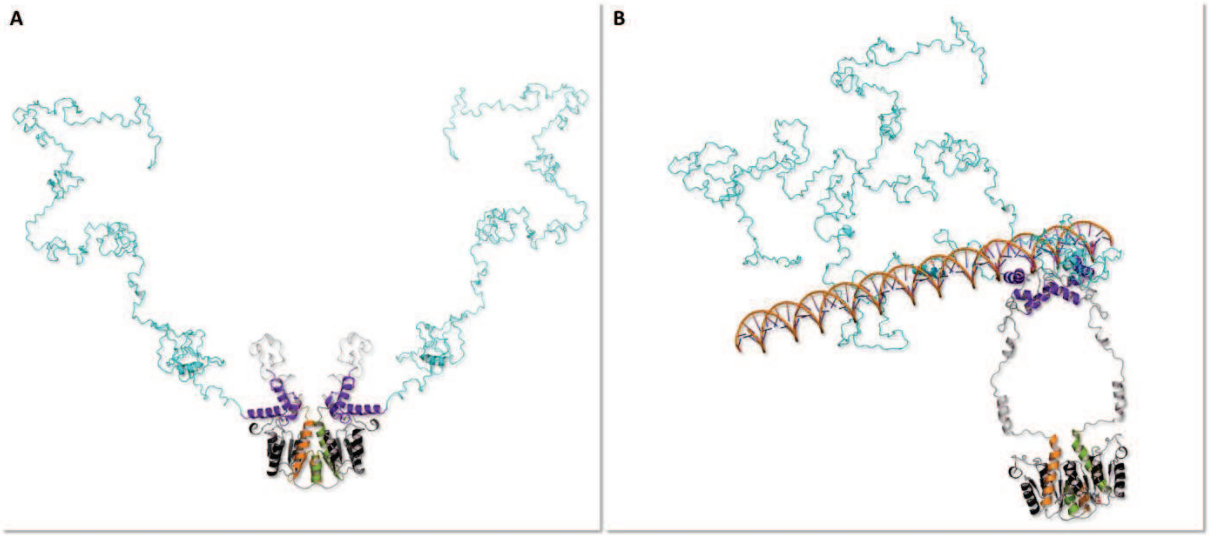


FIGURE 56 – Modèle en 3D de la structure d'un RR de type-B

Les présentations schématiques en rubans des structures 3D de la protéine RR13 en absence de signal de

phosphorylation (A) adoptant une configuration dite "fermée" et après la phosphorylation (B) en configuration dite "ouverte", à la suite du transfert de phosphate par l'HPt. Les vues montrent les orientations relatives des domaines receveur ou DDK (en noir, orange et vert), GARP (violet) et la séquence de la partie C-terminale (bleu) impliquée dans le recrutement de partenaires. L'image de cette figure a été générée avec PyMOL (DeLano & Bromberg, 2004).

Conclusions et Perspectives

Au cours de ce travail, dans un premier temps nous avons caractérisé les partenaires de HK1 dans la transduction du signal de la "contrainte osmotique" chez le peuplier par étude d'interactions entre le récepteur HK1 et les 10 protéines HPt, ainsi qu'entre trois de ces protéines et neuf RR de type-B. Ces résultats ont fait l'objet de trois articles.

- Concernant HK1 et les HPt, nous avons ainsi montré :
  - Une localisation de HK1 au niveau de la membrane plasmique
  - Une activité histidine kinase et une dimérisation de HK1
  - Un rôle d'osmosenseur de HK1
  - Un partenariat d'interactions préférentielles entre HK1 et HPt2, 7 et 9, corroboré par la co-expression de leurs transcrits
  - Une validation *in planta* de la dimérisation de HK1 et de ses interactions préférentielles avec ces trois HPt

- Concernant ces trois HPt et les RR-B, nous avons montré :
  - Un isolement de neuf RR de type-B dans le génotype Dorskamp
  - Un partenariat d'interactions préférentielles avec les RR12, 13, 14, 16 et 19 corroboré par la co-expression de leurs transcrits
  - Une interaction avec le RR18 et une régulation tardive du gène codant ce RR au cours d'une contrainte osmotique conduisant à considérer ce RR dans la voie de signalisation
  - Une régulation du gène codant le RR13 par une contrainte osmotique

Dans un deuxième temps, la caractérisation du mode de fonctionnement des RR-B a été conduite par la mise en évidence de mécanismes de régulation de la protéine RR13 et la possible implication de ce RR et celle du RR18 dans la voie de signalisation de la contrainte osmotique. Nous avons ainsi montré :

- La fonction de facteur de transcription du RR13
- Les surfaces d'interaction DDK/DDK et DDK/GARP du RR13 grâce à la modélisation et l'analyse structurale
- La dimérisation du domaine DDK du RR13 en levure et *in planta*
- L'identification des résidus impliqués dans cette dimérisation et la validation de leur rôle en levure et *in planta*
- La fixation du domaine GARP au domaine DDK et identification des résidus impliqués dans cette interaction

- La fixation du domaine GARP sur les boîtes de reconnaissance ADN des RR-B

La suite immédiate consistera à valider *in planta,* dans un système d'expression transitoire, le mode de fonctionnement avancé du facteur de transcription RR13. D'ailleurs, plusieurs constructions sont d'ores et déjà disponibles.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats amène à un certain nombre de considérations à prendre en compte pour des études futures, pour comprendre le fonctionnement de cette voie de transduction dans sa globalité.

I. DÉTECTION DU SIGNAL PROVOQUÉ PAR UN MANQUE D'EAU CELLULAIRE PAR LES HK

Au cours de sa vie, la cellule est soumise à de nombreux *stimuli* susceptibles d'induire des changements de son état physiologique. Des mécanismes de signalisation cellulaire pour détecter et répondre efficacement à un signal donné ont été développés au cours de l'évolution. Pour discriminer ces signaux et mettre en place une réponse adaptée, les cellules disposent de mécanismes de détection suffisamment sensibles et spécifiques. La probable implication d'un phosphorelais multiple dans la détection de la contrainte hydrique contrôlé par un récepteur HK devient évidente chez les plantes. Le rôle de ces HK est de détecter un *stimulus* et de le relayer sous la forme d'un signal (phosphate) à ses partenaires HPt. Ces dernières le transmettent, à leur tour, aux RR afin qu'ils puissent induire la mise en place d'une réponse appropriée.

Cependant, les modes de détection de cette contrainte sont encore relativement méconnus. On comprend qu'ils doivent certainement mettre en jeu un ensemble de critères pointés par certaines études notamment dans le cas de Sln1p (osmosenseur chez la levure) et sont à relier : i) à l'impact au niveau cellulaire de la contrainte en tant que telle (Tao *et al.,* 1999; Reiser *et al.,* 2003), ii) à la fonction putative des domaines protéiques de l'HK, iii) à la présence de radeaux lipidiques au niveau de la membrane cellulaire (Simon-Plas *et al.,* 2011; Tanigawa *et al.,* 2012).

I.1 Quels sont les éléments structuraux des HK qui pourraient être impliqués dans la perception de la contrainte osmotique ?

En se plaçant à l'échelle de la plante, une diminution de la disponibilité en eau du sol provoque au niveau cellulaire une perte d'eau qui entraine une modification de l'état de turgescence, suivie d'une diminution du volume cellulaire et de la paroi (Verslues *et al.,* 2006). De

plus, l'intégrité de cette dernière peut être également touchée par ce type de stress. Des modifications de son extensibilité s'avèrent être des réponses communes des plantes face à une contrainte hydrique, comme notamment une rigidification de la paroi au niveau des organes dans lesquels la croissance est stoppée, ce qui implique la mise en place de nombreux mécanismes pour un remaniement complet de sa structure (Moore *et al.*, 2008). Lors d'une contrainte hydrique, l'un des stress majeurs que la plante doit surmonter, afin de survivre, est un stress mécanique provoqué par la perte d'eau au niveau des cellules (Iljin *et al.*, 1957).

Dans ce contexte, on peut supposer qu'HK1 est un mécano-senseur. L'analyse de sa séquence protéique a permis de mettre en évidence la présence d'**un domaine appelé CACHE** (**CA**$^{2+}$ channels & **CHE**motaxis receptors). Ainsi, le récepteur HK1, supposé renseigner la cellule sur son milieu, traverse la membrane plasmique et relaye une information détectée à partir de son domaine receveur auquel prend part le domaine CACHE. Ce dernier pourrait s'ancrer constitutivement dans la paroi cellulaire, possiblement au niveau de sucres sulfatés par des ponts faisant intervenir le calcium, par exemple. Ainsi, la position statique de HK1 imposée par sa région transmembranaire et son ancrage dans la paroi permettrait une perception mécanique du signal. En effet, lors d'une contrainte hydrique, les mouvements entre la membrane plasmique et la paroi générés par la perte d'eau ("changements de pression") pourraient être perçus par HK1, qui subirait hypothétiquement un étirement.
De plus, le remaniement de la paroi cellulaire pourrait également jouer un rôle dans la détection du stress osmotique. Ce lien étroit entre l'activation de la voie face à une contrainte osmotique et de la voie permettant d'assurer le maintien de l'intégrité pariétale est d'ailleurs illustré par le récepteur Sln1p, capable d'activer ces deux voies parallèles (Fassler & West, 2011, FIGURE 8). Sln1p serait capable de détecter indirectement l'absence de certaines protéines comme la mannoprotéine Ccw12 constitutive de la paroi et fixée dans la membrane plasmique au niveau d'une ancre GPI, et ainsi activer la voie Sln1p-Ypd1p-Skn7p ayant un rôle dans la protection de la paroi (Shankarnarayan *et al.*, 2008).

La présence **d'un domaine HAMP** retrouvé chez HK1, domaine principalement étudié dans les HK des systèmes bactériens, pourrait être un modulateur responsable de la transmission du signal du domaine extracellulaire au domaine effecteur de la réponse intracellulaire (Ferris *et al.*, 2011). Il correspond à deux hélices enchevêtrées l'une sur l'autre, appelées motif "coiled-coil", qui par un mouvement de torsion ou de piston répercute le mouvement aux domaines DHp et CA de l'HK (Diensthuber *et al.*, 2013). Ainsi, cet élément aurait un rôle purement mécanique au sein de la protéine tel un lien tendu entre deux points fixes localisés l'un dans la paroi, et l'autre dans la

membrane, permettant à la protéine d'adopter deux états conformationnels limites en fonction de la présence du signal déclencheur.

Ainsi, afin de pouvoir apporter des éléments de réponse quant à la perception de la contrainte osmotique par HK1, il serait pertinent d'étudier le rôle des domaines CACHE et HAMP. A terme, nous pouvons envisager d'étudier en solution par diffusion des rayons X aux petits angles et/ou par cristallographie, la structure en 3D de la protéine HK1 (Diensthuber *et al.,* 2013) en présence ou absence de signal *via* l'utilisation notamment de fluorure de Béryllium (mimant la phosphorylation). L'accès à des changements conformationnels permettrait de détailler les séquences d'évènements et pourrait amener des éléments de réponse quant à l'implication du domaine HAMP notamment lors de la transduction du signal.

I.2 La contrainte osmotique provoquerait-elle une phosphorylation de HK1?

Une des questions fondamentales, qui provient du constat réalisé par comparaison du système de transduction de la contrainte osmotique chez la levure et celui du signal CK chez les plantes, porte sur l'état de phosphorylation du récepteur HK1 lors du stress. Pour le moment, nous ne détenons aucune preuve expérimentale, pourtant nécessaire pour comprendre le fonctionnement de la voie et l'impact du phosphate sur les interactions entre partenaires. Cependant, le travail présenté ici et d'autres études concernant le dernier partenaire de cette voie, à savoir les RR-B, ont montré la nécessité de la phosphorylation de ces protéines pour que leur fonction de facteur ou de modulateur de la transcription soit assurée (Choi *et al.,* 2010; Veerabagu, 2011).

Afin d'éclaircir ce point, la réalisation d'études de phospho-protéomique est potentiellement envisageable, en prenant tout de même en compte la nature labile de la phosphorylation des résidus histidine et aspartate.

I.3 Sous quel état, dimérique ou monomérique, le récepteur percevrait-il le signal ?

A l'origine de ce relais de phosphate, HK1 doit être sous forme homodimérique lors du stress afin de réaliser son autophosphorylation. Cependant, on peut s'interroger quant à l'état monomérique ou dimérique de HK1 avant la détection de la contrainte. Ce qui est sûr, c'est le fait que les HK récepteurs du signal CK, AHK2 et AHK3 sont capables de dimériser *in planta* en l'absence de signal (Caesar *et al.,* 2011; Wulfetange *et al.,* 2011). Dans notre étude, nous n'avons pas pu

mettre en évidence la formation de dimère de la protéine complète et l'absence de ce résultat, nous permet d'envisager deux possibilités.

- La première possibilité est que HK1 pourrait être à l'état de monomère en absence de contrainte, possiblement, localisé dans des radeaux lipidiques comme pour Sln1p. Ces radeaux lipidiques ou domaines membranaires résultent d'un enrichissement localisé dans la membrane de lipides comme les stérols et sphingolipides (Simon-Plas *et al.*, 2011). Sln1p serait, indifféremment à l'application de contrainte osmotique, associé à des radeaux lipidiques qui maintiendraient son état dimérique en absence de contrainte, et ces complexes lipides/protéines seraient dissociés *via* l'impact de la contrainte forçant l'autophosphorylation de Sln1p à ne plus avoir lieu (Tanigawa *et al.*, 2012). Ainsi, sous la contrainte osmotique et avec l'augmentation de la fluidité membranaire, les mouvements des lipides permettraient, d'augmenter les probabilités de rencontre de deux sous-unités HK1, qui une fois assemblées assureraient leur autophosphorylation. Cette éventualité pourrait expliquer l'absence de signal BiFC, puisque la formation du complexe nécessiterait la présence d'une contrainte pour visualiser le dimère. Ce point désormais envisageable est à prendre en compte pour la réitération prochaine de ces expériences.

- La deuxième possibilité est que HK1 soit un dimère constitutif, comme le sont AHK2 et AHK3, ce qui peut être envisagé de par la présence de plusieurs motifs "coiled-coil". De plus, l'ancrage probable de chaque sous-unité du dimère potentiel *via* son domaine CACHE dans la paroi suggère une mobilité latérale limitée. En ce sens, ce serait la présence de certaines protéines ou les lipides eux-mêmes contenus dans les radeaux qui permettraient une fois le signal reçu de bloquer la conformation dimérique active afin d'accomplir sa propre phosphorylation. D'ailleurs, l'exemple de la protéine Ccw12 ou plutôt du lipide membranaire relié à cette protéine (GPI) pourrait faire partie du complexe lipides/protéines qui bloque la conformation dite "non active" de Sln1p, lors de son absence entre autre, l'autre conformation dite "active" serait majoritaire. Dans ce cas, l'absence de signal détecté lors de notre étude d'interaction proviendrait bien d'un problème technique, lié à l'impossibilité de reconstitution de la protéine fluorescente complète comme annoncé par Grefen et ses collaborateurs (2008) concernant la dimérisation des récepteurs à l'éthylène.

En conséquence une étude de la localisation fine de HK1 au niveau des membranes et de l'impact de la contrainte sur sa localisation membranaire est un point important à éclaircir.

II. SPÉCIFICITÉ DES RELAIS DE PHOSPHATE ENTRE PARTENAIRES DANS LA MISE EN PLACE D'UNE RÉPONSE APPROPRIÉE

Les voies de signalisation impliquant un phosphorelais multiple présentent de grandes similarités notamment au niveau de la structure et de la fonction des partenaires, qui perçoivent et répondent toutefois de façon spécifique à des signaux de natures différentes (éthylène, CK, contrainte osmotique…). Cette spécificité est assurée par l'existence de différents points de contrôle qui surviennent à plusieurs niveaux dans la voie :

- La spécificité dans la perception du signal *via* une HK recrutée qui est spécialisée dans la détection du signal par fixation d'un ligand ou d'une contrainte mécanique comme vu précédemment
- La spécificité d'interaction entre partenaires
- La spécificité de réponse *via* l'activation ou la répression des gènes de réponse

II.1 Existe-t-il des différences d'affinité entre ces différents partenaires ?

Nous avons pu montrer au cours de nos travaux qu'il semblerait effectivement qu'il y ait une spécificité d'interaction entre le récepteur et les HPt, ainsi qu'entre les HPt et les RR-B.

Cependant, seules des études d'affinité (à l'équilibre thermodynamique) nous permettront de trancher sur ces spécificités. Une approche envisageable est de déterminer ces affinités par la technique d'anisotropie de fluorescence permettant de mesurer l'affinité entre deux partenaires.

Ceci dit, *in situ*, l'éventualité de rencontre et l'affinité des interactions sont modulées par des différences spatio-temporelles de l'expression des protéines partenaires, qui par ailleurs, peuvent être combinées à des régulations possibles face à une contrainte. Au sein de notre étude, des analyses d'expression transcriptionnelles ont été réalisées, ce qui nous a donné des premiers éléments de réponse, quant à l'éventuelle présence de ces protéines.

Cependant, disposer de données d'expression au niveau protéique offrirait des informations considérables pour comprendre les réseaux d'interaction entre protéines dans un tissu ou organe donné, face à une contrainte, à un temps donné. Idéalement, l'utilisation d'anticorps spécifiques des protéines interactantes nous permettrait de comparer leurs profils d'expression spatio-temporelle à partir de matériel végétal soumis à une contrainte osmotique ou non. Cependant, les hautes similitudes de séquences entre membres d'une même famille comme les HPt ou les RR rendent la tâche difficile et incertaine.

Enfin, les systèmes de régulation de cette voie de transduction *via* la déphosphorylation spontanée ou active, ou la dégradation des protéines par des protéasomes jouent un rôle primordial dans les subtilités qui régissent ces réseaux d'interactions protéiques. En ce sens, les RR-A isolés chez le peuplier génotype Dorskamp, pourraient agir directement sur la voie par compétition avec les RR-B vis-à-vis des HPt et moduler ainsi la réponse cellulaire.

En conséquence, l'étude de ces interactions *in vivo* ainsi que l'échange de phosphate pourrait être mis en évidence et correspond à un objectif envisageable à court terme.

II.2 Comment la spécificité de réponse est modulée par les RR de type-B ?

Les derniers protagonistes de cette voie, les RR de type-B, interviennent à un point stratégique de la voie c'est-à-dire entre la détection/transduction du signal, et la mise en place effective de réponses géniques. Ils représentent à eux seuls le dernier point de contrôle et doivent donc permettre une réponse précise et spécifique au signal perçu. Bien que nous ayons pu dégager un mode de fonctionnement potentiel d'un RR-B dans lequel la phosphorylation et la dimérisation sont des étapes clés dans la régulation de son activité, ce mode de fonctionnement apparaît être généraliste et applicable à la plupart des RR-B indifféremment du signal reçu.

La résolution de la structure d'une protéine RR-B par cristallographie, nous permettrait de confirmer ce mode général de fonctionnement.

De plus, les phénomènes d'interconnexion des voies peuvent également faire de ces RR-B des éléments intégrateurs potentiels de plusieurs signaux. Les RR-B peuvent moduler leur spécificité de réponse *via* leur fixation sur leur élément de réponse ADN dans un environnement défini et/ou dans leur capacité à participer à des complexes transcriptionnels. La combinatoire liée à la présence ou l'absence de l'ensemble de ces facteurs est à l'origine de l'activation ou de la répression de gènes de réponse.

Pour répondre à ces problématiques, après avoir dégagé des gènes de réponse régulés directement par les RR-B et impliqués dans la réponse à la contrainte hydrique, l'analyse précise de l'activité de leurs promoteurs (par expression transitoire *in planta*) nous permettrait dans un premier temps, de cibler des zones promotrices contenant les boîtes d'intérêt. Dans un deuxième temps, des séquences particulières impliquées dans leur activation pourraient être dégagées si elles existent. De plus, la comparaison de ces séquences de reconnaissance entre RR-B nous permettrait de pointer du doigt les éventuelles raisons de différences de comportements observées entre eux. Enfin, une analyse ciblée des partenaires recrutés lors de la constitution du complexe transcriptionnel pour

tel ou tel gène, nous amènerait la preuve que la spécificité de réponse passe par une coopération synergétique précise entre facteurs.

Les perspectives de cette problématique font actuellement l'objet d'une thèse qui débute.

III. LIEN ENTRE LA VOIE DU PHOSPHORELAIS MULTIPLE ORCHESTRÉE PAR UN OSMOSENSEUR ET LA VOIE DÉPENDANTE DE L'ABA

Finalement, la place tenue par cette voie potentiellement impliquée dans les réponses face à un déficit hydrique perçu au niveau de HK1 par rapport à celle de la voie de signalisation dépendante de l'ABA reste actuellement énigmatique. En effet, chez *Arabidopsis*, bien que les rôles d'AHK1 dans la détection de la contrainte hydrique par un mécanisme indéterminé et dans la modulation de la sensibilité à l'ABA soient relativement établis (Tran *et al.*, 2007; Wohlbach *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2013), sa probable implication en amont de cette voie dépendante de l'ABA est encore discutée. Les études s'accordent sur la nature de certaines cibles géniques d'AHK1, notamment une augmentation d'expression de gènes impliqués dans les réponses des voies dépendante et indépendante de l'ABA, de biosynthèse de l'ABA et de gènes codant pour des osmoprotecteurs qui vont s'accumuler dans la cellule. Cependant, aucune accumulation directe d'ABA et de solutés osmorégulateurs n'aurait été relevée (Kumar *et al.*, 2013). En partant du principe qu'une voie de réponse orchestrée par un osmosenseur doit pouvoir détecter et mettre en place des réponses cellulaires comme la voie Sln1p-Ypd1p-Ssk1p chez la levure, ces études suggèrent la possible position du phosphorelais multiple parallèle à la voie "ABA dépendante". Des interconnexions des voies sont possibles afin de réaliser en synergie des réponses appropriées à l'échelle de la plante face à cette contrainte. De plus, l'existence d'autres voies confluentes pour la réponse peut être soupçonnée, telle qu'une voie de MAPK cytoplasmique (comme illustré chez la levure) ou une voie dans laquelle une HPt peut interagir avec d'autres protéines ou des RR cytoplasmiques (comme illustré par les protéines CRF dans la voie CK).

Afin de répondre quant à l'existence d'éventuels partenaires autres que les RR-B, j'ai d'ailleurs pu initier durant ma thèse, un criblage de banque de partenaires, approche non ciblée, de la protéine HPt2. Ce travail de longue haleine devrait se poursuivre et pourrait permettre d'ouvrir le champ des possibilités concernant l'existence d'autres voies en relation avec celle de HK1.

Il faut garder à l'esprit que ces voies de signalisation ne sont pas linéaires ou indépendantes, bien au contraire leur complexité réside dans des interconnexions subtiles dans lesquelles de nombreuses protéines interviennent pour mettre en place une réponse spécifique.

Références Bibliographiques

Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D., and Shinozaki, K. (1997). Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought and abscisic acid regulated gene expression. Plant Cell *9*, 1859–1868.

Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. Plant Cell *15*, 63–78.

Alepuz, P.M., Jovanovic, A., Reiser, V., and Ammerer, G. (2001). Stress-induced MAP Kinase Hog1 is part of transcription activation complexes. Molecular Cell *7*, 767–777.

Alonso, J.M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S., and Ecker, J.R. (1999). EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. Science *284*, 2148–2152.

Anantharaman, V., and Aravind, L. (2000). Cache - a signaling domain common to animal Ca^{2+}-channel subunits and a class of prokaryotic chemotaxis receptors. Trends Biochemical Sciences *25*, 535–537.

Appleby, J.L., Parkinson, J.S., and Bourret, R.B. (1996). Signal transduction *via* the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. Cell *86*, 845–848.

Aravind, L., and Ponting, C.P. (1999). The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. FEMS Microbiology Letters *176*, 111–116.

Argyros, R.D., Mathews, D.E., Chiang, Y.-H., Palmer, C.M., Thibault, D.M., Etheridge, N., Argyros, D.A., Mason, M.G., Kieber, J.J., and Schaller, G.E. (2008). Type B response regulators of *Arabidopsis* play key roles in cytokinin signaling and plant development. The Plant Cell Online *20*, 2102 –2116.

Ariel, F., Brault-Hernandez, M., Laffont, C., Huault, E., Brault, M., Plet, J., Moison, M., Blanchet, S., Ichanté, J.L., Chabaud, M., et al. (2012). Two direct targets of cytokinin signaling regulate symbiotic nodulation in *Medicago truncatula*. Plant Cell *24*, 3838–3852.

Asakura, Y., Hagino, T., Ohta, Y., Aoki, K., Yonekura-Sakakibara, K., Deji, A., Yamaya, T., Sugiyama, T., and Sakakibara, H. (2003). Molecular characterization of His-Asp phosphorelay signaling factors in maize leaves: implications of the signal divergence by cytokinin-inducible response regulators in the cytosol and the nuclei. Plant Molecular Biology *52*, 331–341.

Ashenberg, O., and Laub, M.T. (2013). Using analyses of amino acid coevolution to understand protein structure and function. Methods in Enzymology *523*, 191–212.

Baikalov, I., Schröder, I., Kaczor-Grzeskowiak, M., Grzeskowiak, K., Gunsalus, R.P., and Dickerson, R.E. (1996). Structure of the *Escherichia coli* response regulator NarL. Biochemistry *35*, 11053–11061.

Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J., and McCammon, J.A. (2001). Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. PNAS *98*, 10037–10041.

Barbieri, C.M., Wu, T., and Stock, A.M. (2013). Comprehensive analysis of OmpR phosphorylation, dimerization, and DNA binding supports a canonical model for activation. Journal of Molecular Biology *425*, 1612–1626.

Barrero, J.M., Piqueras, P., González-Guzmán, M., Serrano, R., Rodríguez, P.L., Ponce, M.R., and Micol, J.L. (2005). A mutational analysis of the ABA1 gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development. Journal of Experimental Botany *56*, 2071–2083.

Bartels, D., and Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. Critical Reviews in Plant Sciences *24*, 23–58.

Bauer, J., Reiss, K., Veerabagu, M., Heunemann, M., Harter, K., and Stehle, T. (2013). Structure–function analysis of *Arabidopsis thaliana* Histidine Kinase AHK5 bound to its cognate phosphotransfer protein AHP1. Molecular Plant *6*, 959–970.

Belrose, V., Nageleisen, L.M., and Renaud, J.P. (2004). Les conséquences de la canicule et de la sécheresse sur la santé des forêts : bilan à la fin de l'année 2003. Bilan du Département de la santé des forêts, décembre, 16p.

Berrocal-Lobo, M., Molina, A., and Solano, R. (2002). Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. The Plant Journal *29*, 23–32.

Berthelot, A., Bastien, C., Villar, M., Pinon, J., Heois, B., Bourlon, V., and Menard, M. (2005). Le GIS Peuplier, 4 ans après sa création. *Informations Forêt* AFOCEL no. 2, fiche 768, 6p.

Binder, B.M. (2008). The ethylene receptors: Complex perception for a simple gas. Plant Science *175*, 8–17.

Birck, C., Mourey, L., Gouet, P., Fabry, B., Schumacher, J., Rousseau, P., Kahn, D., and Samama, J.-P. (1999). Conformational changes induced by phosphorylation of the FixJ receiver domain. Structure *7*, 1505–1515.

Bisson, M.M.A., and Groth, G. (2010). New insight in ethylene signaling: autokinase activity of ETR1 modulates the interaction of receptors and EIN2. Molecular Plant *3*, 882–889.

Bisson, M.M.A., Bleckmann, A., Allekotte, S., and Groth, G. (2009). EIN2, the central regulator of ethylene signalling, is localized at the ER membrane where it interacts with the ethylene receptor ETR1. Biochemical Journal *424*, 1–6.

Bleecker, A.B., and Kende, H. (2000). ETHYLENE: A gaseous signal molecule in plants. Annual Review of Cell and Developmental Biology *16*, 1–18.

Bonhomme, L., Monclus, R., Vincent, D., Carpin, S., Lomenech, A.-M., Plomion, C., Brignolas, F., and Morabito, D. (2009a). Leaf proteome analysis of eight *Populus* × euramericana genotypes: Genetic variation in drought response and in water-use efficiency involves photosynthesis-related proteins. Proteomics *9*, 4121–4142.

Bonhomme, L., Monclus, R., Vincent, D., Carpin, S., Claverol, S., Lomenech, A.-M., Labas, V., Plomion, C., Brignolas, F., and Morabito, D. (2009b). Genetic variation and drought response in two *Populus* × euramericana genotypes through 2-DE proteomic analysis of leaves from field and glasshouse cultivated plants. Phytochemistry *70*, 988–1002.

Bouchabké, O., Tardieu, F., and Simonneau, T. (2006). Leaf growth and turgor in growing cells of maize (*Zea mays* L.) respond to evaporative demand under moderate irrigation but not in water-saturated soil. Plant, Cell & Environment *29*, 1138–1148.

Bourret, R.B., and Stock, A.M. (2002). Molecular information processing: lessons from bacterial chemotaxis. Journal of Biological Chemistry *277*, 9625–9628.

Boyer, J.S. (1970). Leaf enlargement and metabolic rates in corn, soybean, and sunflower at various leaf water potentials. Plant Physiology *46*, 233–235.

Brandstatter, I., and Kieber, J.J. (1998). Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in *Arabidopsis*. Plant Cell *10*, 1009–1019.

Brandt, B., Brodsky, D.E., Xue, S., Negi, J., Iba, K., Kangasjärvi, J., Ghassemian, M., Stephan, A.B., Hu, H., and Schroeder, J.I. (2012). Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action. PNAS *109*, 10593–10598.

Brenner, W.G., Romanov, G.A., Köllmer, I., Bürkle, L., and Schmülling, T. (2005). Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. The Plant Journal *44*, 314–333.

Brenner, W.G., Ramireddy, E., Heyl, A., and Schmulling, T. (2012). Gene regulation by cytokinin in *Arabidopsis*. Frontiers in Plant Science *3*.

Brignolas, F., Thierry, C., Guerrier, G., and Boudouresque, E. (2000). Compared water deficit response of two *Populus x euramericana* clones, Luisa Avanzo and Dorskamp. Annals of Forest Science *57*, 261–266.

Bürkle, L., Cedzich, A., Döpke, C., Stransky, H., Okumoto, S., Gillissen, B., Kühn, C., and Frommer, W.B. (2003). Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. The Plant Journal *34*, 13–26.

Burley, S.K., and Kamada, K. (2002). Transcription factor complexes. Current Opinion in Structural Biology *12*, 225–230.

Busov, V.B., Brunner, A.M., Meilan, R., Filichkin, S., Ganio, L., Gandhi, S., and Strauss, S.H. (2005). Genetic transformation: a powerful tool for dissection of adaptive traits in trees. New Phytologist *167*, 9–18.

Caesar, K., Thamm, A.M.K., Witthöft, J., Elgass, K., Huppenberger, P., Grefen, C., Horak, J., and Harter, K. (2011). Evidence for the localization of the *Arabidopsis* cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. Journal of Experimental Botany *62*, 5571–5580.

Cai, S.-J., and Inouye, M. (2003). Spontaneous subunit exchange and biochemical evidence for trans-autophosphorylation in a dimer of *Escherichia coli* Histidine Kinase (EnvZ). Journal of Molecular Biology *329*, 495–503.

Cao, W.-H., Liu, J., He, X.-J., Mu, R.-L., Zhou, H.-L., Chen, S.-Y., and Zhang, J.-S. (2007). Modulation of ethylene responses affects plant salt-stress responses. Plant Physiology *143*, 707–719.

Cao, Y.-R., Chen, S.-Y., and Zhang, J.-S. (2008). Ethylene signaling regulates salt stress response: An overview. Plant Signaling & Behavior *3*, 761–763.

Carpin, S., Laffer, S., Schoentgen, F., Valenta, R., Chénieux, J.-C., Rideau, M., and Hamdi, S. (1998). Molecular characterization of a cytokinin-inducible periwinkle protein showing sequence homology with pathogenesis-related proteins and the Bet v 1 allergen family. Plant Molecular Biology *36*, 791–798.

Caruso, A., Morabito, D., Delmotte, F., Kahlem, G., and Carpin, S. (2002). Dehydrin induction during drought and osmotic stress in *Populus*. Plant Physiology and Biochemistry *40*, 1033–1042.

Cedzich, A., Stransky, H., Schulz, B., and Frommer, W.B. (2008). Characterization of cytokinin and adenine transport in *Arabidopsis* cell cultures. Plant Physiology *148*, 1857–1867.

Cela, J., Chang, C., and Munné-Bosch, S. (2011). Accumulation of γ- rather than α-tocopherol alters ethylene signaling gene expression in the vte4 Mutant of *Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Physiology *52*, 1389–1400.

Chamaillard, S., Fichot, R., Vincent-Barbaroux, C., Bastien, C., Depierreux, C., Dreyer, E., Villar, M., and Brignolas, F. (2011). Variations in bulk leaf carbon isotope discrimination, growth and related leaf traits among three *Populus* nigra L. populations. Tree Physiology *31*, 1076–1087.

Chang, S., Puryear, J., and Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. Plant Molecular Biology Reporter *11*, 113–116.

Chang, W.-C., Lee, T.-Y., Huang, H.-D., Huang, H.-Y., and Pan, R.-L. (2008). PlantPAN: Plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial *cis*-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups. BMC Genomics *9*, 561.

Chaves, M.M., Maroco, J.P., and Pereira, J.S. (2003). Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. Functional Plant Biology *30*, 239–264.

Chazen, O., and Neumann, P.M. (1994). Hydraulic signals from the roots and rapid cell-wall hardening in growing Maize (*Zea mays* L.) leaves are primary responses to polyethylene glycol-induced water deficits. Plant Physiology *104*, 1385–1392.

Chefdor, F., Bénédetti, H., Depierreux, C., Delmotte, F., Morabito, D., and Carpin, S. (2006). Osmotic stress sensing in *Populus*: Components identification of a phosphorelay system. FEBS Letters *580*, 77–81.

Chen, Q.G., and Bleecker, A.B. (1995). Analysis of ethylene signal-transduction kinetics associated with seedling-growth response and chitinase induction in wild-type and mutant *Arabidopsis*. Plant Physiology *108*, 597–607.

Chen, T.H., and Murata, N. (2002). Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. Current Opinion in Plant Biology *5*, 250–257.

Chen, Y.-F., Etheridge, N., and Schaller, G.E. (2005). Ethylene signal transduction. Annals of Botany *95*, 901–915.

Cheng, M.-C., Liao, P.-M., Kuo, W.-W., and Lin, T.-P. (2013). The *Arabidopsis* ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 regulates abiotic stress-responsive gene expression by binding to different *cis*-acting elements in response to different stress signals. Plant Physiology *162*, 1566-1582.

Cheng, W.-H., Endo, A., Zhou, L., Penney, J., Chen, H.-C., Arroyo, A., Leon, P., Nambara, E., Asami, T., Seo, M., et al. (2002). A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. Plant Cell *14*, 2723–2743.

Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J., and Kim, S.Y. (2000). ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. Journal of Biological Chemistry *275*, 1723–1730.

Choi, J., Huh, S.U., Kojima, M., Sakakibara, H., Paek, K.-H., and Hwang, I. (2010). The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity *via* TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in *Arabidopsis*. Developmental Cell *19*, 284–295.

Christmann, A., Hoffmann, T., Teplova, I., Grill, E., and Müller, A. (2005). Generation of active pools of abscisic acid revealed by *in vivo* imaging of water-stressed *Arabidopsis*. Plant Physiology *137*, 209–219.

Christmann, A., Weiler, E.W., Steudle, E., and Grill, E. (2007). A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. The Plant Journal *52*, 167–174.

Claudot, A.-C., Ernst, D., Sandermann Jr, H., and Drouet, A. (1999). Cloning and characterization of two members of the chalcone synthase gene family from walnut. Plant Physiology and Biochemistry *37*, 721–730.

Cosgrove, D.J. (2005). Growth of the plant cell wall. Nature Reviews Molecular Cell Biology *6*, 850–861.

Cramer, G.R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., and Shinozaki, K. (2011). Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. BMC Plant Biology *11*, 163.

Cutcliffe, J.W., Hellmann, E., Heyl, A., and Rashotte, A.M. (2011). CRFs form protein–protein interactions with each other and with members of the cytokinin signalling pathway in *Arabidopsis via* the CRF domain. Jounal of Experimental Botany *62*, 4995–5002.

D'Agostino, I.B., and Kieber, J.J. (1999). Phosphorelay signal transduction: the emerging family of plant response regulators. Trends in Biochemical Sciences *24*, 452–456.

D'Agostino, I.B., Deruère, J., and Kieber, J.J. (2000). Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. Plant Physiology *124*, 1706–1717.

Davies, W.J., and Zhang, J. (1991). Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying Soil. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology *42*, 55–76.

Davies, K.M., Lowe, E.D., Vénien-Bryan, C., and Johnson, L.N. (2009). The HupR receiver domain crystal structure in its nonphospho and inhibitory phospho states. Journal of Molecular Biology *385*, 51–64.

DeLano, W.L., and Bromberg, S. (2004). PyMOL User's Guide. DeLano Scientific LLC.

Dello Ioio, R., Linhares, F.S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P., and Sabatini, S. (2007). Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. Current Biology *17*, 678–682.

Dello Ioio, R., Linhares, F.S., and Sabatini, S. (2008). Emerging role of cytokinin as a regulator of cellular differentiation. Current Opinion in Plant Biology *11*, 23–27.

Deng, Y., Dong, H., Mu, J., Ren, B., Zheng, B., Ji, Z., Yang, W.-C., Liang, Y., and Zuo, J. (2010). *Arabidopsis* Histidine Kinase CKI1 acts upstream of HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEINS to regulate female gametophyte development and vegetative growth. Plant Cell *22*, 1232–1248.

Desikan, R., Hancock, J.T., Bright, J., Harrison, J., Weir, I., Hooley, R., and Neill, S.J. (2005). A role for ETR1 in hydrogen peroxide signaling in stomatal guard cells. Plant Physiology *137*, 831–834.

Desikan, R., Last, K., Harrett-Williams, R., Tagliavia, C., Harter, K., Hooley, R., Hancock, J.T., and Neill, S.J. (2006). Ethylene-induced stomatal closure in *Arabidopsis* occurs *via* AtrbohF-mediated hydrogen peroxide synthesis. The Plant Journal *47*, 907–916.

Desikan, R., Horák, J., Chaban, C., Mira-Rodado, V., Witthöft, J., Elgass, K., Grefen, C., Cheung, M.-K., Meixner, A.J., Hooley, R., et al. (2008). The Histidine Kinase AHK5 integrates endogenous and environmental signals in *Arabidopsis* guard cells. PLoS ONE *3*, e2491.

Dickmann, D.I., and Kuzovkina, J. (2008). Poplars and willows of the world, with emphasis on sylviculturally important species (Chapter 2). *In*: Poplars and willows in the world: meeting the needs of society and the environment. Isebrands J.G., Richardson J. (eds). FAO/IPC, Rome, Italy, 135p.

Diensthuber, R.P., Bommer, M., Gleichmann, T., and Möglich, A. (2013). Full-length structure of a sensor histidine kinase pinpoints coaxial coiled coils as signal transducers and modulators. Structure *21*, 1127–1136.

Dijk, M., Dijk, A.D.J., Hsu, V., Boelens, R., and Bonvin, A.M.J.J. (2006). Information-driven protein–DNA docking using HADDOCK: it is a matter of flexibility. Nucleic Acids Research. *34*, 3317–3325.

Dillen, S.Y., El Kasmioui, O., Marron, N., Calfapietra, C., and Ceulemans, R. (2011). Poplar (Chapter 14). *In*: Energy Crops. Halford N.G., and Karp A. (eds). Cambridge: Royal Society of Chemistry, pp. 275–300.

Djordjevic, S., and Stock, A.M. (1998). Structural analysis of bacterial chemotaxis proteins: Components of a dynamic signaling system. Journal of Structural Biology *124*, 189–200.

Dolinsky, T.J., Czodrowski, P., Li, H., Nielsen, J.E., Jensen, J.H., Klebe, G., and Baker, N.A. (2007). PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. Nucleic Acids Research *35*, W522–W525.

Dong, C.-H., Rivarola, M., Resnick, J.S., Maggin, B.D., and Chang, C. (2008). Subcellular co-localization of *Arabidopsis* RTE1 and ETR1 supports a regulatory role for RTE1 in ETR1 ethylene signaling. The Plant Journal *53*, 275–286.

Dortay, H., Mehnert, N., Bürkle, L., Schmülling, T., and Heyl, A. (2006). Analysis of protein interactions within the cytokinin-signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*. FEBS Journal *273*, 4631–4644.

Dortay, H., Gruhn, N., Pfeifer, A., Schwerdtner, M., Schmülling, T., and Heyl, A. (2008). Toward an interaction map of the two-component signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*. Journal of Proteome Research *7*, 3649–3660.

Dosztányi, Z., Csizmok, V., Tompa, P., and Simon, I. (2005). IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. Bioinformatics *21*, 3433–3434.

Eckenwalder, J.E. (1996) Systematics and evolution of *Populus*. *In*: Biology of *Populus* and its implications for management and conservation. Stettler, R.F., Bradshaw H.D. Jr., Heilman, P.E. and Hinckley T.M. N (eds). NRC Research Press, Ottawa, Canada. 539p.

Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research. *32*, 1792–1797.

Ehlert, A., Weltmeier, F., Wang, X., Mayer, C.S., Smeekens, S., Vicente-Carbajosa, J., and Dröge-Laser, W. (2006). Two-hybrid protein–protein interaction analysis in *Arabidopsis* protoplasts: establishment of a heterodimerization map of group C and group S bZIP transcription factors. The Plant Journal *46*, 890–900.

Endo, A., Sawada, Y., Takahashi, H., Okamoto, M., Ikegami, K., Koiwai, H., Seo, M., Toyomasu, T., Mitsuhashi, W., Shinozaki, K., et al. (2008). Drought induction of *Arabidopsis* 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells. Plant Physiology *147*, 1984–1993.

Fan, Q., Lechno-Yossef, S., Ehira, S., Kaneko, T., Ohmori, M., Sato, N., Tabata, S., and Wolk, C.P. (2006). Signal transduction genes required for heterocyst maturation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. Journal of Bacteriology *188*, 6688–6693.

FAO (2008). Les peupliers, les saules et le bien-être des populations. Synthèse des rapports d'activité nationaux. 23ème session de la Commission internationale du Peuplier. 83p.

Fasman, G.D. (eds) (1996). Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. New York: Plenum Publishing Corporation, ISBN 0-306-45142-5.

Fass, D. (2012). Disulfide bonding in protein biophysics. Annual Review of Biophysics *41*, 63–79.

Fassler, J.S., and West, A.H. (2011). Fungal Skn7 stress responses and their relationship to virulence. Eukaryotic Cell *10*, 156–167.

Ferrigno, P., Posas, F., Koepp, D., Saito, H., and Silver, P.A. (1998). Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin β homologs NMD5 and XPO1. EMBO Journal *17*, 5606–5614.

Ferris, H.U., Dunin-Horkawicz, S., Mondéjar, L.G., Hulko, M., Hantke, K., Martin, J., Schultz, J.E., Zeth, K., Lupas, A.N., and Coles, M. (2011). The mechanisms of HAMP-mediated signaling in transmembrane receptors. Structure *19*, 378–385.

Fichot, R., Barigah, T.S., Chamaillard, S., Le Thiec, D., Laurans, F., Cochard, H., and Brignolas, F. (2010). Common trade-offs between xylem resistance to cavitation and other physiological traits do not hold among unrelated *Populus* deltoides × *Populus* nigra hybrids. Plant, Cell & Environment *33*, 1553–1568.

Fiser, A., Do, R.K.G., and Šali, A. (2000). Modeling of loops in protein structures. Protein Science *9*, 1753–1773.

Fromont-Racine, M., Rain, J.-C., and Legrain, P. (1997). Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. Nature Genetics *16*, 277–282.

Frugier, F., Kosuta, S., Murray, J.D., Crespi, M., and Szczyglowski, K. (2008). Cytokinin: secret agent of symbiosis. Trends in Plant Science *13*, 115–120.

Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., Rubio, S., Antoni, R., Park, S.-Y., Cutler, S.R., Sheen, J., Rodriguez, P.L., and Zhu, J.-K. (2009). *In vitro* reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. Nature *462*, 660–664.

Fujita, M., Fujita, Y., Maruyama, K., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Tran, L.-S.P., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2004). A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. The Plant Journal *39*, 863–876.

Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M.M., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2005). AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. Plant Cell *17*, 3470–3488.

Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri, T., Kidokoro, S., Kanamori, N., Umezawa, T., Fujita, M., Maruyama, K., Ishiyama, K., et al. (2009). Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in *Arabidopsis*. Plant and Cell Physiology *50*, 2123–2132.

Furihata, T., Maruyama, K., Fujita, Y., Umezawa, T., Yoshida, R., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. PNAS *103*, 1988–1993.

Gamble, R.L., Coonfield, M.L., and Schaller, G.E. (1998). Histidine kinase activity of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis*. PNAS *95*, 7825–7829.

Gamborg, O.L., Miller, R.A., and Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research *50*, 151–158.

Gao, R., and Stock, A.M. (2009). Biological insights from structures of two-component proteins. Annual Revview of Microbiology. *63*, 133–154.

Gao, R., and Stock, A.M. (2010). Molecular strategies for phosphorylation-mediated regulation of response regulator activity. Current Opinion Microbiology *13*, 160–167.

Gao, Z., Maurousset, L., Lemoine, R., Yoo, S.-D., van Nocker, S., and Loescher, W. (2003). Cloning, expression, and characterization of sorbitol transporters from developing sour cherry fruit and leaf sink tissues. Plant Physiology *131*, 1566–1575.

Gao, Z., Wen, C.-K., Binder, B.M., Chen, Y.-F., Chang, J., Chiang, Y.-H., Kerris, R.J., Chang, C., and Schaller, G.E. (2008). Heteromeric interactions among ethylene receptors mediate signaling in *Arabidopsis*. Journal of Biological Chemistry. *283*, 23801–23810.

Gattolin, S., Alandete-Saez, M., Elliott, K., Gonzalez-Carranza, Z., Naomab, E., Powell, C., and Roberts, J.A. (2006). Spatial and temporal expression of the response regulators ARR22 and ARR24 in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Experimental Botany *57*, 4225 –4233.

Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Stange, A., Marten, I., Bauer, H., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Al-Rasheid, K.A.S., et al. (2009). Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. PNAS *106*, 21425–21430.

Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Marten, I., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Wellmann, C., Al-Rasheid, K. a. S., Grill, E., et al. (2010). Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca^{2+} affinities. PNAS *107*, 8023–8028.

Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R., and Woods, R.A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. Yeast *11*, 355–360.

Ginis, O., Oudin, A., Guirimand, G., Chebbi, M., Courdavault, V., Glévarec, G., Papon, N., Crèche, J., and Courtois, M. (2012). A type-B response regulator drives the expression of the hydroxymethylbutenyl diphosphate synthase gene in periwinkle. Journal of Plant Physiology *169*, 1571–1574.

Goujon, M., McWilliam, H., Li, W., Valentin, F., Squizzato, S., Paern, J., and Lopez, R. (2010). A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL–EBI. Nucleic Acids Research *38*, W695–W699.

Granier, C., Inzé, D., and Tardieu, F. (2000). Spatial distribution of cell division rate can be deduced from that of p34cdc2 kinase activity in maize leaves grown at contrasting temperatures and soil water conditions. Plant Physiology *124*, 1393–1402.

Grefen, C., Lalonde, S., and Obrdlik, P. (2007). Split-ubiquitin system for identifying protein-protein interactions in membrane and full-length proteins. Current Protocols in Neuroscience 5.27.1-5.27.41.

Grefen, C., Städele, K., Růžička, K., Obrdlik, P., Harter, K., and Horák, J. (2008). Subcellular localization and *in vivo* interactions of the *Arabidopsis thaliana* ethylene receptor family members. Molecular Plant *1*, 308–320.

Guirimand, G., Burlat, V., Oudin, A., Lanoue, A., St-Pierre, B., and Courdavault, V. (2009). Optimization of the transient transformation of *Catharanthus roseus* cells by particle bombardment and its application to the subcellular localization of hydroxymethylbutenyl 4-diphosphate synthase and geraniol 10-hydroxylase. Plant Cell Reports *28*, 1215–1234.

Guirimand, G., Courdavault, V., Lanoue, A., Mahroug, S., Guihur, A., Blanc, N., Giglioli-Guivarc'h, N., St-Pierre, B., and Burlat, V. (2010). Strictosidine activation in Apocynaceae: towards a "nuclear time bomb"? BMC Plant Biology *10*, 182.

Gupta, S., and Rashotte, A.M. (2012). Down-stream components of cytokinin signaling and the role of cytokinin throughout the plant. Plant Cell Reports *31*, 801–812.

Guzmán, P., and Ecker, J.R. (1990). Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. Plant Cell *2*, 513–523.

Ha, S., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., and Tran, L.-S.P. (2012). Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. Trends in Plant Science *17*, 172–179.

Haake, V., Cook, D., Riechmann, J., Pineda, O., Thomashow, M.F., and Zhang, J.Z. (2002). Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. Plant Physiology *130*, 639–648.

Hall, B.P., Shakeel, S.N., Amir, M., Haq, N.U., Qu, X., and Schaller, G.E. (2012). Histidine Kinase activity of the ethylene receptor ETR1 facilitates the ethylene response in *Arabidopsis*. Plant Physiology *159*, 682–695.

Hass, C., Lohrmann, J., Albrecht, V., Sweere, U., Hummel, F., Yoo, S.D., Hwang, I., Zhu, T., Schäfer, E., Kudla, J., et al. (2004). The response regulator 2 mediates ethylene signalling and hormone signal integration in *Arabidopsis*. The EMBO Journal *23*, 3290– 3302.

Hayashi, M., and Maeda, T. (2006). Activation of the HOG pathway upon cold stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biochemistry *139*, 797–803.

Hejátko, J., Pernisová, M., Eneva, T., Palme, K., and Brzobohatý, B. (2003). The putative sensor histidine kinase CKI1 is involved in female gametophyte development in *Arabidopsis*. Molecular Genectics and Genomics *269*, 443–453.

Hejátko, J., Ryu, H., Kim, G.-T., Dobešová, R., Choi, S., Choi, S.M., Souček, P., Horák, J., Pekárová, B., Palme, K., et al. (2009). The Histidine Kinases CYTOKININ-INDEPENDENT1 and ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE2 and 3 regulate vascular tissue development in *Arabidopsis* shoots. Plant Cell *21*, 2008–2021.

Héricourt, F., Chefdor, F., Bertheau, L., Tanigawa, M., Maeda, T., Guirimand, G., Courdavault, V., Larcher, M., Depierreux, C., Bénédetti, H., et al. (2013). Characterization of histidine-aspartate kinase HK1 and identification of histidine phosphotransfer proteins as potential partners in a *Populus* multistep phosphorelay. Physiologia Plantarum *149*, 188-199

Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D., and Lindahl, E. (2008). GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. Journal of Chemical Theory and Computation *4*, 435–447.

Heyl, A., Wulfetange, K., Pils, B., Nielsen, N., Romanov, G.A., and Schmülling, T. (2007). Evolutionary proteomics identifies amino acids essential for ligand-binding of the cytokinin receptor CHASE domain. BMC Evolutionary Biology *7*, 62.

Heyl, A., Ramireddy, E., Brenner, W.G., Riefler, M., Allemeersch, J., and Schmülling, T. (2008). The transcriptional repressor ARR1-SRDX suppresses pleiotropic cytokinin activities in *Arabidopsis*. Plant Physiology *147*, 1380–1395.

Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., and Korenaga, T. (1999). Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. Nucleic Acids Research. *27*, 297–300.

Higuchi, M., Pischke, M.S., Mähönen, A.P., Miyawaki, K., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Shinozaki, K., Kato, T., Tabata, S., et al. (2004). *In planta* functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. PNAS *101*, 8821–8826.

Hill, K., Mathews, D.E., Kim, H.J., Street, I.H., Wildes, S.L., Chiang, Y.-H., Mason, M.G., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Kieber, J.J., et al. (2013). Functional characterization of type-B response regulators in the *Arabidopsis* cytokinin response. Plant Physiology *162*, 212–224.

Hohmann, S. (2009). Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Letters *583*, 4025–4029.

Holbrook, N.M., Shashidhar, V.R., James, R.A., and Munns, R. (2002). Stomatal control in tomato with ABA-deficient roots: response of grafted plants to soil drying. Jounal of Experimental Botany *53*, 1503–1514.

Horák, J., Janda, L., Pekarova, B., and Hejatko, J. (2011). Molecular mechanisms of signalling specificity *via* phosphorelay pathways in *Arabidopsis*. Current Protein and Peptide Science *12*, 126–136.

Horák, J., Grefen, C., Berendzen, K.W., Hahn, A., Stierhof, Y.-D., Stadelhofer, B., Stahl, M., Koncz, C., and Harter, K. (2008). The *Arabidopsis thaliana* response regulator ARR22 is a putative AHP phospho-histidine phosphatase expressed in the chalaza of developing seeds. BMC Plant Biology *8*, 77.

Horie, T., Tatebayashi, K., Yamada, R., and Saito, H. (2008). Phosphorylated Ssk1 prevents unphosphorylated Ssk1 from activating the Ssk2 mitogen-activated protein kinase kinase kinase in the yeast high-osmolarity glycerol osmoregulatory pathway. Molecular and Cellular Biology *28*, 5172–5183.

Hosoda, K., Imamura, A., Katoh, E., Hatta, T., Tachiki, M., Yamada, H., Mizuno, T., and Yamazaki, T. (2002). Molecular structure of the GARP family of plant Myb-related DNA binding motifs of the *Arabidopsis* response regulators. The Plant Cell Online *14*, 2015 –2029.

Hothorn, M., Dabi, T., and Chory, J. (2011). Structural basis for cytokinin recognition by *Arabidopsis thaliana* histidine kinase 4. Nature Chemical Biology *7*, 766–768.

Hrabak, E.M., Chan, C.W.M., Gribskov, M., Harper, J.F., Choi, J.H., Halford, N., Kudla, J., Luan, S., Nimmo, H.G., Sussman, M.R., et al. (2003). The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. Plant Physiology *132*, 666–680.

Hradilová, J., and Brzobohatý, B. (2007). Expression pattern of the AHP gene family from *Arabidopsis thaliana* and organ specific alternative splicing in the AHP5 gene. Biologia Plantarum *51*, 257–267.

Hradilová, J., Malbeck, J., and Brzobohatý, B. (2007). Cytokinin regulation of gene expression in the AHP gene family in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Plant Growth Regulation *26*, 229–244.

Hua, J., Sakai, H., Nourizadeh, S., Chen, Q.G., Bleecker, A.B., Ecker, J.R., and Meyerowitz, E.M. (1998). EIN4 and ERS2 are members of the putative ethylene receptor gene family in *Arabidopsis*. Plant Cell *10*, 1321–1332.

Huang, W., and Wu, Q. (2004). The ManR specifically binds to the promoter of a Nramp transporter gene in *Anabaena* sp. PCC 7120: a novel regulatory DNA motif in cyanobacteria. Biochemical and Biophysical Research Communications *317*, 578–585.

Huang, Y., Li, H., Hutchison, C.E., Laskey, J., and Kieber, J.J. (2003). Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in *Arabidopsis*. The Plant Journal *33*, 221–233.

Hundertmark, M., and Hincha, D.K. (2008). LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. BMC Genomics *9*, 118.

Hutchison, C.E., Li, J., Argueso, C., Gonzalez, M., Lee, E., Lewis, M.W., Maxwell, B.B., Perdue, T.D., Schaller, G.E., Alonso, J.M., et al. (2006). The *Arabidopsis* Histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. Plant Cell *18*, 3073–3087.

Hwang, I., and Sheen, J. (2001). Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. Nature *413*, 383–389.

Hwang, I., Chen, H.-C., and Sheen, J. (2002). Two-component signal transduction pathways *in Arabidopsis*. Plant Physiology *129*, 500–515.

Hwang, I., Sheen, J., and Müller, B. (2012). Cytokinin signaling networks. Annual Review of Plant Biology *63*, 353–380.

Ichida, A.M., Pei, Z.M., Baizabal-Aguirre, V.M., Turner, K.J., and Schroeder, J.I. (1997). Expression of a Cs(+)-resistant guard cell K+ channel confers Cs(+)-resistant, light-induced stomatal opening in transgenic *Arabidopsis*. Plant Cell *9*, 1843–1857.

Iljin, W.S. (1957). Drought resistance in plants and physiological processes. Annual Review of Plant Physiology *8*, 257–274.

Imamura, A., Hanaki, N., Umeda, H., Nakamura, A., Suzuki, T., Ueguchi, C., and Mizuno, T. (1998). Response regulators implicated in His-to-Asp phosphotransfer signaling in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences *95*, 2691 –2696.

Imamura, A., Hanaki, N., Nakamura, A., Suzuki, T., Taniguchi, M., Kiba, T., Ueguchi, C., Sugiyama, T., and Mizuno, T. (1999). Compilation and characterization of *Arabiopsis thaliana* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. Plant and Cell Physiology *40*, 733 –742.

Imamura, A., Yoshino, Y., and Mizuno, T. (2001). Cellular localization of the signaling components of *Arabidopsis* His-to-Asp phosphorelay. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry *65*, 2113–2117.

Imamura, A., Kiba, T., Tajima, Y., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2003). *In vivo* and *in vitro* characterization of the ARR11 response regulator implicated in the His-to-Asp phosphorelay signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Physiology *44*, 122 –131.

Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K., and Kakimoto, T. (2001). Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. Nature *409*, 1060–1063.

Ishida, K., Yamashino, T., Yokoyama, A., and Mizuno, T. (2008). Three Type-B response regulators, ARR1, ARR10 and ARR12, play essential but redundant roles in cytokinin signal transduction throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Physiology *49*, 47 –57.

Ishida, K., Niwa, Y., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2009). A genome-wide compilation of the two-component systems in *Lotus japonicus*. DNA Research *16*, 237 –247.

Iwama, A., Yamashino, T., Tanaka, Y., Sakakibara, H., Kakimoto, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Nagatani, A., and Mizuno, T. (2007). AHK5 Histidine Kinase regulates root elongation through an ETR1-dependent abscisic acid and ethylene signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Physiology *48*, 375–380.

Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., and Parcy, F. (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. Trends in Plant Science *7*, 106–111.

Janiak-Spens, F., Sparling, J.M., Gurfinkel, M., and West, A.H. (1999). Differential stabilities of phosphorylated response regulator domains reflect functional roles of the yeast osmoregulatory SLN1 and SSK1 proteins. Journal of Bacteriology *181*, 411–417.

Janiak-Spens, F., Sparling, D.P., and West, A.H. (2000). Novel role for an HPt domain in stabilizing the phosphorylated state of a response regulator domain. Journal of Bacteriology *182*, 6673–6678.

Janin, J., Bahadur, R.P., and Chakrabarti, P. (2008). Protein–protein interaction and quaternary structure. Quarterly Reviews of Biophysics *41*, 133–180.

Jansson, S., and Douglas, C.J. (2007). *Populus*: A model system for plant biology. Annual Review of Plant Biology *58*, 435–458.

Javadmanesh, S., Rahmani, F., and Pourakbar, L. (2013). Effect of abiotic stresses on Histidine kinases gene expression in *Zea mays* L. cv. SC. 704. Journal of Stress Physiology & Biochemistry *9*, 124–135.

Jeon, J., and Kim, J. (2013). *Arabidopsis* response regulator1 and *Arabidopsis* Histidine Phosphotransfer protein2 (AHP2), AHP3, and AHP5 function in cold signaling. Plant Physiology *161*, 408–424.

Jeon, J., Kim, N.Y., Kim, S., Kang, N.Y., Novák, O., Ku, S.-J., Cho, C., Lee, D.J., Lee, E.-J., Strnad, M., et al. (2010). A subset of cytokinin two-component signaling system plays a role in cold temperature stress response in *Arabidopsis*. Journal of Biological Chemistry *285*, 23371–23386.

Jin, H., and Martin, C. (1999). Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. Plant Molecular Biology *41*, 577–585.

Jones, D.T., Taylor, W.R., and Thornton, J.M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. Computer Applications in the Biosciences *8*, 275–282.

Jung, K.W., Oh, S.I., Kim, Y.Y., Yoo, K.S., Cui, M.H., and Shin, J.S. (2008). *Arabidopsis* histidine-containing phosphotransfer factor 4 (AHP4) negatively regulates secondary wall thickening of the anther endothecium during flowering. Molecules and Cells *25*, 294-300.

Kakimoto, T. (1996). CKI1, a Histidine Kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. Science *274*, 982–985.

Kang, J., Hwang, J.-U., Lee, M., Kim, Y.-Y., Assmann, S.M., Martinoia, E., and Lee, Y. (2010). PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. Proceedings of the National Academy of Sciences *107*, 2355–2360.

Karaca, E., Melquiond, A.S.J., Vries, S.J. de, Kastritis, P.L., and Bonvin, A.M.J.J. (2010). Building macromolecular assemblies by information-driven docking INTRODUCING THE HADDOCK MULTIBODY DOCKING SERVER. Molecular and Cellular Proteomics *9*, 1784–1794.

Kaserer, A.O., Andi, B., Cook, P.F., and West, A.H. (2009). Effects of osmolytes on the SLN1-YPD1-SSK1 phosphorelay system from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemistry *48*, 8044–8050.

Kiba, T., Yamada, H., and Mizuno, T. (2002). Characterization of the ARR15 and ARR16 response regulators with special reference to the cytokinin signaling pathway mediated by the AHK4 Histidine Kinase in roots of *Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Physiology *43*, 1059 –1066.

Kiba, T., Aoki, K., Sakakibara, H., and Mizuno, T. (2004). *Arabidopsis* response regulator, ARR22, ectopic expression of which results in phenotypes similar to the wol cytokinin-receptor mutant. Plant and Cell Physiology *45*, 1063 –1077.

Kieber, J.J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K.A., and Ecker, J.R. (1993). CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. Cell *72*, 427–441.

Kim, K., and Hwang, I. (2012). Attenuation of cytokinin signaling *via* proteolysis of a type-B response regulator. Plant Signaling & Behavior *7*, 756–759.

Kim, H.J., Ryu, H., Hong, S.H., Woo, H.R., Lim, P.O., Lee, I.C., Sheen, J., Nam, H.G., and Hwang, I. (2006). Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences *103*, 814 –819.

Kim, H.J., Chiang, Y.-H., Kieber, J.J., and Schaller, G.E. (2013). SCFKMD controls cytokinin signaling by regulating the degradation of type-B response regulators. Proceedings of the National Academy of Sciences *110*, 10028–10033.

Klumpler, T., Pekárová, B., Marek, J., Borkovcová, P., Janda, L., and Hejátko, J. (2009). Cloning, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the receiver domain of the histidine kinase CKI1 from *Arabidopsis thaliana*. Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications *65*, 478–481.

Knight, H., Zarka, D.G., Okamoto, H., Thomashow, M.F., and Knight, M.R. (2004). Abscisic acid induces CBF gene transcription and subsequent induction of cold-regulated genes *via* the CRT promoter element. Plant Physiology *135*, 1710–1717.

Koiwai, H., Nakaminami, K., Seo, M., Mitsuhashi, W., Toyomasu, T., and Koshiba, T. (2004). Tissue-specific localization of an abscisic acid biosynthetic enzyme, AAO3, in *Arabidopsis*. Plant Physiology *134*, 1697–1707.

Koretke, K.K., Lupas, A.N., Warren, P.V., Rosenberg, M., and Brown, J.R. (2000). Evolution of two-component signal transduction. Molecular Biology Evolution *17*, 1956–1970.

Krieger, E., Koraimann, G., and Vriend, G. (2002). Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA—a self-parameterizing force field. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics *47*, 393–402.

Krissinel, E., and Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. Journal of Molecular Biology *372*, 774–797.

Kumar, M.N., Jane, W.-N., and Verslues, P.E. (2013). Role of the putative osmosensor *Arabidopsis* Histidine Kinase1 in dehydration avoidance and low-water-potential response. Plant Physiology *161*, 942–953.

Kuromori, T., Miyaji, T., Yabuuchi, H., Shimizu, H., Sugimoto, E., Kamiya, A., Moriyama, Y., and Shinozaki, K. (2010). ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. Proceedings of the National Academy of Sciences *107*, 2361–2366.

Lafon-Placette, C., Faivre-Rampant, P., Delaunay, A., Street, N., Brignolas, F., and Maury, S. (2013). Methylome of DNase I sensitive chromatin in *Populus trichocarpa* shoot apical meristematic cells: a simplified approach revealing characteristics of gene-body DNA methylation in open chromatin state. New Phytologist *197*, 416–430.

Laub, M.T., and Goulian, M. (2007). Specificity in two-component signal transduction pathways. Annual Review of Genetics *41*, 121–145.

Layton, B.E., Boyd, M.B., Tripepi, M.S., Bitonti, B.M., Dollahon, M.N.R., and Balsamo, R.A. (2010). Dehydration-induced expression of a 31-kDa dehydrin in *Polypodium polypodioides* (Polypodiaceae) may enable large, reversible deformation of cell walls. American Journal Botany *97*, 535–544.

Le, D.T., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Mochida, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., and Tran, L.-S.P. (2011). Genome-wide expression profiling of soybean two-component system genes in soybean root and shoot tissues under dehydration stress. DNA Research *18*, 17 –29.

Lee, D.J., Park, J.-Y., Ku, S.-J., Ha, Y.-M., Kim, S., Kim, M.D., Oh, M.-H., and Kim, J. (2007). Genome-wide expression profiling of ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 7(ARR7) overexpression in cytokinin response. Molecular Genetics and Genomics *277*, 115–137.

Lee, D.J., Kim, S., Ha, Y.-M., and Kim, J. (2008). Phosphorylation of *Arabidopsis* response regulator 7 (ARR7) at the putative phospho-accepting site is required for ARR7 to act as a negative regulator of cytokinin signaling. Planta *227*, 577–587.

Lee, K.H., Piao, H.L., Kim, H.-Y., Choi, S.M., Jiang, F., Hartung, W., Hwang, I., Kwak, J.M., Lee, I.-J., and Hwang, I. (2006). Activation of glucosidase *via* stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. Cell *126*, 1109–1120.

Lee, S.C., Lan, W., Buchanan, B.B., and Luan, S. (2009). A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. Proceedings of the National Academy of Sciences *106*, 21419–21424.

Lee, S.-Y., Cho, H.S., Pelton, J.G., Yan, D., Henderson, R.K., King, D.S., Huang, L., Kustu, S., Berry, E.A., and Wemmer, D.E. (2001). Crystal structure of an activated response regulator bound to its target. Nature Structural and Molecular Biology *8*, 52–56.

Leung, J., Merlot, S., and Giraudat, J. (1997). The *Arabidopsis* ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. Plant Cell *9*, 759–771.

Liang, Y., Wang, X., Hong, S., Li, Y., and Zuo, J. (2012). Deletion of the initial 45 residues of ARR18 induces cytokinin response in *Arabidopsis*. Journal of Genetics and Genomics *39*, 37–46.

Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. Plant Cell *10*, 1391–1406.

Lohrmann, J., Sweere, U., Zabaleta, E., Baurle, I., Keitel, C., Kozma-Bognar, L., Brennicke, A., Schafer, E., J Kudla, and Harter (2001). The response regulator ARR2: a pollen-specific transcription factor involved in the expression of nuclear genes for components of mitochondrial complex I in *Arabidopsis*. Molecular Genetics and Genomics *265*, 2–13.

Lomin, S.N., Yonekura-Sakakibara, K., Romanov, G.A., and Sakakibara, H. (2011). Ligand-binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors. Journal of Experimental Botany *62*, 5149-5159.

Lomin, S.N., Krivosheev, D.M., Steklov, M.Y., Osolodkin, D.I., and Romanov, G.A. (2012). Receptor properties and features of cytokinin signaling. Acta Naturae *4*, 31–45.

Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J.J., and Solano, R. (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. Plant Cell *15*, 165–178.

Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., and Grill, E. (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. Science *324*, 1064–1068.

Mack, T.R., Gao, R., and Stock, A.M. (2009). Probing the roles of the two different dimers mediated by the receiver domain of the response regulator PhoB. Journal of Molecular Biology *389*, 349–364.

Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M., and Saito, H. (1994). A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. Nature *369*, 242–245.

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

Mähönen, A.P., Bonke, M., Kauppinen, L., Riikonen, M., Benfey, P.N., and Helariutta, Y. (2000). A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. Genes and Development *14*, 2938–2943.

Mähönen, A.P., Higuchi, M., Törmäkangas, K., Miyawaki, K., Pischke, M.S., Sussman, M.R., Helariutta, Y., and Kakimoto, T. (2006a). Cytokinins regulate a bidirectional phosphorelay network in *Arabidopsis*. Current Biology *16*, 1116–1122.

Mähönen, A.P., Bishopp, A., Higuchi, M., Nieminen, K.M., Kinoshita, K., Törmäkangas, K., Ikeda, Y., Oka, A., Kakimoto, T., and Helariutta, Y. (2006b). Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. Science *311*, 94–98.

Marron, N., Delay, D., Petit, J.-M., Dreyer, E., Kahlem, G., Delmotte, F.M., and Brignolas, F. (2002). Physiological traits of two *Populus* × euramericana clones, Luisa Avanzo and Dorskamp, during a water stress and re-watering cycle. Tree Physiology *22*, 849–858.

Marron, N., Bastien, C., Sabatti, M., Taylor, G., and Ceulemans, R. (2006). Plasticity of growth and sylleptic branchiness in two poplar families grown at three sites across Europe. Tree Physiology *26*, 935–946.

Mas, G., de Nadal, E., Dechant, R., de la Concepción, M.L.R., Logie, C., Jimeno-González, S., Chávez, S., Ammerer, G., and Posas, F. (2009). Recruitment of a chromatin remodelling complex by the Hog1 MAP kinase to stress genes. EMBO Journal *28*, 326–336.

Mascher, T. (2006). Intramembrane-sensing histidine kinases: a new family of cell envelope stress sensors in Firmicutes bacteria. FEMS Microbiology Letters *264*, 133–144.

Mason, M.G., Li, J., Mathews, D.E., Kieber, J.J., and Schaller, G.E. (2004). Type-B response regulators display overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. Plant Physiology *135*, 927 –937.

Mason, M.G., Mathews, D.E., Argyros, D.A., Maxwell, B.B., Kieber, J.J., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Schaller, G.E. (2005). Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in *Arabidopsis*. The Plant Cell Online *17*, 3007 –3018.

Mason, M.G., Jha, D., Salt, D.E., Tester, M., Hill, K., Kieber, J.J., and Eric Schaller, G. (2010). Type-B response regulators ARR1 and ARR12 regulate expression of AtHKT1;1 and accumulation of sodium in *Arabidopsis* shoots. The Plant Journal *64*, 753–763.

Maurel, C., Simonneau, T., and Sutka, M. (2010). The significance of roots as hydraulic rheostats. Journal of Experimental Botany *61*, 3191–3198.

Merillon, J.-M., Ouelhazii, L., Doireau, P., Chenieux, J.-C., and Rideau, M. (1989). Metabolic changes and alkaloid production in habituated and non-habituated cells of *Catharanthus roseus* grown in hormone-free medium. Comparing hormone-deprived non-habituated cells with habituated cells. Journal of Plant Physiology *134*, 54–60.

Mira-Rodado, V., Veerabagu, M., Witthöft, J., Teply, J., Harter, K., and Desikan, R. (2012). Identification of two-component system elements downstream of AHK5 in the stomatal closure response of *Arabidopsis thaliana*. Plant Signaling & Behavior *7*, 1467–1476.

Miwa, K., Ishikawa, K., Terada, K., Yamada, H., Suzuki, T., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2007). Identification of amino acid substitutions that render the *Arabidopsis* cytokinin receptor Histidine Kinase AHK4 constitutively active. Plant and Cell Physiology *48*, 1809–1814.

Mizuno, T., and Nakamichi, N. (2005). Pseudo-response regulators (PRRs) or true oscillator components (TOCs). Plant and Cell Physiology *46*, 677 –685.

Mok, D.W., and Mok, M.C. (2001). Cytokinin metabolism and action. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology *52*, 89–118.

Monclus, R., Dreyer, E., Villar, M., Delmotte, F.M., Delay, D., Petit, J.-M., Barbaroux, C., Le Thiec, D., Bréchet, C., and Brignolas, F. (2006). Impact of drought on productivity and water use efficiency in 29 genotypes of *Populus deltoides* × *Populus nigra*. New Phytologist *169*, 765–777.

Monod, J., Changeux, J.-P., and Jacob, F. (1963). Allosteric proteins and cellular control systems. Journal of Molecular Biology *6*, 306–329.

Moore, J.P., Vicré-Gibouin, M., Farrant, J.M., and Driouich, A. (2008). Adaptations of higher plant cell walls to water loss: drought vs desiccation. Physiologia Plantarum *134*, 237–245.

Morabito, D., Caruso, A., Carpin, S., Carli, C., Laurans, F., Depierreux, C., Kahlem, G., and Label, P. (2006). Cambial activity of *Populus tremula* × *Populus alba* clone 717-1B4 in hydroponic culture. Canadian Journal of Forest Research *36*, 719–724.

Moubayidin, L., Perilli, S., Dello Ioio, R., Di Mambro, R., Costantino, P., and Sabatini, S. (2010). The rate of cell differentiation controls the *Arabidopsis* root meristem growth phase. Current Biology *20*, 1138–1143.

Moussatche, P., and Klee, H.J. (2004). Autophosphorylation activity of the *Arabidopsis* ethylene receptor multigene family. Journal Biological Chemistry *279*, 48734–48741.

Muller, B., Bourdais, G., Reidy, B., Bencivenni, C., Massonneau, A., Condamine, P., Rolland, G., Conéjéro, G., Rogowsky, P., and Tardieu, F. (2007). Association of specific expansins with growth in maize leaves is maintained under environmental, genetic, and developmental sources of variation. Plant Physiology *143*, 278–290.

Müller, B., and Sheen, J. (2008). Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. Nature *453*, 1094–1097.

Müller-Dieckmann, H.-J., Grantz, A.A., and Kim, S.-H. (1999). The structure of the signal receiver domain of the *Arabidopsis thaliana* ethylene receptor ETR1. Structure *7*, 1547–1556.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum *15*, 473–497.

Nakamura, A., Kakimoto, T., Imamura, A., Suzuki, T., Ueguchi, C., and Mizuno, T. (1999). Biochemical characterization of a putative cytokinin-responsive His-kinase, CKI1, from *Arabidopsis thaliana*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry *63*, 1627–1630.

Nakashima, K., Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1997). A nuclear gene, *erd1*, encoding a chloroplast-targeted Clp protease regulatory subunit homolog is not only induced by water stress but also developmentally up-regulated during senescence in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal *12*, 851–861.

Nakashima, K., Ito, Y., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. Plant Physiology *149*, 88–95.

Narusaka, Y., Nakashima, K., Shinwari, Z.K., Sakuma, Y., Furihata, T., Abe, H., Narusaka, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis* rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses. The Plant Journal *34*, 137–148.

Negi, J., Matsuda, O., Nagasawa, T., Oba, Y., Takahashi, H., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., Hashimoto, M., and Iba, K. (2008). CO2 regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. Nature *452*, 483–486.

Nieminen, K., Immanen, J., Laxell, M., Kauppinen, L., Tarkowski, P., Dolezal, K., Tähtiharju, S., Elo, A., Decourteix, M., Ljung, K., et al. (2008). Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar. Proceedings of the National Academy of Sciences *105*, 20032–20037.

Nishiyama, R., Watanabe, Y., Fujita, Y., Le, D.T., Kojima, M., Werner, T., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Kakimoto, T., et al. (2011). Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis. Plant Cell *23*, 2169–2183.

Nishiyama, R., Watanabe, Y., Leyva-Gonzalez, M.A., Ha, C.V., Fujita, Y., Tanaka, M., Seki, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Herrera-Estrella, L., et al. (2013). *Arabidopsis* AHP2, AHP3, and AHP5 histidine phosphotransfer proteins function as redundant negative regulators of drought stress response. Proceedings of the National Academy of Sciences *110*, 4840–4845.

Nonami, H., and Boyer, J.S. (1990a). Primary events regulating stem growth at low water potentials. Plant Physioly *93*, 1601–1609.

Nonami, H., and Boyer, J.S. (1990b). Wall extensibility and cell hydraulic conductivity decrease in enlarging stem tissues at low water potentials. Plant Physiology *93*, 1610–1619.

Nongpiur, R., Soni, P., Karan, R., Singla-Pareek, S.L., and Pareek, A. (2012). Histidine kinases in plants. Plant Signaling & Behavior *7:10*, 1230-1237.

Nylander, M., Svensson, J., Palva, E.T., and Welin, B.V. (2001). Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology *45*, 263–279.

Ogata, K., Sato, K., and Tahirov, T. (2003). Eukaryotic transcriptional regulatory complexes: cooperativity from near and afar. Current Opinion in Structural Biology *13*, 40–48.

Ostrander, D.B., and Gorman, J.A. (1999). The extracellular domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Sln1p membrane osmolarity sensor is necessary for kinase activity. Journal of Bacteriology *181*, 2527–2534.

Paillassa, E. (2013). Où trouver les cultivars de peuplier pour les plantations 2012-2013 ? Forêt-entreprise, 208, pp.59-61.

Panadero, J., Pallotti, C., Rodríguez-Vargas, S., Randez-Gil, F., and Prieto, J.A. (2006). A downshift in temperature activates the high osmolarity glycerol (HOG) pathway, which determines freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry *281*, 4638–4645.

Pareek, A., Singh, A., Kumar, M., Kushwaha, H.R., Lynn, A.M., and Singla-Pareek, S.L. (2006). Whole-genome analysis of *Oryza sativa* reveals similar architecture of two-component signaling machinery with *Arabidopsis*. Plant Physiology *142*, 380–397.

Park, A.K., Moon, J.H., Oh, J.S., Lee, K.S., and Chi, Y.M. (2013). Crystal structure of the response regulator spr1814 from *Streptococcus pneumoniae* reveals unique interdomain contacts among NarL family proteins. Biochemical and Biophysical Research Communications *434*, 65–69.

Park, S.-Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D.R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T.F., et al. (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases *via* the PYR/PYL family of START proteins. Science *324*, 1068–1071.

Pazy, Y., Motaleb, M.A., Guarnieri, M.T., Charon, N.W., Zhao, R., and Silversmith, R.E. (2010). Identical phosphatase mechanisms achieved through distinct modes of binding phosphoprotein substrate. Proceedings of the National Academy of Sciences *107*, 1924–1929.

Pekárová, B., Klumpler, T., Třísková, O., Horák, J., Jansen, S., Dopitová, R., Borkovcová, P., Papoušková, V., Nejedlá, E., Sklenář, V., et al. (2011). Structure and binding specificity of the receiver domain of sensor histidine kinase CKI1 from *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal *67*, 827–839.

Peng, K., Radivojac, P., Vucetic, S., Dunker, A.K., and Obradovic, Z. (2006). Length-dependent prediction of protein intrinsic disorder. BMC Bioinformatics *7*, 208.

Pham, J., and Desikan, R. (2012). Modulation of ROS production and hormone levels by AHK5 during abiotic and biotic stress signaling. Plant Signaling & Behavior *7*, 893–897.

Pham, J., Liu, J., Bennett, M.H., Mansfield, J.W., and Desikan, R. (2012). *Arabidopsis* histidine kinase 5 regulates salt sensitivity and resistance against bacterial and fungal infection. New Phytologist *194*, 168–180.

Phillips, T. (2008). Regulation of transcription and gene expression in eukaryotes. Nature Education *1*, 1.

Pilot, G., Lacombe, B., Gaymard, F., Chérel, I., Boucherez, J., Thibaud, J.-B., and Sentenac, H. (2001). Guard cell inward K+ channel activity in *Arabidopsis* involves expression of the twin channel subunits KAT1 and KAT2. Journal of Biological Chemistry *276*, 3215–3221.

Pils, B., and Heyl, A. (2009). Unraveling the evolution of cytokinin signaling. Plant Physiology *151*, 782–791.

Pischke, M.S., Jones, L.G., Otsuga, D., Fernandez, D.E., Drews, G.N., and Sussman, M.R. (2002). An *Arabidopsis* histidine kinase is essential for megagametogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences *99*, 15800–15805.

Posas, F., and Saito, H. (1998). Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. EMBO Journal *17*, 1385–1394.

Posas, F., Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., Thai, T.C., and Saito, H. (1996). Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. Cell *86*, 865–875.

Posas, F., Takekawa, M., and Saito, H. (1998). Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast. Current Opinion in Microbiology *1*, 175–182.

Pruitt, K.D., Tatusova, T., Klimke, W., and Maglott, D.R. (2009). NCBI reference sequences: current status, policy and new initiatives. Nucleic Acids Research *37*, D32–D36.

Punwani, J.A., and Kieber, J.J. (2010). Localization of the *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins is independent of cytokinin. Plant Signaling & Behavior *5*, 896–898.

Punwani, J.A., Hutchison, C.E., Schaller, G.E., and Kieber, J.J. (2010). The subcellular distribution of the *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins is independent of cytokinin signaling. The Plant Journal *62*, 473–482.

Qu, X., Hall, B.P., Gao, Z., and Schaller, G.E. (2007). A strong constitutive ethylene-response phenotype conferred on *Arabidopsis* plants containing null mutations in the ethylene receptors ETR1 and ERS1. BMC Plant Biology *7*, 3.

Rabin, R.S., and Stewart, V. (1993). Dual response regulators (NarL and NarP) interact with dual sensors (NarX and NarQ) to control nitrate- and nitrite-regulated gene expression in *Escherichia coli* K-12. Journal of Bacteriology *175*, 3259–3268.

Ramireddy, E., Brenner, W.G., Pfeifer, A., Heyl, A., and Schmülling, T. (2013). *In planta* analysis of a *cis*-regulatory cytokinin response motif in *Arabidopsis* and identification of a novel enhancer sequence. Plant and Cell Physiology *54*, 1079–1092.

Ramirez-Carvajal, G.A., Morse, A.M., and Davis, J.M. (2008). Transcript profiles of the cytokinin response regulator gene family in *Populus* imply diverse roles in plant development. New Phytologist *177*, 77–89.

Ramirez-Carvajal, G.A., Morse, A.M., Dervinis, C., and Davis, J.M. (2009). The cytokinin type-B response regulator PtRR13 is a negative regulator of adventitious root development in *Populus*. Plant Physiology *150*, 759–771.

Rashotte, A.M., Carson, S.D.B., To, J.P.C., and Kieber, J.J. (2003). Expression profiling of cytokinin action in *Arabidopsis*. Plant Physiology *132*, 1998 –2011.

Rashotte, A.M., Mason, M.G., Hutchison, C.E., Ferreira, F.J., Schaller, G.E., and Kieber, J.J. (2006). A subset of *Arabidopsis* AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences *103*, 11081–11085.

Reiser, V., Salah, S.M., and Ammerer, G. (2000). Polarized localization of yeast Pbs2 depends on osmostress, the membrane protein Sho1 and Cdc42. Nature Cell Biology *2*, 620–627.

Reiser, V., Raitt, D.C., and Saito, H. (2003). Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. The Journal of Cell Biology *161*, 1035–1040.

Ren, B., Liang, Y., Deng, Y., Chen, Q., Zhang, J., Yang, X., and Zuo, J. (2009). Genome-wide comparative analysis of type-A *Arabidopsis* response regulator genes by overexpression studies reveals their diverse roles and regulatory mechanisms in cytokinin signaling. Cell Research *19*, 1178–1190.

Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., -Z., C., Jiang, Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., et al. (2000). *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. Science *290*, 2105–2110.

Riefler, M., Novak, O., Strnad, M., and Schmülling, T. (2006). *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. The Plant Cell Online *18*, 40–54.

Robinson, V.L., Wu, T., and Stock, A.M. (2003). Structural analysis of the domain interface in DrrB, a response regulator of the OmpR/PhoB Subfamily. Journal of Bacteriology *185*, 4186–4194.

Rodríguez, F.I., Esch, J.J., Hall, A.E., Binder, B.M., Schaller, G.E., and Bleecker, A.B. (1999). A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. Science *283*, 996–998.

Romanov, G.A., Lomin, S.N., and Schmülling, T. (2006). Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. Journal of Experimental Botany *57*, 4051–4058.

Ross, E.J.H., Stone, J.M., Elowsky, C.G., Arredondo-Peter, R., Klucas, R.V., and Sarath, G. (2004). Activation of the *Oryza sativa* non-symbiotic haemoglobin-2 promoter by the cytokinin-regulated transcription factor, ARR1. Journal of Experimental Botany *55*, 1721–1731.

Roychoudhury, A., Paul, S., and Basu, S. (2013). Cross-talk between abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways during abiotic stress. Plant Cell Reports *32*, 985–1006.

Saab, I.N., Sharp, R.E., Pritchard, J., and Voetberg, G.S. (1990). Increased endogenous abscisic acid maintains primary root growth and inhibits shoot growth of maize seedlings at low water potentials. Plant Physiology *93*, 1329–1336.

Saito, H., and Posas, F. (2012). Response to hyperosmotic stress. Genetics *192*, 289–318.

Sakai, H., Hua, J., Chen, Q.G., Chang, C., Medrano, L.J., Bleecker, A.B., and Meyerowitz, E.M. (1998a). ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences *95*, 5812–5817.

Sakai, H., Aoyama, T., Bono, H., and Oka, A. (1998b). Two-component response regulators from *Arabidopsis thaliana* contain a putative DNA-binding motif. Plant and Cell Physiology *39*, 1232–1239.

Sakai, H., Aoyama, T., and Oka, A. (2000). *Arabidopsis* ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. The Plant Journal *24*, 703–711.

Sakai, H., Honma, T., Aoyama, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., and Oka, A. (2001). ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. Science *294*, 1519–1521.

Sakura, H., Kanei-Ishii, C., Nagase, T., Nakagoshi, H., Gonda, T.J., and Ishii, S. (1989). Delineation of three functional domains of the transcriptional activator encoded by the c-myb protooncogene. Proceedings of the National Academy of Sciences *86*, 5758–5762.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 267, 9289-9293.

Santiago, J., Rodrigues, A., Saez, A., Rubio, S., Antoni, R., Dupeux, F., Park, S.-Y., Márquez, J.A., Cutler, S.R., and Rodriguez, P.L. (2009). Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. The Plant Journal *60*, 575–588.

Sato, A., Sato, Y., Fukao, Y., Fujiwara, M., Umezawa, T., Shinozaki, K., Hibi, T., Taniguchi, M., Miyake, H., Goto, D.B., et al. (2009). Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. Biochemical Journal *424*, 439–448.

Sato, A., Gambale, F., Dreyer, I., and Uozumi, N. (2010). Modulation of the *Arabidopsis* KAT1 channel by an activator of protein kinase C in Xenopus laevis oocytes. FEBS Journal *277*, 2318–2328.

Sato, N., Kawahara, H., Toh-e, A., and Maeda, T. (2003). Phosphorelay-regulated degradation of the yeast Ssk1p response regulator by the ubiquitin-proteasome system. Molecular Cellular Biology *23*, 6662–6671.

Schaller, G.E., Ladd, A.N., Lanahan, M.B., Spanbauer, J.M., and Bleecker, A.B. (1995). The ethylene response mediator ETR1 from *Arabidopsis* forms a disulfide-linked dimer. Journal of Biological Chemistry *270*, 12526–12530.

Schaller, G.E., Shiu, S.-H., and Armitage, J.P. (2011). Two-component systems and their co-option for eukaryotic signal transduction. Current Biology *21*, R320–R330.

Scharein, B., and Groth, G. (2011). Phosphorylation alters the interaction of the *Arabidopsis* phosphotransfer protein AHP1 with its sensor kinase ETR1. PLoS ONE *6*, e24173.

Scharein, B., Voet-van-Vormizeele, J., Harter, K., and Groth, G. (2008). Ethylene signaling: Identification of a putative ETR1–AHP1 phosphorelay complex by fluorescence spectroscopy. Analytical Biochemistry *377*, 72–76.

Schroeder, J.I., Kwak, J.M., and Allen, G.J. (2001). Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. Nature *410*, 327–330.

Schweighofer, A., Hirt, H., and Meskiene, I. (2004). Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. Trends in Plant Science *9*, 236–243.

Shankarnarayan, S., Malone, C.L., Deschenes, R.J., and Fassler, J.S. (2008). Modulation of yeast Sln1 kinase activity by the Ccw12 cell wall protein. Journal of Biological Chemistry *283*, 1962–1973.

Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997). Gene expression and signal transduction in water-stress response. Plant Physiology *115*, 327–334.

Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. Current Opinion in Plant Biology *3*, 217–223.

Shkolnik-Inbar, D., and Bar-Zvi, D. (2010). ABI4 mediates abscisic acid and cytokinin inhibition of lateral root formation by reducing polar auxin transport in *Arabidopsis*. Plant Cell *22*, 3560–3573.

Shortridge, M.D., Triplet, T., Revesz, P., Griep, M.A., and Powers, R. (2011). Bacterial protein structures reveal phylum dependent divergence. Computational Biology and Chemistry *35*, 24–33.

Shulaev, V., Cortes, D., Miller, G., and Mittler, R. (2008). Metabolomics for plant stress response. Physiologia Plantarum *132*, 199–208.

Simms, S.A., Keane, M.G., and Stock, J. (1985). Multiple forms of the CheB methylesterase in bacterial chemosensing. Journal of Biological Chemistry *260*, 10161–10168.

Simon-Plas, F., Perraki, A., Bayer, E., Gerbeau-Pissot, P., and Mongrand, S. (2011). An update on plant membrane rafts. Current Opinion in Plant Biology *14*, 642–649.

Simpson, S.D., Nakashima, K., Narusaka, Y., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Two different novel *cis*-acting elements of erd1, a clpA homologous *Arabidopsis* gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. The Plant Journal *33*, 259–270.

Singh, G., and Kumar, R. (2012). Genome-wide *insilico* analysis of plant two component signaling system in woody model plant *Populus trichocarpa*. Research in Plant Biology *2*, 13–23.

Skerker, J.M., Prasol, M.S., Perchuk, B.S., Biondi, E.G., and Laub, M.T. (2005). Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a Bacterium: a system-level analysis. PLoS Biology *3*, e334.

Skerker, J.M., Perchuk, B.S., Siryaporn, A., Lubin, E.A., Ashenberg, O., Goulian, M., and Laub, M.T. (2008). Rewiring the specificity of two-component signal transduction systems. Cell *133*, 1043–1054.

Spíchal, L., Rakova, N.Y., Riefler, M., Mizuno, T., Romanov, G.A., Strnad, M., and Schmülling, T. (2004). Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. Plant and Cell Physiology *45*, 1299–1305.

Sreerama, N., and Woody, R.W. (2000). Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. Analytical Biochemistry *287*, 252–260.

Stanton, B.J. (2009). The domestication and conservation of *Populus* genetic resources (Chapter 4a). In: Poplars and willows in the world: meeting the needs of society and the environment. Isebrands JG, Richardson J. (eds). FAO/IPC, Rome, Italy, 86p.

Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N. (2000). Two-component signal transduction. Annual Review of Biochemistry *69*, 183–215.

Stolz, A., Riefler, M., Lomin, S.N., Achazi, K., Romanov, G.A., and Schmülling, T. (2011). The specificity of cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors. The Plant Journal *67*, 157–168.

Stracke, R., Werber, M., and Weisshaar, B. (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. Current Opinion in Plant Biology *4*, 447–456.

Sugawara, H., Kawano, Y., Hatakeyama, T., Yamaya, T., Kamiya, N., and Sakakibara, H. (2005a). Crystal structure of the histidine-containing phosphotransfer protein ZmHP2 from maize. Protein Science *14*, 202–208.

Sugawara, H., Yamaya, T., and Sakakibara, H. (2005b). Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of the histidine-containing phosphotransfer protein ZmHP1 from maize. Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications *61*, 366–368.

Sun, Y., Solomon, S., Dai, A., and Portmann, R.W. (2007). How often will it rain? Journal of Climate *20*, 4801–4818.

Suzuki, T., Imamura, A., Ueguchi, C., and Mizuno, T. (1998). Histidine-containing Phosphotransfer (HPt) signal transducers implicated in His-to-Asp phosphorelay in *Arabidopsis*. Plant and Cell Physiology *39*, 1258–1268.

Suzuki, T., Sakurai, K., Imamura, A., Nakamura, A., Ueguchi, C., and Mizuno, T. (2000). Compilation and characterization of Histidine-containing Phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in plants: AHP signal transducers of *Arabidopsis thaliana*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry *64*, 2486–2489.

Suzuki, T., Miwa, K., Ishikawa, K., Yamada, H., Aiba, H., and Mizuno, T. (2001). The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. Plant and Cell Physioly *42*, 107–113.

Suzuki, T., Ishikawa, K., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2002). An *Arabidopsis* Histidine-Containing Phosphotransfer (HPt) factor implicated in phosphorelay signal transduction: overexpression of AHP2 in plants results in hypersensitiveness to cytokinin. Plant and Cell Physiology *43*, 123–129.

Tajima, Y., Imamura, A., Kiba, T., Amano, Y., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2004). Comparative studies on the type-B response regulators revealing their distinctive properties in the His-to-Asp phosphorelay signal transduction of *Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Physiology *45*, 28–39.

Tamai, H., Iwabuchi, M., and Meshi, T. (2002). *Arabidopsis* GARP transcriptional activators interact with the Pro-rich activation domain shared by G-Box-binding bZIP Factors. Plant and Cell Physiology *43*, 99–107.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution *28*, 2731–2739.

Tan, B.-C., Joseph, L.M., Deng, W.-T., Liu, L., Li, Q.-B., Cline, K., and McCarty, D.R. (2003). Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-*cis* epoxycarotenoid dioxygenase gene family. The Plant Journal *35*, 44–56.

Tanaka, Y., Suzuki, T., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2004). Comparative studies of the AHP histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in *Arabidopsis thaliana*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry *68*, 462–465.

Tanigawa, M., Kihara, A., Terashima, M., Takahara, T., and Maeda, T. (2012). Sphingolipids regulate the yeast high-osmolarity glycerol response pathway. Molecular and Cellular Biology *32*, 2861–2870.

Taniguchi, M., Kiba, T., Sakakibara, H., Ueguchi, C., Mizuno, T., and Sugiyama, T. (1998). Expression of *Arabidopsis* response regulator homologs is induced by cytokinins and nitrate. FEBS Letters *429*, 259–262.

Taniguchi, M., Sasaki, N., Tsuge, T., Aoyama, T., and Oka, A. (2007). ARR1 directly activates cytokinin response genes that encode proteins with diverse regulatory functions. Plant and Cell Physiology *48*, 263 –277.

Tao, W., Deschenes, R.J., and Fassler, J.S. (1999). Intracellular glycerol levels modulate the activity of Sln1p, a *Saccharomyces cerevisiae* two-component regulator. Journal of Biological Chemistry *274*, 360–367.

Tao, W., Malone, C.L., Ault, A.D., Deschenes, R.J., and Fassler, J.S. (2002). A cytoplasmic coiled-coil domain is required for histidine kinase activity of the yeast osmosensor, SLN1. Molecular Microbiology *43*, 459–473.

Tardieu, F., and Simonneau, T. (1998). Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. Journal of Experimental Botany *49*, 419–432.

Tardieu, F., Cruiziat, P., Durant, J.-L., Triboï, E., and Zivy, M. (2007). ESCo "sécheresse et agriculture", Rapport d'expertise réalisé par l'INRA à la demande du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, pp. 242-257.

Tardieu, F., Parent, B., and Simonneau, T. (2010). Control of leaf growth by abscisic acid: hydraulic or non-hydraulic processes? Plant, Cell & Environment *33*, 636–647.

Tardieu, F., Granier, C., and Muller, B. (2011). Water deficit and growth. Co-ordinating processes without an orchestrator? Current Opinion in Plant Biology *14*, 283–289.

Tatebayashi, K., Tanaka, K., Yang, H.-Y., Yamamoto, K., Matsushita, Y., Tomida, T., Imai, M., and Saito, H. (2007). Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. EMBO Journal *26*, 3521–3533.

Thivolle-Cazat, A. (2003). Disponibilité en bois de peuplier en France de 2002 à 2020. Informations Forêt AFOCEL no. 1, fiche 662. 6p.

To, J.P.C., and Kieber, J.J. (2008). Cytokinin signaling: two-components and more. Trends in Plant Science *13*, 85–92.

To, J.P.C., Haberer, G., Ferreira, F.J., Deruère, J., Mason, M.G., Schaller, G.E., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Kieber, J.J. (2004). Type-A *Arabidopsis* response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. Plant Cell *16*, 658–671.

To, J.P.C., Deruère, J., Maxwell, B.B., Morris, V.F., Hutchison, C.E., Ferreira, F.J., Schaller, G.E., and Kieber, J.J. (2007). Cytokinin regulates type-A *Arabidopsis* response regulator activity and protein stability *via* two-component phosphorelay. The Plant Cell Online *19*, 3901 –3914.

Toillon, J., Fichot, R., Dallé, E., Berthelot, A., Brignolas, F., and Marron, N. (2013). Planting density affects growth and water-use efficiency depending on site in *Populus deltoides* × *P. nigra*. Forest Ecology and Management *304*, 345–354.

Tompa, P. (2002). Intrinsically unstructured proteins. Trends in Biochemical Sciences *27*, 527–533.

Toro-Roman, A., Mack, T.R., and Stock, A.M. (2005). Structural analysis and solution studies of the activated regulatory domain of the response regulator ArcA: a symmetric dimer mediated by the α4-β5-α5 face. Journal of Molecular Biology *349*, 11–26.

Tran, L.-S.P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S.D., Fujita, Y., Maruyama, K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive *cis*-element in the early responsive to dehydration stress 1 Promoter. Plant Cell *16*, 2481–2498.

Tran, L.-S.P., Urao, T., Qin, F., Maruyama, K., Kakimoto, T., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences *104*, 20623 –20628.

Triezenberg, S. (1995). Structure and function of transcriptional activation domains. Current Opinion in Genetics & Development *5*, 190–196.

Tsai, Y.-C., Weir, N.R., Hill, K., Zhang, W., Kim, H.J., Shiu, S.-H., Schaller, G.E., and Kieber, J.J. (2012). Characterization of genes involved in cytokinin signaling and metabolism from rice. Plant Physiology *158*, 1666–1684.

Tuskan, G.A., DiFazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., et al. (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). Science *313*, 1596–1604.

Ueguchi, C., Koizumi, H., Suzuki, T., and Mizuno, T. (2001). Novel family of sensor Histidine Kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiology *42*, 231–235.

Ulrich, L.E., Koonin, E.V., and Zhulin, I.B. (2005). One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. Trends in Microbiology *13*, 52–56.

Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T., and Shinozaki, K. (2009). Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences *106*, 17588–17593.

Umezawa, T., Nakashima, K., Miyakawa, T., Kuromori, T., Tanokura, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010). Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. Plant Cell Physiology *51*, 1821–1839.

Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. Proceedings of the National Academy of Sciences *97*, 11632– 11637.

Urao, T., Yakubov, B., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1998). Stress-responsive expression of genes for two-component response regulator-like proteins in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Letters *427*, 175–178.

Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T., and Shinozaki, K. (1999). A transmembrane hybrid-type Histidine Kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. Plant Cell *11*, 1743–1754.

Urao, T., Miyata, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2000). Possible His to Asp phosphorelay signaling in an *Arabidopsis* two-component system. FEBS Letters *478*, 227–232.

Vahisalu, T., Kollist, H., Wang, Y.-F., Nishimura, N., Chan, W.-Y., Valerio, G., Lamminmäki, A., Brosché, M., Moldau, H., Desikan, R., et al. (2008). SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. Nature *452*, 487–491.

Varughese, K.I. (2005). Conformational changes of Spo0F along the phosphotransfer pathway. Journal of Bacteriology *187*, 8221–8227.

Vaseva, I., Todorova, D., Malbeck, J., Trávníčková, A., and Macháčková, I. (2008). Response of cytokinin pool and cytokinin oxidase/dehydrogenase activity to abscisic acid exhibits organ specificity in peas. Acta Physiologia Plantarum *30*, 151–155.

Veerabagu, M. (2011). Molecular and functional characterization of the *Arabidopsis thaliana* response regulator ARR18. Thesis, Tübingen university, Germany, p97.

Veerabagu, M., Elgass, K., Kirchler, T., Huppenberger, P., Harter, K., Chaban, C., and Mira-Rodado, V. (2012). The *Arabidopsis* B-type response regulator 18 (ARR18) homomerizes and positively regulates cytokinin responses. The Plant Journal *72*, 721–731.

Verslues, P.E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., and Zhu, J.-K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. The Plant Journal *45*, 523–539.

Vicré, M., Farrant, J.M., and Driouich, A. (2004). Insights into the cellular mechanisms of desiccation tolerance among angiosperm resurrection plant species. Plant, Cell & Environment *27*, 1329–1340.

Waadt, R., Schmidt, L.K., Lohse, M., Hashimoto, K., Bock, R., and Kudla, J. (2008). Multicolor bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous formation of alternative CBL/CIPK complexes *in planta*. The Plant Journal *56*, 505–516.

Waldburger, C.D. (2003). His-Asp signal transduction *via* a monomeric Histidine phosphotransfer protein. Structure *11*, 1461–1462.

Wang, Y., Wang, T., Li, K., and Li, X. (2008). Genetic analysis of involvement of ETR1 in plant response to salt and osmotic stress. Plant Growth Regulation *54*, 261–269.

Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., and Barton, G.J. (2009). Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. Bioinformatics *25*, 1189–1191.

Werner, T., Nehnevajova, E., Köllmer, I., Novák, O., Strnad, M., Krämer, U., and Schmülling, T. (2010). Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in *Arabidopsis* and Tobacco. Plant Cell *22*, 3905–3920.

Westgate, M.E., and Boyer, J.S. (1985). Osmotic adjustment and the inhibition of leaf, root, stem and silk growth at low water potentials in maize. Planta *164*, 540–549.

Whitmore, L., and Wallace, B.A. (2004). DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. Nucleic Acids Research *32*, W668–W673.

Wiederstein, M., and Sippl, M.J. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. Nucleic Acids Research *35*, W407–W410.

Wilkinson, S., and Davies, W.J. (2002). ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. Plant, Cell & Environment *25*, 195–210.

Wilkinson, S., and Davies, W.J. (2010). Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. Plant, Cell & Environment *33*, 510–525.

Wohlbach, D.J., Quirino, B.F., and Sussman, M.R. (2008). Analysis of the *Arabidopsis* Histidine Kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation. Plant Cell *20*, 1101–1117.

Wolanin, P.M., Thomason, P.A., and Stock, J.B. (2002). Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. Genome Biology *3*, reviews3013.1-3013.8

Wormit, A., Traub, M., FlöRchinger, M., Neuhaus, H.E., and MöHlmann, T. (2004). Characterization of three novel members of the *Arabidopsis thaliana* equilibrative nucleoside transporter (ENT) family. Biochemical Journal *383*, 19.

Wormit, A., Butt, S.M., Chairam, I., McKenna, J.F., Nunes-Nesi, A., Kjaer, L., O'Donnelly, K., Fernie, A.R., Woscholski, R., Barter, M.C.L., et al. (2012). Osmosensitive changes of carbohydrate metabolism in response to cellulose biosynthesis inhibition. Plant Physiology *159*, 105–117.

Wulfetange, K., Lomin, S.N., Romanov, G.A., Stolz, A., Heyl, A., and Schmülling, T. (2011). The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum. Plant Physiology *156*, 1808–1818.

Wurgler-Murphy, S.M., and Saito, H. (1997). Two-component signal transducers and MAPK cascades. Trends in Biochemical Sciences *22*, 172–176.

Xie, F., Liu, Q., and Wen, C.-K. (2006). Receptor signal output mediated by the ETR1 N terminus is primarily subfamily I receptor dependent. Plant Physiology *142*, 492–508.

Xu, Q., Porter, S.W., and West, A.H. (2003). The yeast YPD1/SLN1 complex: insights into molecular recognition in two-component signaling systems. Structure *11*, 1569–1581.

Yamada, H., Suzuki, T., Terada, K., Takei, K., Ishikawa, K., Miwa, K., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2001). The *Arabidopsis* AHK4 Histidine Kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. Plant Cell Physiology *42*, 1017–1023.

Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1994). A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. Plant Cell *6*, 251–264.

Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2005). Organization of *cis*-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. Trends in Plant Science *10*, 88–94.

Yang, Z.-B., Eticha, D., Führs, H., Heintz, D., Ayoub, D., Dorsselaer, A.V., Schlingmann, B., Rao, I.M., Braun, H.-P., and Horst, W.J. (2013). Proteomic and phosphoproteomic analysis of polyethylene glycol-induced osmotic stress in root tips of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal of Experimental Botany *64*, 5569-5586.

Yokoyama, A., Yamashino, T., Amano, Y.-I., Tajima, Y., Imamura, A., Sakakibara, H., and Mizuno, T. (2007). Type-B ARR transcription factors, ARR10 and ARR12, are implicated in cytokinin-mediated regulation of protoxylem differentiation in roots of *Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Physiology *48*, 84 –96.

Yonekura-Sakakibara, K., Kojima, M., Yamaya, T., and Sakakibara, H. (2004). Molecular characterization of cytokinin-responsive Histidine Kinases in maize. Differential Ligand Preferences and Response to *cis*-Zeatin. Plant Physiology *134*, 1654–1661.

Yoo, S.-D., Cho, Y.-H., Tena, G., Xiong, Y., and Sheen, J. (2008). Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C2H4 signalling. Nature *451*, 789–795.

Yoshida, R., Hobo, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Takahashi, F., Aronso, J., Ecker, J.R., and Shinozaki, K. (2002). ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. Plant and Cell Physiology *43*, 1473–1483.

Yoshida, T., Fujita, Y., Sayama, H., Kidokoro, S., Maruyama, K., Mizoi, J., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010). AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. The Plant Journal *61*, 672–685.

Zargarian, L., Le Tilly, V., Jamin, N., Chaffotte, A., Gabrielsen, O.S., Toma, F., and Alpert, B. (1999). Myb–DNA Recognition: Role of tryptophan residues and structural changes of the minimal DNA binding domain of c-Myb. Biochemistry *38*, 1921–1929.

Zhang, Y., Li, J., Yu, F., Cong, L., Wang, L., Burkard, G., and Chai, T. (2006). Cloning and expression analysis of SKn-type dehydrin gene from bean in response to heavy metals. Molecular Biotechnology *32*, 205–217.

Zhao, X.-C., and Schaller, G.E. (2004). Effect of salt and osmotic stress upon expression of the ethylene receptor ETR1 in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Letters *562*, 189–192.

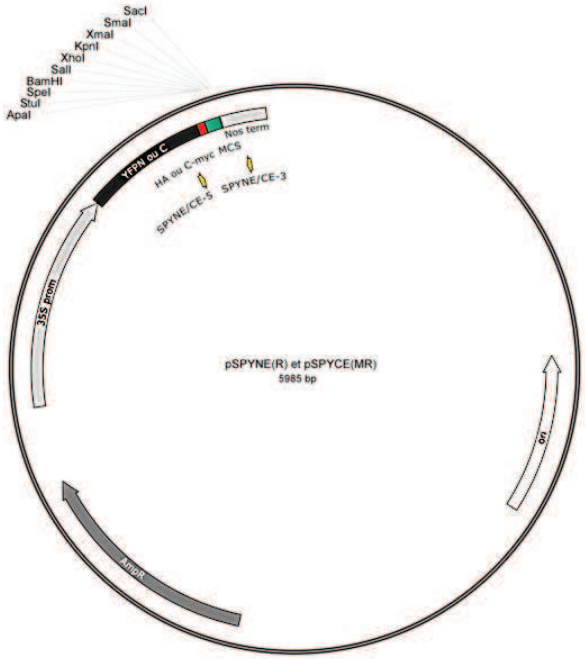
Zhao, R., Collins, E.J., Bourret, R.B., and Silversmith, R.E. (2002). Structure and catalytic mechanism of the *E. coli* chemotaxis phosphatase CheZ. Nature Structural and Molecular Biology *9*, 570–575.

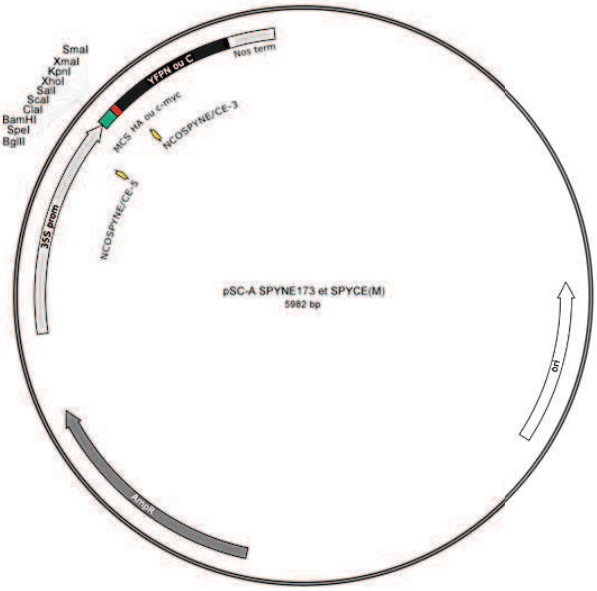
Zhao, X., Copeland, D.M., Soares, A.S., and West, A.H. (2008). Crystal structure of a complex between the phosphorelay protein YPD1 and the response regulator domain of SLN1 bound to a phosphoryl analog. Journal of Molecular Biology *375*, 1141–1151.

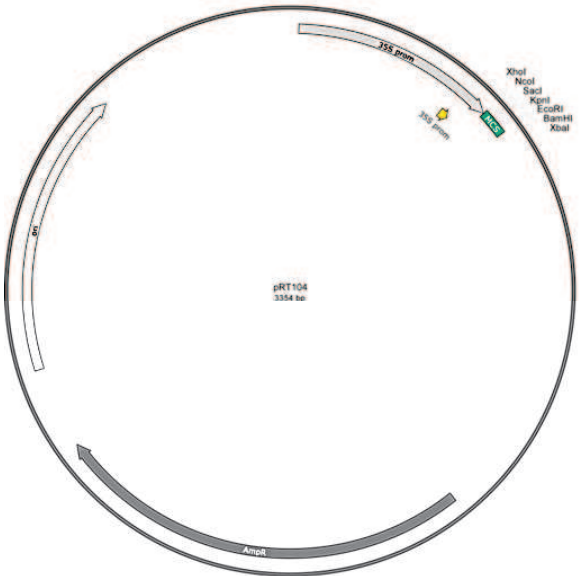
Zürcher, E., Tavor-Deslex, D., Lituiev, D., Enkerli, K., Tarr, P.T., and Müller, B. (2013). A robust and sensitive synthetic sensor to monitor the transcriptional output of the cytokinin signaling network *in planta*. Plant Physiology *161*, 1066–1075.

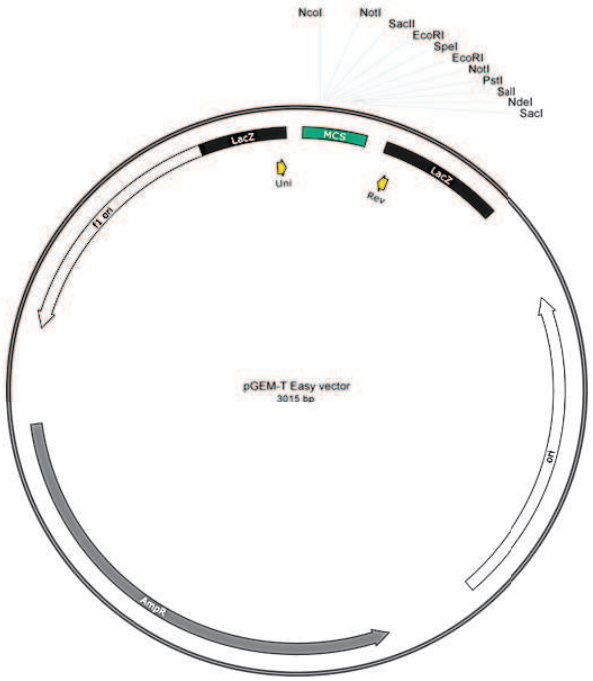
Annexes

ANNEXE 1 – Cartes des différents vecteurs utilisés pour cette étude


SacI
SmaI
XmaI
KpnI
XhoI
SalI
BamHI
SpeI
StuI
ApaI
YFPN ou C
Nos term
HA ou C-myc MCS
SPYNE/CE-5
SPYNE/CE-3
35S prom
pSPYNE(R) et pSPYCE(MR)
5985 bp
ori
AmpR


SmaI
XmaI
KpnI
XhoI
SalI
ScaI
ClaI
BamHI
SpeI
BglII
YFPN ou C
Nos term
MCS HA ou c-myc
NCOSPYNE/CE-3
NCOSPYNE/CE-5
35S prom
pSC-A SPYNE173 et SPYCE(M)
5982 bp
ori
AmpR


35S prom
XhoI
NcoI
SacI
KpnI
EcoRI
BamHI
XbaI
MCS
35S prom
ori
pRT104
3354 bp
AmpR


NcoI
NotI
SacII
EcoRI
SpeI
EcoRI
NotI
PstI
SalI
NdeI
SacI
LacZ
MCS
LacZ
Uni
Rev
f1 ori
pGEM-T Easy vector
3015 bp
ori
AmpR

NheI
Nos term
MCS His tag
3-pCambia
5-GFP
GFP
ori
SpeI
BglII
MCS
3-GFp
5-pCambia
35S prom
pSC-A cassette GFP
4785 bp
AmpR
NheI
Nos term
MCS His tag
3-pCambia
YFP
ori
SpeI
BglII
MCS
5-pCambia
35S prom
pSC-A cassette YFP
4593 bp
AmpR
NheI
Nos term
MCS His tag
3-pCambia
ori
GUS
pSC-A cassette GUS
6585 bp
5-pCambia
MCS
SpeI
BglII
35S prom
AmpR

ANNEXE 2 – Liste des amorces plasmidiques utilisées

Amorces	Séquence 5'-3'	Tm
Uni	TGTAAAACGACGGCCAGT	55°C
Rev	CAGGAAACAGCTATGACC	55°C
T7 prom	TAATACGACTCACTA	55°C
T7 term	TATGCTAGTTATTGCTCAG	55°C
ACT3	GAAAGAAATTGAGATGGTGCACG	55°C
LexA5	ATTGAAGGGCTGGCGGTT	55°C
LexA3	ATCATAAATCATAAGAAATTCGCC	55°C
SPYCE-5	CAAAGACCCCAACGAGAAGC	60°C
SPYCE-3	ATATGATAATCATCGCAAGACC	60°C
SPYNE-5	CAACGTCTATATCATGGCCG	60°C
SPYNE-3	ATCGCAAGACCGGCAACAGG	60°C
NCOSPYCE-5	TGGATTGATGTGATATCTCC	56°C
NCOSPYCE-3	CTTGAAGTTCACCTTGATGC	56°C
NCOSPYNE-5	ATGTGATATCTCCACTGACG	56°C
NCOSPYNE-3	TGCTCACCATAAGATCCTCC	56°C
35S-Prom	ACGCACAATCCCACTATCCTT	62°C
pGEX-5'	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	62°C
pGEX-3'	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	62°C
5-pCambia	GATGTGATATCTCCACTGACG	62°C
3-pCambia	ATATGATAATCATCGCAAGACC	60°C
5-GFP	TCCCAACGAAAAGAGAGACC	60°C
3-GFP	GCATCACCTTCACCCTCTCC	64°C

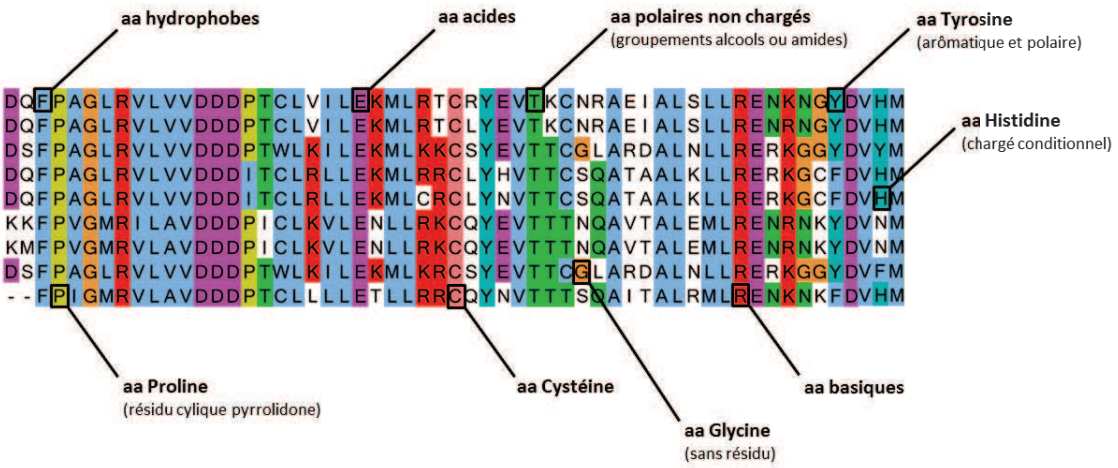
ANNEXE 3 – Séquence complète en acides nucléiques et aminés du RR13

```
ATGTCAACGGCTAGTTCTGGTGGTGTTTCAGATCAGTTCCCGGCAGGGTTACGTGTGTTGGTTGTTGATGACGATCCAACATGTCTTGTGATCTTGGAGAAGATGCTTAGGACCTGCCTTTATGAAGTC
 M  S  T  A  S  S  G  G  V  S  D  Q  F  P  A  G  L  R  V  L  V  V  D  D  D  P  T  C  L  V  I  L  E  K  M  L  R  T  C  L  Y  E  V
ACAAAGTGTAACCGAGCAGAGATTGCGTTGTCTTTGCTTCGAGAGAACAGAAACGGGTACGATATTGTTATAAGTGATGTCCACATGCCAGATATGGATGGATTTAAACTTCTCGAGCTTATTGGGCTA
 T  K  C  N  R  A  E  I  A  L  S  L  L  R  E  N  R  N  G  Y  D  I  V  I  S  D  V  H  M  P  D  M  D  G  F  K  L  L  E  L  I  G  L
GAGATGGATCTGCCTGTTATCATGATGTCAGCTGATGATGGGAAAAATGTGGTCATGAAAGGTGTAACTCATGGTGCTTGTGATTACCTGATTAAACCGATTCGCATTGAGGCACTTAAGAACATATGG
 E  M  D  L  P  V  I  M  M  S  A  D  D  G  K  N  V  V  M  K  G  V  T  H  G  A  C  D  Y  L  I  K  P  I  R  I  E  A  L  K  N  I  W
CAGCACGTGGTTCGGAAGAGAAAGAACGAGTGGAAGGATTTGGAACAATCAGGGAGTGTAGAAGAGGGAGGAGATAGGCCGCAGAAACAATCTGAAGATGCAGATTACTCATCCTCAGCAAACGAAGGA
 Q  H  V  V  R  K  R  K  N  E  W  K  D  L  E  Q  S  G  S  V  E  E  G  G  D  R  P  Q  K  Q  S  E  D  A  D  Y  S  S  S  A  N  E  G
AGTTGGAAAAACTCAAAGAGGAGAAAAGATGAGGAAGAAGAAGCAGATGAGAGGGATGATACATCCACATTAAAGAAACCACGTGTGGTTTGGTCAGTTGAACTTCACCAACAGTTTGTTGCAGCAGTT
 S  W  K  N  S  K  R  R  K  D  E  E  E  E  A  D  E  R  D  D  T  S  T  L  K  K  P  R  V  V  W  S  V  E  L  H  Q  Q  F  V  A  A  V
AATCAACTAGGAATTGACAAGGCAGTTCCCAAGAAAATTCTGGAGTTGATGAATGTTCCTGGGCTCACCAGAGAAAATGTTGCCAGCCACCTCCAGAAATATCGCTTGTATCTTAGAAGGTTAAGTGGG
 N  Q  L  G  I  D  K  A  V  P  K  K  I  L  E  L  M  N  V  P  G  L  T  R  E  N  V  A  S  H  L  Q  K  Y  R  L  Y  L  R  R  L  S  G
GTTTCACAGCACCAGAGCGGTATGGGCAACTCTTTTATCAGCCCGCAAGAAGCAACATATGGTCCATTGTCCTCGCTTAATGGGCTTGACCTTCAAACTCTTGCTGCTGCTGGTCAAATCCCTGCACAA
 V  S  Q  H  Q  S  G  M  G  N  S  F  I  S  P  A  T  Y  G  Q  E  P  L  S  S  L  N  G  L  D  L  Q  T  L  A  A  A  G  Q  I  P  A  Q
ACTCTTGCTGCTGCTGGTCAAATCCCTGCACAAAGCCTCGCCACACTGCAAGCAGCCGGACTTGGTCGATCAACAGCAAAGCCTAGAATGCCCATGCCAATTGTTGATCAGAGGAACCTTTTCAGCTTT
 T  L  A  A  A  G  Q  I  P  A  Q  S  L  A  T  L  Q  A  A  G  L  G  R  S  T  A  K  P  R  M  P  M  P  I  V  D  Q  R  N  L  F  S  F
GAAAACCCAAAATTAAGATTTGGGGAGGGGCAACAGCAACATTTGAACAATGGTAAGCAAATAAACTTACTTCATGGAATCCCAACCACAATGGAGCCGAAGCAGCTAGCCGACTTGCACCATTCAGCA
 E  N  P  K  L  R  F  G  E  G  Q  Q  Q  H  L  N  N  G  K  Q  I  N  L  L  H  G  I  P  T  T  M  E  P  K  Q  L  A  D  L  H  H  S  A
CAGTCCCTTGGGAGCATGAATATGCAACTCAATGCCCATGGAGACCAGAGTGGTCAGAGTGGTTCTTTGCTGATGCAGATGTCTCAACAGCAGTCTAGGGGCCAGATACTAAATGAAACTACCAGCAGC
 Q  S  L  G  S  M  N  M  Q  L  N  A  H  G  D  Q  S  G  Q  S  G  S  L  L  M  Q  M  S  Q  Q  Q  S  R  G  Q  I  L  N  E  T  T  S  S
CAAGTTCCCAGACTCCCATCGTCCATAGGGCAGCCTATTGTAACTAATGCAATTGGCAGTGGGGTCTTGGCAAGAAATGGATTAGCTGAAAATGGCAGAGGAACAGGATTCAATCCAGTTTCACAATCA
 Q  V  P  R  L  P  S  S  I  G  Q  P  I  V  T  N  A  I  G  S  G  V  L  A  R  N  G  L  A  E  N  G  R  G  T  G  F  N  P  V  S  Q  S
TCTCCTACGTTGAATTTCCCCTGGAACACCACAGCTGAATTGACAGCCACTAGTTTTGCTCTTGGAAGTGCTCCTGGGGTGCCTAGTCTCACATCCAAGGGGACATTTCCCGAAGATATTAGCTCAGAA
 S  P  T  L  N  F  P  W  N  T  T  A  E  L  T  A  T  S  F  A  L  G  S  A  P  G  V  P  S  L  T  S  K  G  T  F  P  E  D  I  S  S  E
ATGAAAGGACCTGGAGGATTCATCATGCCAAGTTATGATATTTTTAGTGACTTGCAACACCATAGATCCCATGATTGGGAGTTGCAGAATGTAGGCATGGCCTTCAATGGTTCTCAGCAATCCAACTCT
 M  K  G  P  G  G  F  I  M  P  S  Y  D  I  F  S  D  L  Q  H  H  R  S  H  D  W  E  L  Q  N  V  G  M  A  F  N  G  S  Q  Q  S  N  S
CTGCAAAGCAATGTCGATGTGGCATCATCAGTATTAGCTCATCAGGGCTTCTCTCCTAGCCAAAGTAATGGACAGGGCAGGAATATATCTGCTGTCAGCAAGCCAATATTTTCAGCAGGAGATGCAACG
 L  Q  S  N  V  D  V  A  S  S  V  L  A  H  Q  G  F  S  P  S  Q  S  N  G  Q  G  R  N  I  S  A  V  S  K  P  I  F  S  A  G  D  A  T
GGCCATGTGAATGCACAAAGTCTCGGACAACCTCTCAACACCTTTTTTGCCGAGAATTTAGTGAGAGTTAAGACTGAAAGAGTCCCTGATGCAAACCTTCAAACTACCCTCTTTAATGAACAGTTTGGT
 G  H  V  N  A  Q  S  L  G  Q  P  L  N  T  F  F  A  E  N  L  V  R  V  K  T  E  R  V  P  D  A  N  L  Q  T  T  L  F  N  E  Q  F  G
CAGGAAGATCTCATGAGTGCGCTTCTCAAACAACAGCAGCAGGCAGGCATTGGACCAGCTGAAATTGAATTCGACTTCGATGGGTATTCCCTGGATAATATTCCTGTGTAG
 Q  E  D  L  M  S  A  L  L  K  Q  Q  Q  Q  A  G  I  G  P  A  E  I  E  F  D  F  D  G  Y  S  L  D  N  I  P  V  -
```

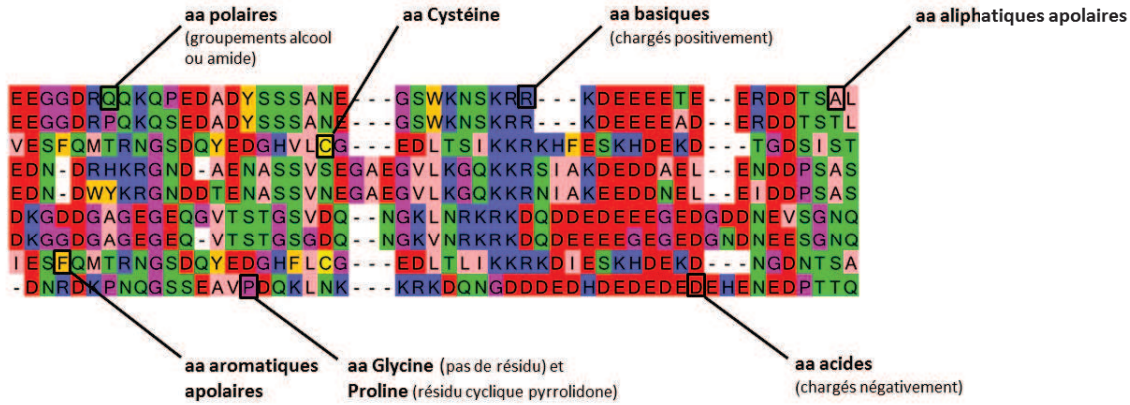
Le domaine régulateur (DDK) et le domaine GARP sont représentés respectivement en vert et en violet. La partie C-terminale est représentée en noir. La séquence du RR13-ΔDDK est soulignée.

ANNEXE 4 – Les différents masques d'affichage de Jalview 2.8 utilisés dans cette étude

Masque d'affichage de couleur Clustalx



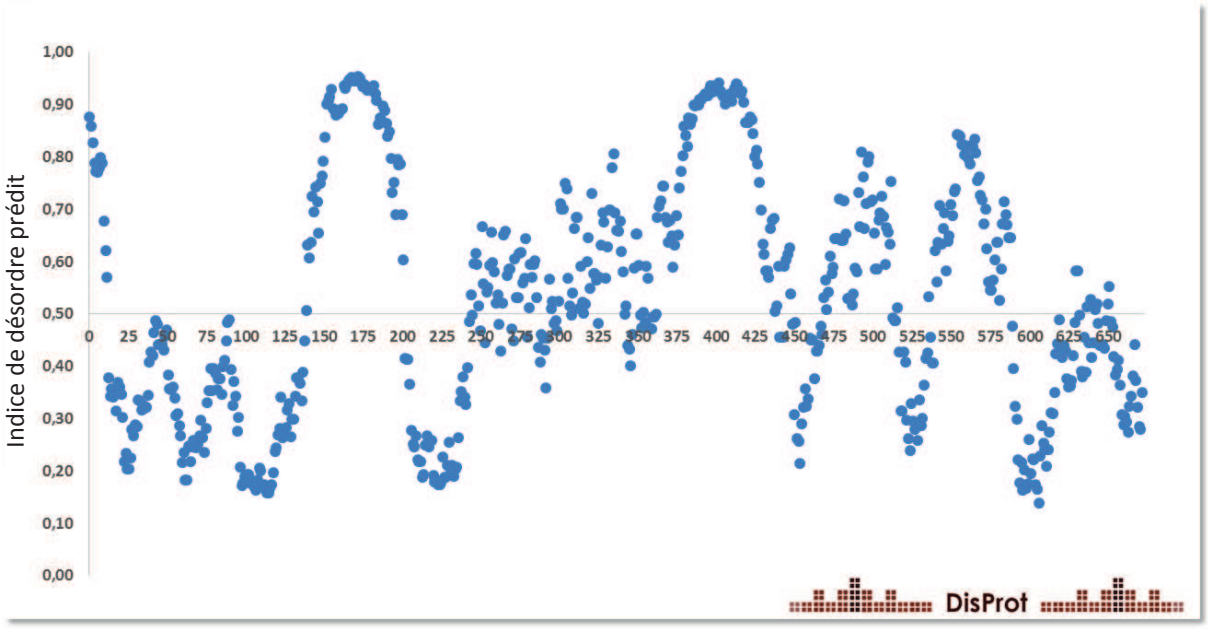
Masque d'affichage de couleur Taylor



ANNEXE 5 – Tableau des séquences consensus du domaine GARP des RR-B (d'après Tamai *et al.*, 2002)

Séquence consensus 1 (SEQ ID NO : 161)
(K/R)(P/M/V/A)(R/K/M)(V/L)(V/D)W(S/T/I/N)(V/A/P/S/T/C/H/Q/D)(E/Q/T/D/S)L(H/D)(R/K/Q/A/H/E/L/I) (K/R/Q/S/C/V/A/H)F(V/L/I)(A/K/Q/E/H/D/N/R/S)(A/V/C)(V/G/L/I)(N/E/A/Q/D/G/T/I/K/H)(Q/E/H/L/I/M/K/R/S)L
Séquence consensus 2 (SEQ ID NO : 162)
G(I/V/L/P/S/H/Q/A/G)(D/E/K/H/Q/N/A)
Séquence consensus 3 (SEQ ID NO : 163)
(A/T)(V/I/Y/F/T)P(K/S)(K/R/T/Q/L/S/G/A)(I/V/L)(L/M/R/K)(D/E/Q/K/R/S)(L/I/F/H/V/M/T/R/A)(M/I/L)(N/K/G/S/D/Q/E)
Séquence consensus 4 (SEQ ID NO : 164)
(V/I/M/T/E/L/S/N)(E/D/G/N/Y/K/H/Q/P)(N/G/K/T/S/C/R/D)(I/L)(T/D/A/S)(R/N/I/L/V)(E/H/D/S/A/Y/F)(N/E/H)
Séquence consensus 5 (SEQ ID NO : 165)
(V/I/L)(A/K)SHLQ(K/M/I)(Y/F)(R/V)

ANNEXE 6 – Prédiction de DisProt sur le désordre de RR13



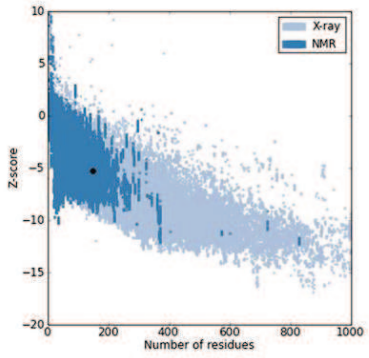
ANNEXE 7 – Résultats de l'analyse effectuée avec le logiciel ProSa

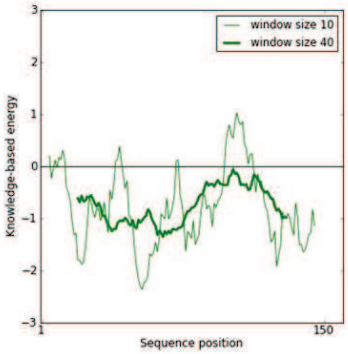
ProSA-web
Protein Structure Analysis

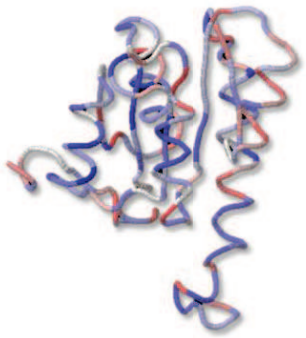
DDK

Overall model quality

Z-Score: -5.22



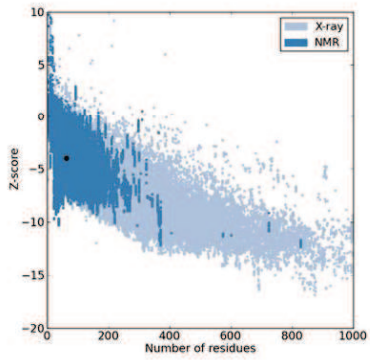


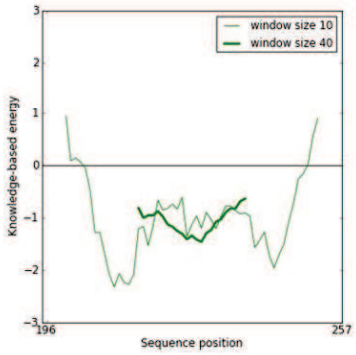


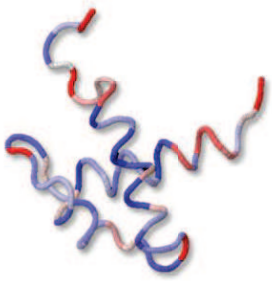
GARP

Overall model quality

Z-Score: -3.99







ANNEXE 8 – Exemple de contraintes ambiguës utilisées pour le calcul d'amarrage *in silico*

```
assign ( resid 88  and segid A)
   (
    ( resid 88  and segid B)
  or
    ( resid 89  and segid B)
  or
    ( resid 98  and segid B)
  or
    ( resid 99  and segid B)
  or
    ( resid 101  and segid B)
  or
    ( resid 104  and segid B)
  or
    ( resid 105  and segid B)
  or
    ( resid 106  and segid B)
  or
    ( resid 108  and segid B)
  or
    ( resid 117  and segid B)
  or
    ( resid 124  and segid B)
  or
    ( resid 127  and segid B)
  or
    ( resid 128  and segid B)
  or
    ( resid 131  and segid B)
  or
    ( resid 135  and segid B)
    or
    ( resid 71  and segid B)
    or
    ( resid 78  and segid B)
    or
    ( resid 83  and segid B)
    or
    ( resid 85  and segid B)
    or
    ( resid 86  and segid B)
  or
    ( resid 87  and segid B)
    or
    ( resid 90  and segid B)
    or
    ( resid 91  and segid B)
    or
    ( resid 97  and segid B)
    or
    ( resid 100  and segid B)
    or
    ( resid 102  and segid B)
    or
    ( resid 103  and segid B)
    or
    ( resid 109  and segid B)
    or
    ( resid 110  and segid B)
    or
    ( resid 111  and segid B)
      or
    ( resid 112  and segid B)
      or
    ( resid 113  and segid B)
      or
    ( resid 114  and segid B)
      or
    ( resid 115  and segid B)
      or
    ( resid 118  and segid B)
      or
    ( resid 119  and segid B)
      or
    ( resid 120  and segid B)
      or
    ( resid 121  and segid B)
      or
    ( resid 122  and segid B)
      or
    ( resid 123  and segid B)
      or
    ( resid 126  and segid B)
      or
    ( resid 130  and segid B)
      or
    ( resid 133  and segid B)
      or
    ( resid 134  and segid B)
      or
    ( resid 136  and segid B)
      or
    ( resid 137  and segid B)
      or
    ( resid 138  and segid B)
      or
    ( resid 139  and segid B)
      or
    ( resid 140  and segid B)
       ) 2.0 2.0 0.0
 !
```

Ce qui veut dire que HADDOCK doit trouver parmi cette liste de résidus de la deuxième sous-unité ou chaine B des partenaires au résidu 88 de la première sous-unité ou chaine A.

Et ainsi de suite pour chaque résidu de la liste…

Ces résidus sont déterminés par l'observation de l'interface de dimérisation canonique.

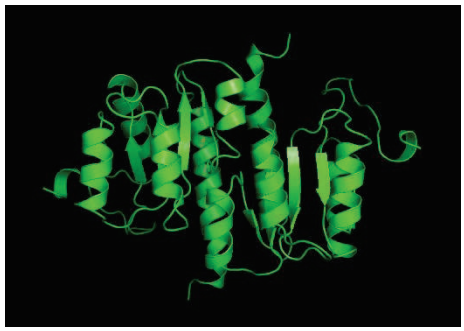
ANNEXE 9 – Résultats du Docking avec contraintes ambiguës par HADDOCK du complexe DDK/DDK

HADDOCK

Le choix s'est porté sur un mode d'association canonique le plus représenté.

CLUSTER 4

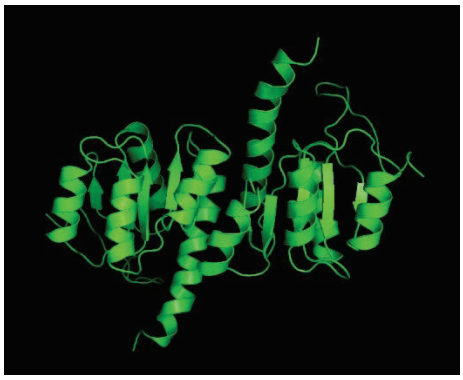
HADDOCK score	-93.2 +/- 10.9
Cluster size	21
RMSD from the overall lowest-energy structure	0.8 +/- 0.6
Van der Waals energy	-81.9 +/- 10.6
Electrostatic energy	-404.9 +/- 39.2
Desolvation energy	65.6 +/- 8.3
Restraints violation energy	34.6 +/- 12.81
Buried Surface Area	2924.8 +/- 129.8
Z-Score	-1.1



Rang 1 : les DDK sont en orientation "tête-bêche". Cela n'est pas le plus courant.

CLUSTER 2

HADDOCK score	-85.9 +/- 6.7
Cluster size	44
RMSD from the overall lowest-energy structure	6.3 +/- 0.1
Van der Waals energy	-37.8 +/- 8.4
Electrostatic energy	-649.7 +/- 61.0
Desolvation energy	76.0 +/- 3.1
Restraints violation energy	53.1 +/- 35.42
Buried Surface Area	2085.6 +/- 90.7
Z-Score	-0.9



Rang 2 : les DDK sont en orientation "tête-bêche".

CLUSTER 1

HADDOCK score	-84.0 +/- 4.4
Cluster size	74
RMSD from the overall lowest-energy structure	17.3 +/- 0.1
Van der Waals energy	-74.2 +/- 9.2
Electrostatic energy	-381.3 +/- 58.6
Desolvation energy	60.9 +/- 19.5
Restraints violation energy	50.4 +/- 22.72
Buried Surface Area	2516.8 +/- 275.3
Z-Score	-0.8

Rang 4 : Les DDK sont parallèles et l'interface est α4-β5-α5

ANNEXE 10 – Évaluation du complexe DDK/DDK par PISA

EMBL-EBI

Protein Data Bank in Europe
Bringing Structure to Biology

PDBePISA

Evaluation d'énergies libres de liaison et analyse des surfaces d'interaction

Complex Summary

Multimeric state	2	Surface area, Å^2	16510.4	ΔG^{int}, kcal/mol	-15.3	$T\Delta S^{diss}$, kcal/mol	12.1
Copies in unit cell	N/A	Buried area, Å^2	2464.7	ΔG^{diss}, kcal/mol	9.8	Symmetry number	2
Formula	A_2						
Composition	AB						
Dissociation pattern	A + B						

View Dissociated | Download Assembly | Remark 350 | Jmol | View | XML

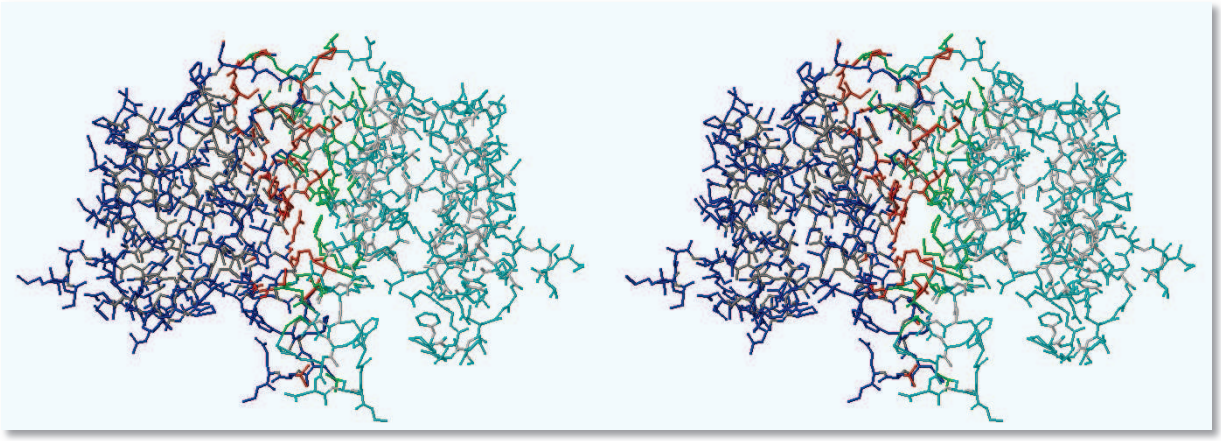
Engaged interfaces

##	Interfacing structures	N_{occ}	Diss.	Sym.ID	Buried area, Å^2	Δ^iG, kcal/mol	N_{HB}	N_{SB}	N_{DS}	CSS
1	A + B	1	×	1_555	1232.4 (50%)	-15.3 (100%)	12 (100%)	9 (100%)	0	0.000

View | Details | XML

ΔG^{diss} indicates the free energy of assembly dissociation, in kcal/M. The free energy of dissociation corresponds to the free energy difference between dissociated and associated states. Positive values of **ΔG^{diss}** indicate that an external driving force should be applied in order to dissociate the assembly, therefore assemblies with **$\Delta G^{diss}>0$** are thermodynamically stable.

Vue stéréo des contacts non covalents inter-sous-unités montrés par PISA (rouge et vert). Les domaines DDK sont en bleu.



ANNEXE 11– Résultats du Docking par HADDOCK du complexe GARP/DDK

HADDOCK

Les deux premiers groupes classés par HADDOCK en sortie de modélisation.

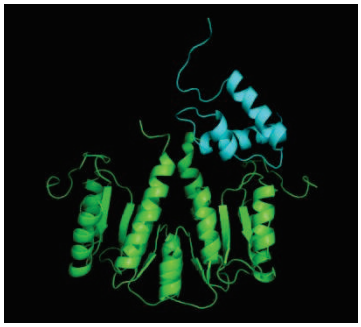
Il s'agit des clusters avec le plus de représentants. Le premier est retenu car l'hélice basique d'interaction avec l'ADN est prise dans le complexe.

CLUSTER 1

HADDOCK score	-166.1 +/- 4.5
Cluster size	54
RMSD from the overall lowest-energy structure	0.8 +/- 0.4
Van der Waals energy	-41.1 +/- 3.6
Electrostatic energy	-572.4 +/- 21.8
Desolvation energy	66.7 +/- 6.5
Restraints violation energy	14.6 +/- 11.64
Buried Surface Area	2121.7 +/- 20.3
Z-Score	-1.7

CLUSTER 2

HADDOCK score	-162.2 +/- 3.6
Cluster size	53
RMSD from the overall lowest-energy structure	5.7 +/- 0.1
Van der Waals energy	-64.9 +/- 5.5
Electrostatic energy	-446.8 +/- 83.0
Desolvation energy	71.0 +/- 8.2
Restraints violation energy	42.5 +/- 28.36
Buried Surface Area	2157.0 +/- 33.5
Z-Score	-1.5



ANNEXE 12 – Évaluation du complexe GARP/DDK par PISA

Complex Summary

Multimeric state	2	Surface area, Å^2	16686.4	ΔG^{int}, kcal/mol	-0.6	$T\Delta S^{diss}$, kcal/mol	11.5
Copies in unit cell	N/A	Buried area, Å^2	2023.9	ΔG^{diss}, kcal/mol	-4.0	Symmetry number	1
Formula	AB						
Composition	AB						
Dissociation pattern	A + B						

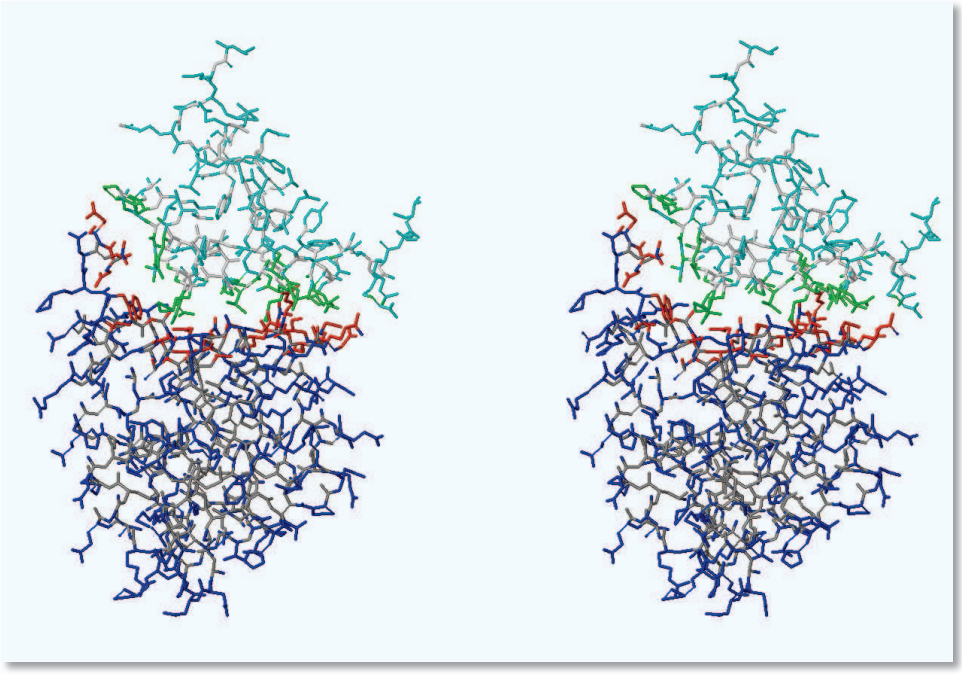
View Dissociated | Download Assembly | Remark 350 | Jmol | View | XML

Engaged interfaces

##	Interfacing structures	N_{occ}	Diss.	Sym.ID	Buried area, Å^2	$\Delta^i G$, kcal/mol	N_{HB}	N_{SB}	N_{DS}	CSS
1	A + B	1	×	1_555	1011.9 (50%)	-0.6 (100%)	11 (100%)	13 (100%)	0	0.000

View | Details | XML

Vue stéréo des contacts non covalents inter-sous-unités montrés par PISA (rouge et vert). Le domaine DDK est en bleu et le domaine GARP en cyan.



Lucie BERTHEAU

CARACTÉRISATION D'UN PHOSPHORELAIS MULTIPLE DE TYPE HISTIDINE-ASPARTATE DANS LA TRANSDUCTION DU SIGNAL DE LA CONTRAINTE OSMOTIQUE CHEZ LE PEUPLIER

Mécanismes de régulation du fonctionnement d'un régulateur de réponse de type-B à l'échelle moléculaire

RÉSUMÉ : Les relais de phosphorylation de type histidine/aspartate constituent des voies de signalisation impliquées dans la perception et la transduction des signaux jusqu'à la mise en place de réponses spécifiques. Ils mettent en jeu un récepteur ou Histidine aspartate Kinase (HK), des protéines navettes en charge de la transmission du phosphate (HPt) et des Régulateurs de Réponse (RR). L'implication d'un tel système dans la transduction du signal de la contrainte osmotique est avérée chez la levure et fortement suspectée chez *Arabidopsis*. Ce travail de thèse visait d'une part à caractériser l'implication de cette voie de transduction de la contrainte osmotique chez le peuplier, avec l'identification de partenaires HPt et RR en aval du récepteur HK1 et d'autre part à caractériser le mode de fonctionnement d'un RR de type-B. HK1, un osmosenseur membranaire détecterait le signal et le transmettrait à trois HPt préférentielles. De plus, un partenariat d'interaction se dégagerait entre ces trois HPt et certains RR-B. La régulation transcriptionnelle observée lors d'une contrainte osmotique pour deux des représentants des RR-B témoigne d'une possible implication de ces RR dans cette voie. Ces protéines sont des facteurs de transcription dont la fonction a été confirmée *in planta* pour l'un d'entre eux. La dimérisation du domaine receveur du RR et son interaction avec le domaine de fixation à l'ADN ou domaine GARP apparaissent comme des points de contrôle clés dans la régulation de l'activité effectrice des RR-B. De plus, la capacité d'un RR-B à se fixer sur ses motifs de reconnaissance (boîtes AGAT) a pu être vérifiée *in vitro* et la présence de ces séquences a d'ailleurs été retrouvée dans des gènes régulés par la contrainte osmotique. Ce travail prospectif ouvre des perspectives concernant l'implication des RR-B dans la voie de transduction du signal de la contrainte osmotique, et propose notamment des mécanismes fins pour l'élaboration d'une réponse hautement spécifique.

Mots-clés : phosphorelais multiple, Histidine-aspartate Kinase (HK), Histidine containing Phosphotransfer (HPt), Régulateurs de Réponse (RR), interaction, dimérisation, contrainte osmotique, *Populus*

CHARACTERIZATION OF THE MULTISTEP HIS-TO-ASP PHOSPHORELAY SYSTEM IN THE OSMOSENSING PATHWAY IN POPLAR

Regulatory mechanisms at the molecular scale of a B-type response regulator function

ABSTRACT: Multistep His-to-Asp phosphorelay systems are signaling pathways devoted to signal perception and transduction for establishment of specific responses. These systems are composed of three successive partners: Histidine-aspartate Kinases (HKs), Histidine-containing Phosphotransfer proteins (HPts), and Response Regulators (RRs). One of the best characterized corresponding systems is the osmo-responsive pathway in yeast. Such systems are also suspected in *Arabidopsis*. This work aimed to characterize the involvement of an osmosensing pathway in *Populus* by identifying HPt and RR elements downstream of HK1 and to reveal the underlying mechanisms for the activity of a RR-B. HK1, membrane osmosensor, is expected to be responsible for signal detection and propagation by triggering the activation of three preferential HPt. Furthermore, an interacting partnership between those HPts and particular B-type RRs was observed. Two of them appear to be regulated by an osmotic stress, suggesting their possible involvement in this pathway. The B-type RR members, the final output elements of the pathway, act as transcription factors, as shown for at least for one of them *in planta*. Taken together, the dimerization of the RR receiver domain and its interaction with its DNA binding domain (GARP), are likely key checkpoints in the regulation of RR-B activity. Besides, the ability of one RR-B to bind its cognate specific DNA sequences (AGAT boxes) was confirmed *in vitro* and those were found in promoters of osmotic response genes. This work opens up prospects for the involvement of RR-B in the osmotic stress signaling pathway and suggests mechanisms tuning induction of specific responses.

Keywords: multistep phosphorelay, Histidine-aspartate Kinase (HK), Histidine containing Phosphotransfer protein (HPt), Response Regulator (RR), interaction, dimerisation, osmotic stress, *Populus*

UPRES EA 1207 Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures
INRA USC 1328 Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales