Ces protons qui nous relient

Sébastien THOMINE

Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC)

Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette

Réponses précoces aux éliciteurs de réactions de défense chez les cellules végétales

Éliciteurs
(oligogalacturonides, pectate lyase, cryptogéine)

pH_{ext} ↗ pH_{cyt}

$Ca^{2+}{}_{cyt}$ ↗

dépolarisation

Efflux de K^+

Efflux de Cl^-

?

Réponses de défenses
(phytoalexines, Pathogenesis Related protéines…)

Yves Mathieu, Jean-Pierre Jouanneau, Armen Kurkdjian…

Quel rôle pour les variations de pH dans les réponses aux éliciteurs de reactions de defense?

Éliciteurs
(oligogalacturonides, pectate lyase, cryptogéine)

pH_{ext} ↗

pH_{cyt} ?

$Ca^{2+}{}_{cyt}$ ↗

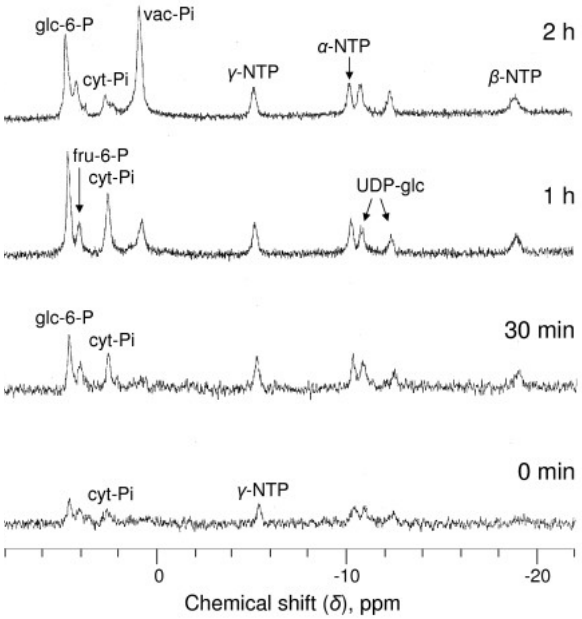
phosphorylation

Efflux de K^+

Efflux de Cl^-

Réponses de défenses
(phytoalexines, PR protéines…)

La RMN du ^{31}P pour mesurer le pH dans les cellules végétales



cin receptor in the plasma membrane, and Jean Guern, whose competence in the use of ^{31}P-NMR spectroscopy was of great value in establishing that fusicoccin-induced stimulation of the proton pump was indeed associated with an increase of cytosolic pH.

Erasmo Marre, Annual Review of Plant Physiology 1991

Yves Mathieu, Jean-Yves Lallemand…

The Plant Journal (1991) 1(3), 333–343

Membrane responses induced by oligogalacturonides in suspension-cultured tobacco cells

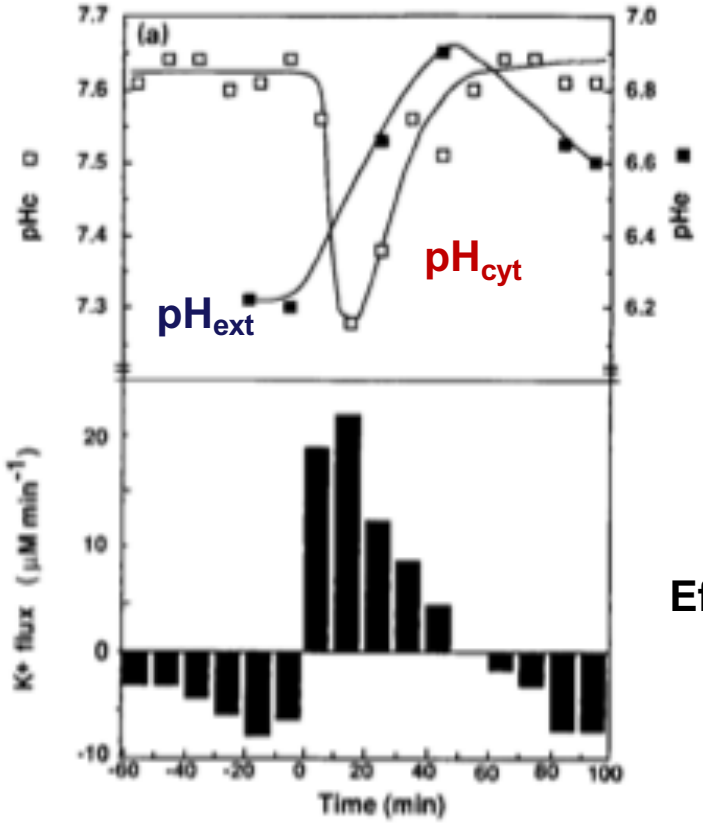
Yves Mathieu[1]*, Armen Kurkdjian[1], Hua Xia[1], Jean Guern[1], Alan Koller[2]†, Mark D. Spiro[2], Malcolm O'Neill[2], Peter Albersheim[2] and Alan Darvill[2]
[1]Institut des Sciences Végétales, CNRS, Bâtiment 22–23, Avenue de la Terrasse, F-91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France, and

induced cell elongation in pea stem segments (Branca *et al.*, 1988), inhibit flowering of *Lemna gibba* (Gollin *et al.*, 1984), inhibit root formation, induce polar enlargement, and stimulate flower formation in tobacco thin-cell layer explants (Eberhard *et al.*, 1989; Marfà *et al.*, unpublished data).

CYTOSOLIC PROTONS AS SECONDARY MESSENGERS IN ELICITOR - INDUCED DEFENSE RESPONSES

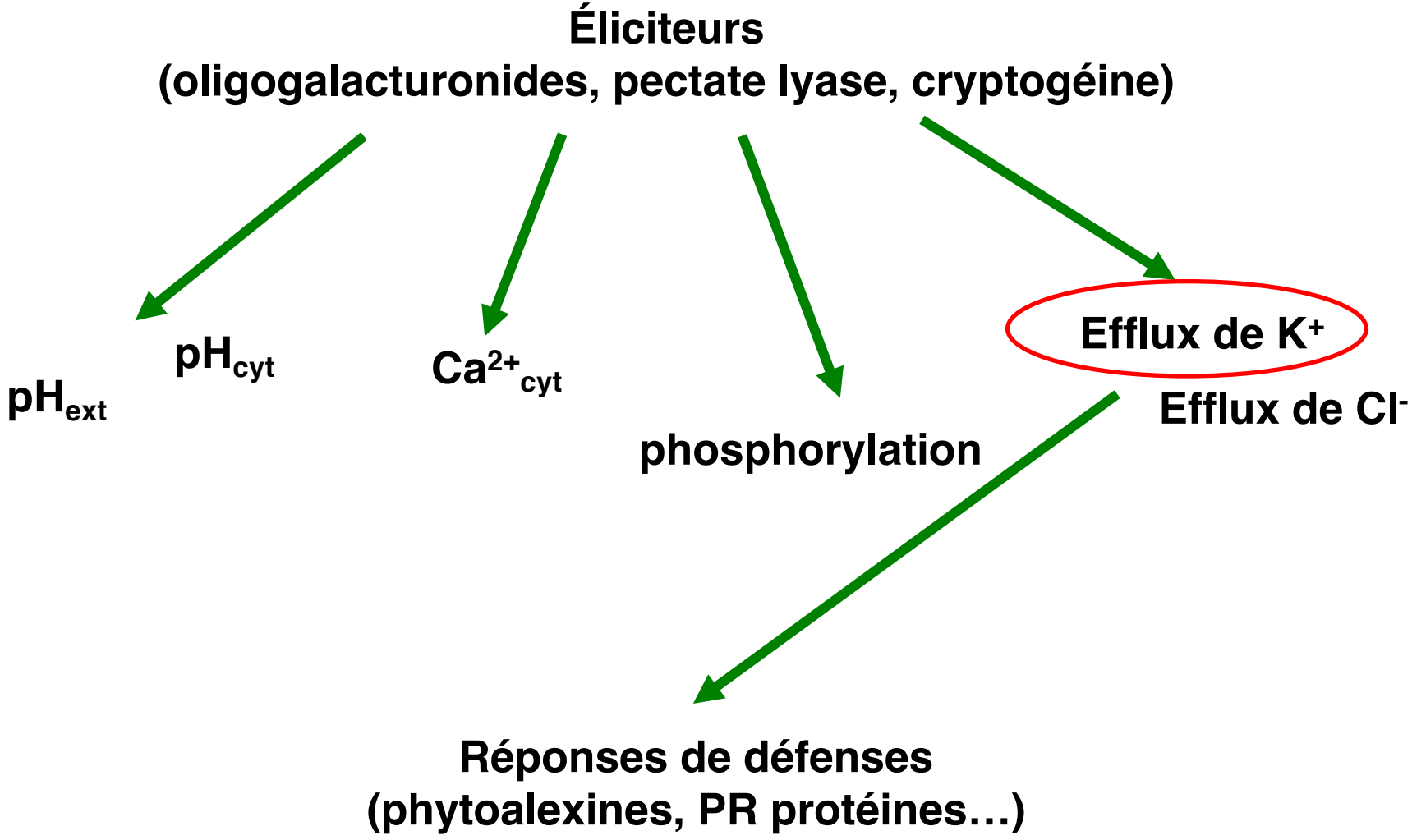
Y. MATHIEU*, J.-P. JOUANNEAU, S. THOMINE, D. LAPOUS & J. GUERN

C.N.R.S. - Institut des Sciences Végétales, bât. 22, Avenue de la Terrasse, F-91198 -Gif-sur-Yvene Cedex, France.

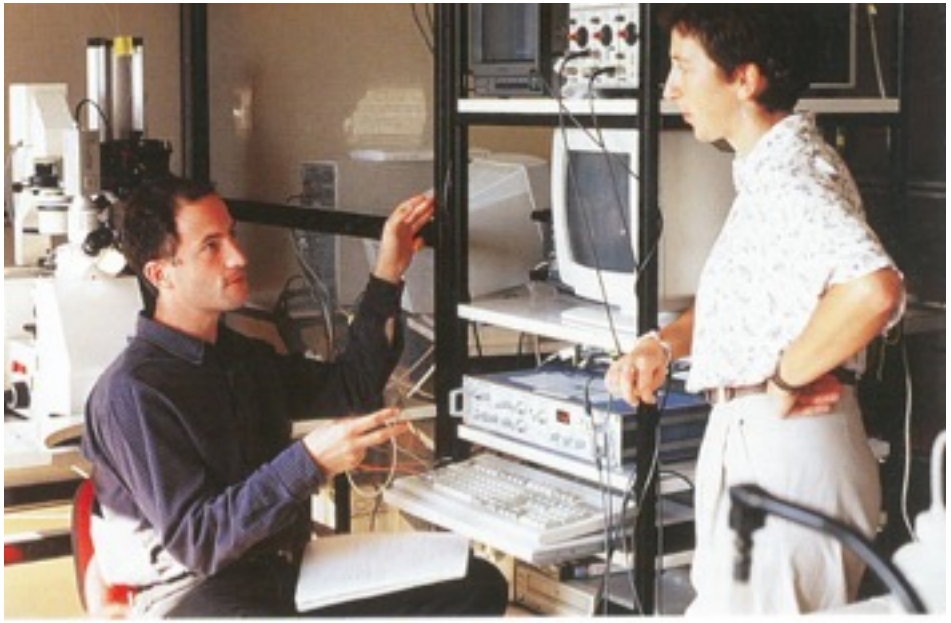


Efflux de K^+

Quel rôle pour l'efflux de K^+ dans les réponses aux éliciteurs de reactions de defense?



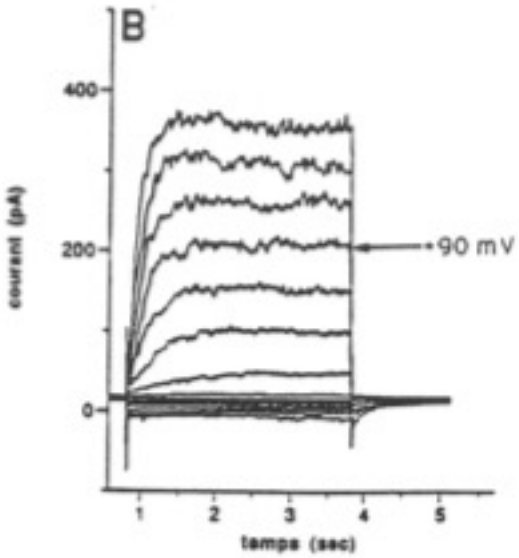
A la recherche des unités de transport permettant l'efflux de potassium…

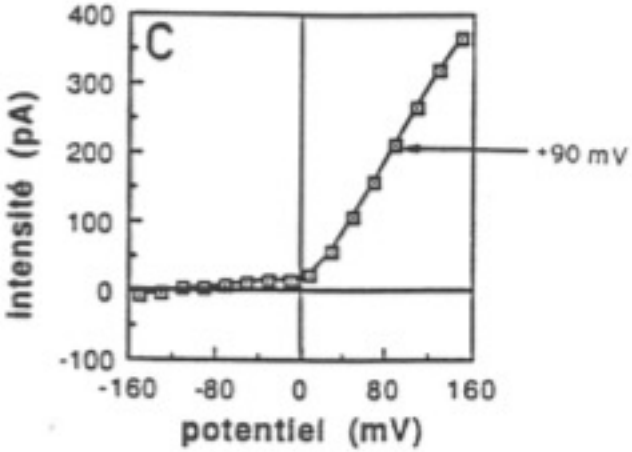


Utilisation des techniques d'électrophysiologie.

L'essor du patch-clamp dans l'équipe de Jean Guern…

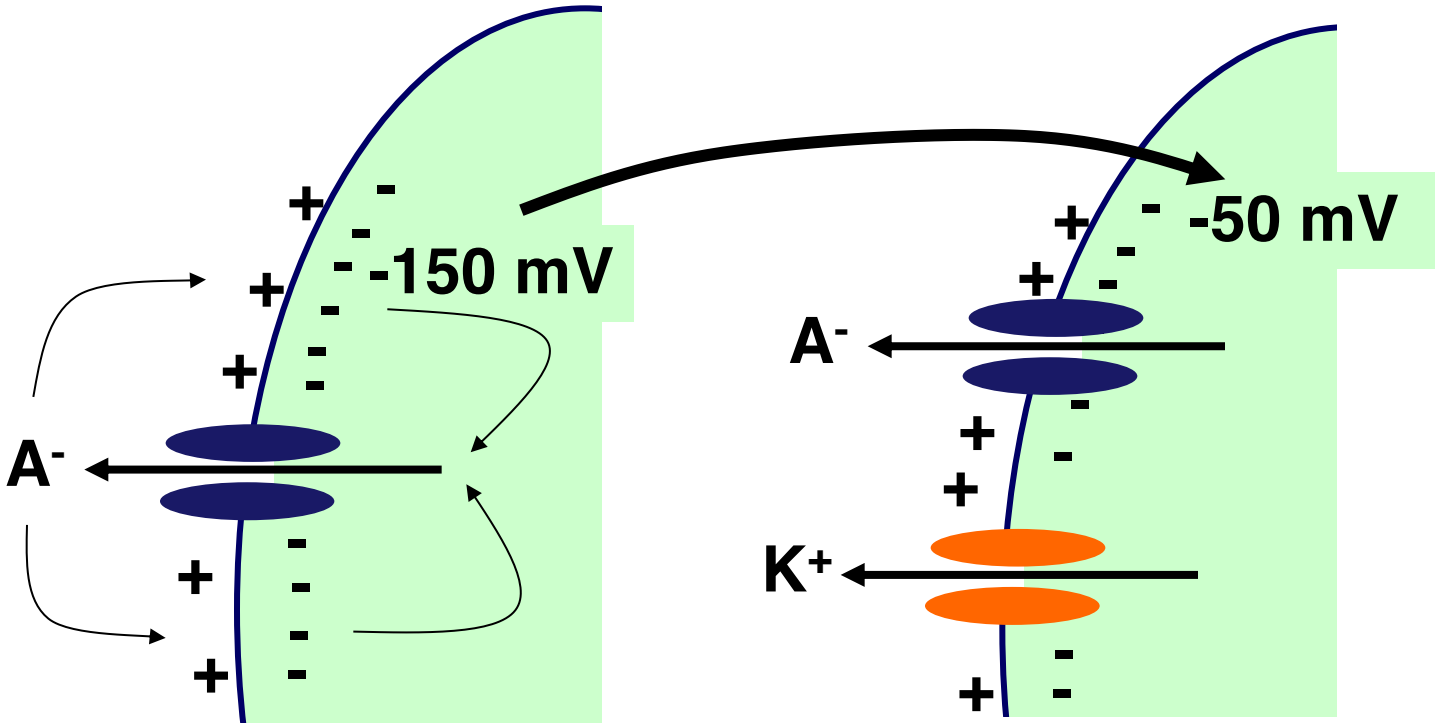
1991: Prix Nobel de Physiologie et Médecine pour Neher et Sackmann





Armen Kurkdjian, Hélène Barbier-Brygoo, Sabine Zimmermann, Jean Colcombet, Jean-Marie Frachisse…

Des canaux potassiques aux canaux anioniques

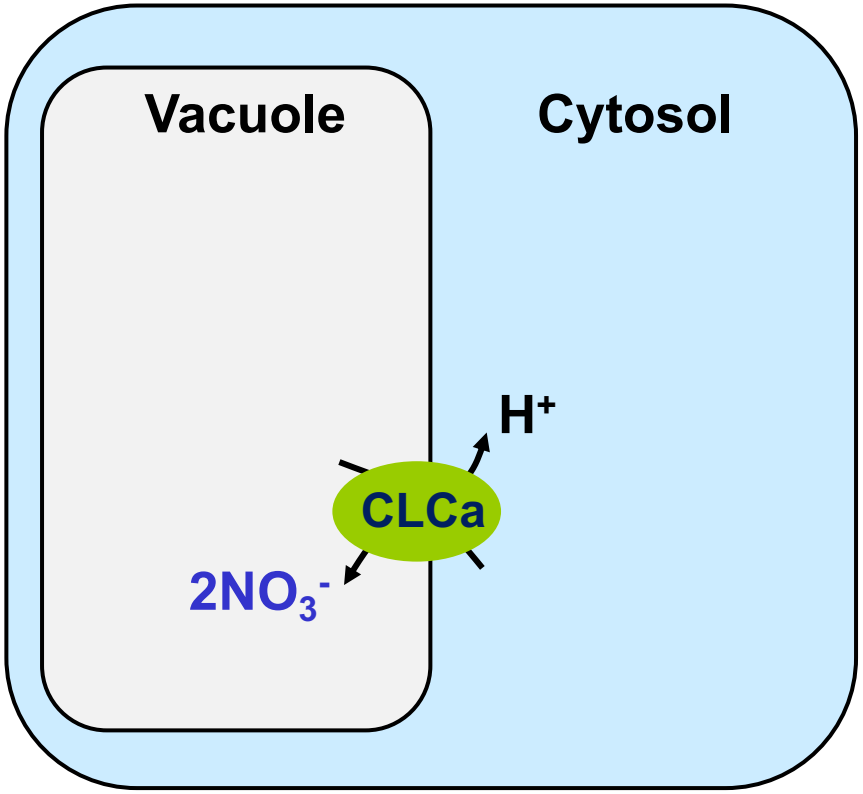


L'ouverture des canaux anioniques permet de dépolariser la membrane

La dépolarisation de la membrane est nécessaire pour activer les canaux potassiques

Les **canaux anioniques**, des acteurs majeurs de la **signalisation** et de la **régulation osmotique** chez les cellules végétales.

A la recherche de l'identité moléculaire des canaux anioniques de la membrane plasmique



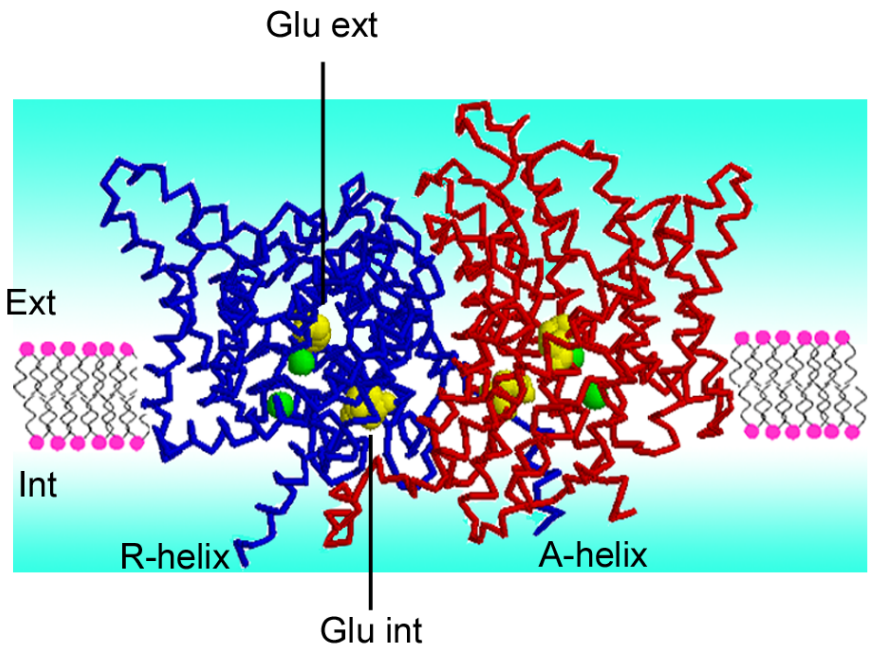
Ce n'était pas le poisson qu'on voulait attraper...
Mais c'était quand même un gros poisson!

AtCLCa code un **transporteur de nitrate** couplé aux protons de la **membrane vacuolaire,** essentiel pour le stockage du nitrate chez la plante**.**

Christophe Maurel, Claire Lurin, Danny Geleen, Marion Vinauger, Anne Marmagne, Jean-Marie Frachisse, Alexis de Angeli, Geneviève Ephritikhine, Hélène Barbier-Brygoo…

Retour vers les protons!

Comment transformer CLCa en un canal à nitrate?



Experimental

CLC0	CH	ISCCFGTPLAGVLFSIEVTCSHFGVRS
hCLC1	CH	VGCCFGTPLGGVLFSIEVTSTYFAVRN
hCLC2	CH	VGCCFAAPIGGVLFSIEVTSTFFAVRN
hCLC4	TR	VSVAFGAPIGGVLFSLEEVSYYFPLKT
hCLC5	TR	VSVAFGAPIGGVLFSLEEVSYYFPLKT
AtCLCa	TR	VCAAFRSPVGGVLFALEEVATWWRSAL
AtCLCb		VCAAFRSPVGGVLFALEEVATWWRSAL
AtCLCc		VAAAFRAPVGGVLFALEEAASWWRNAL
AtCLCg		IAASFRAPVGGVLFALEEMSSWS--AL
AtCLCd		VAAAFRAPVGGVLFALEEVTSWWRSQL
AtCLCe		ISSGFNAAVAGCFFAVESVLWPSSSTD
AtCLCf		IASGFNAAVAGCFFAIETVLRPLRAEN
CLC-ec1	TR	LAAAFNAPLAGILFIIEEMRPQFRYTL

E203

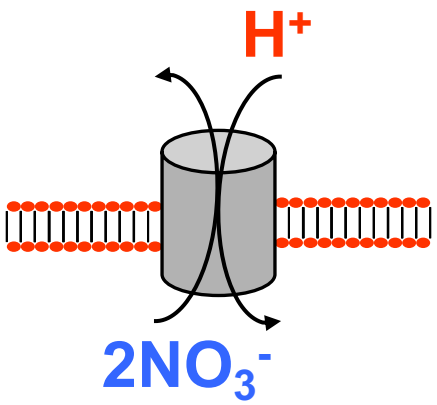
E203 (Glu_{int}) est important pour le transport couplé des protons par les protéines CLC.

Une mutation ponctuelle suffit à changer AtClCa en un canal non couplé aux protons

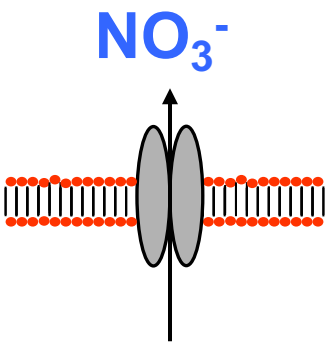
Transporteur couplé aux protons

canal

AtCLCa natif



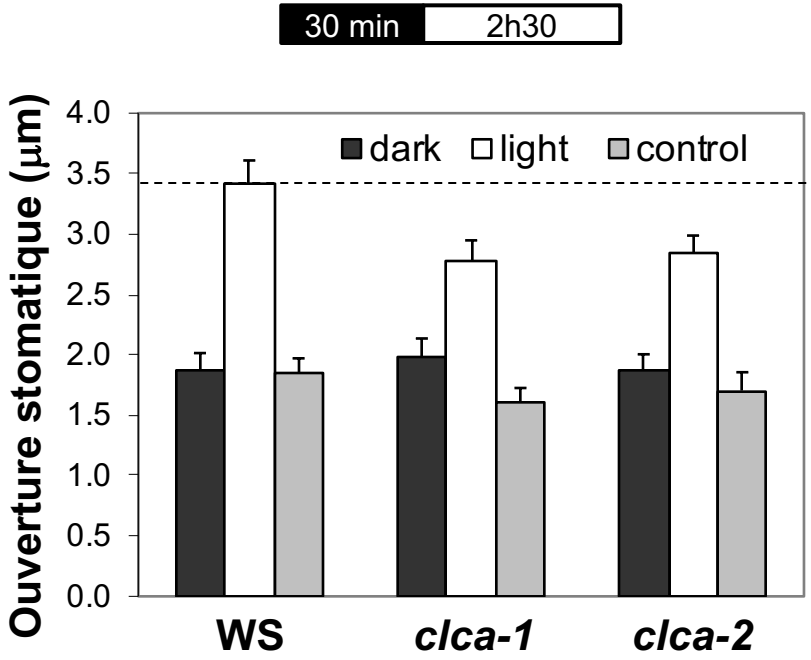
Mutant AtCLCa^{E203A}

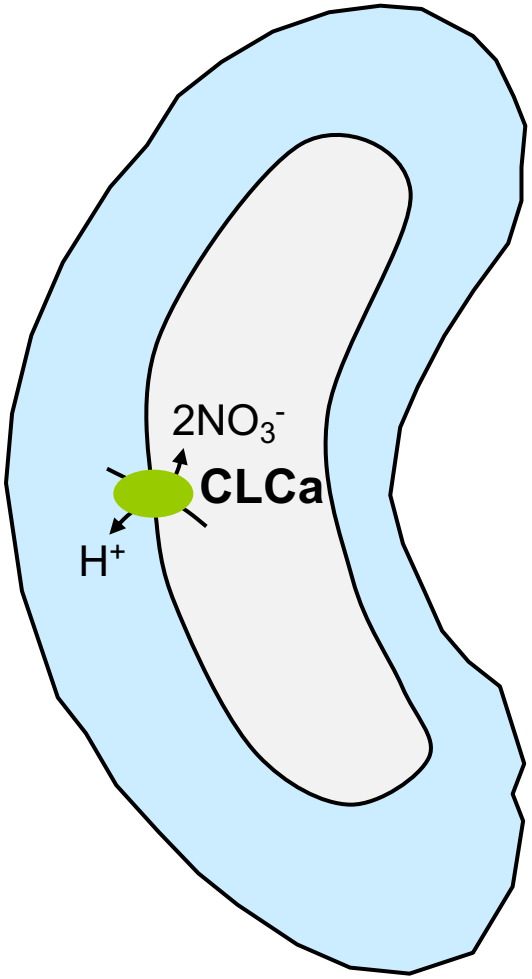


Est ce que le transport couplé des protons avec le nitrate est nécessaire pour la function de CLCa dans la plante?

Sophie Filleur, Alexis de Angeli, Julie Hodin, Christoph Lind…

Quelle est l'importance de CLCa pour le fonctionnement des stomates?

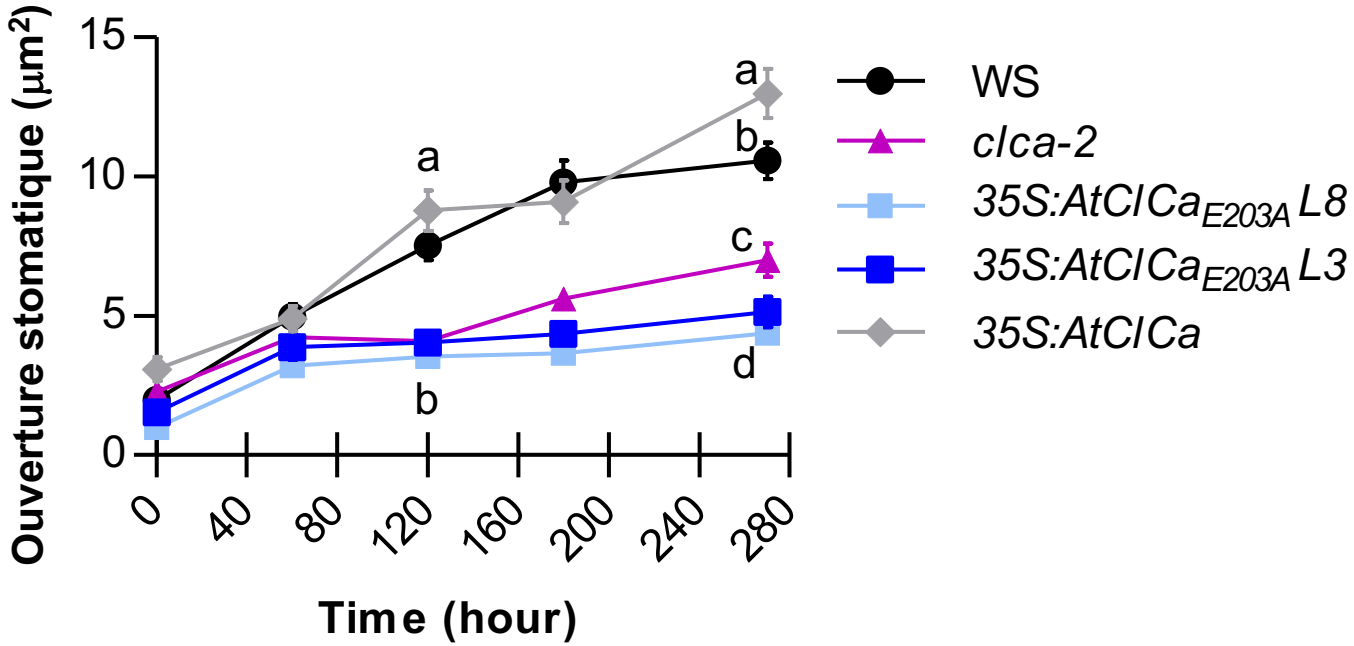




AtCLCa est nécessaire pour l'ouverture complète des stomates.

Sophie Filleur, Alexis de Angeli, Steffie Wege…

Le transport couplé des protons est-il nécessaire pour la function de CLCa dans les stomates?

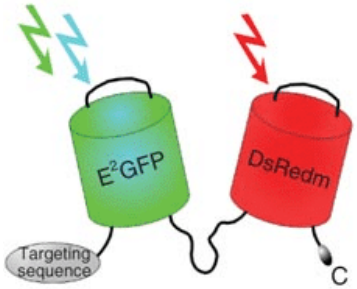


La forme mutante de CLCa^{E203A} qui fonctionne comme un canal est incapable de remplacer CLCa pour l'ouverture des stomates.

Le couplage du transport de nitrate avec les protons est indispensable à toutes les fonctions de CLCa dans la plante.

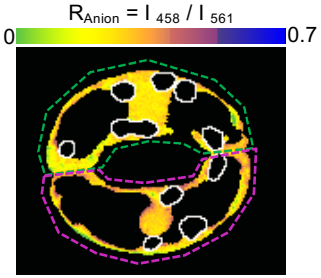
Comment suivre l’activité de CLCa *in vivo* ?

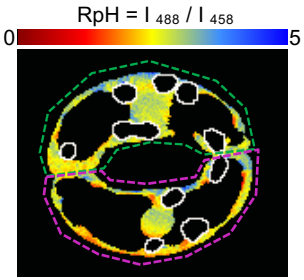
Comment suivre l'activité de CLCa *in vivo* ?



UBI10 ***ChlopHensor***

Expression ubiquitaire de ClopHensor



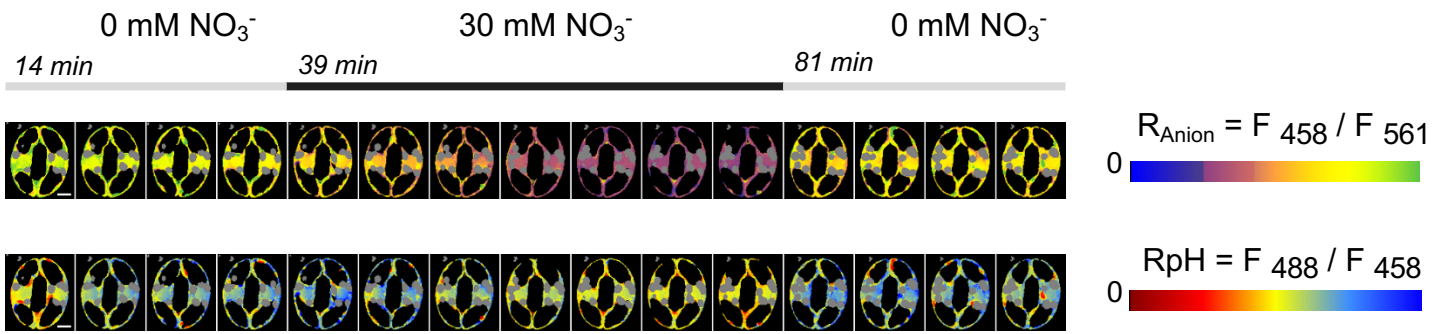


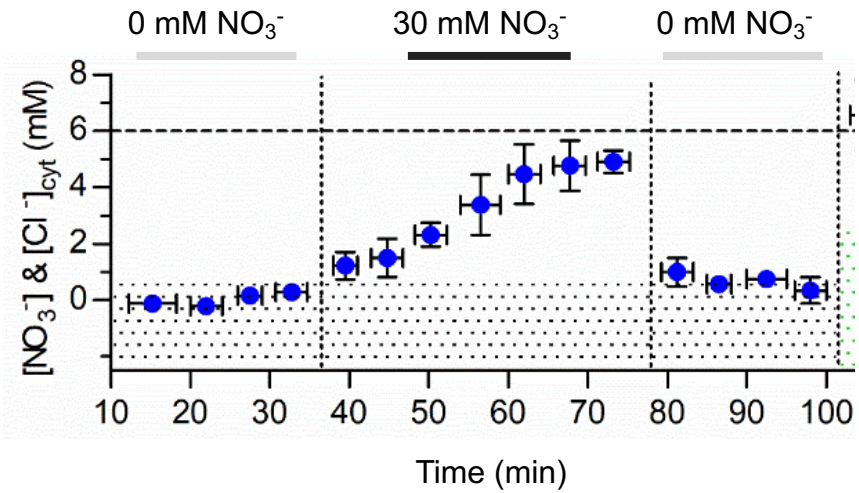
Fluorescence des cellules de garde exprimant ClopHensor

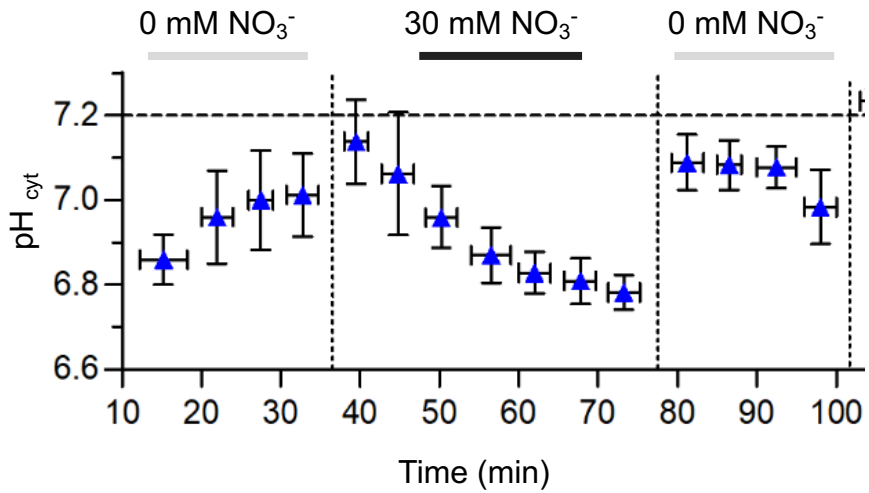
Des lignées d'Arabidopsis exprimant ClopHensor permettent de suivre la dynamique du pH et du nitrate cytosolique dans les cellules de garde.

Alexis de Angeli, Elsa Demes…

Quel est l'effet du NO_3^- externe sur la $[NO_3^-]$ et le pH intracellualire?

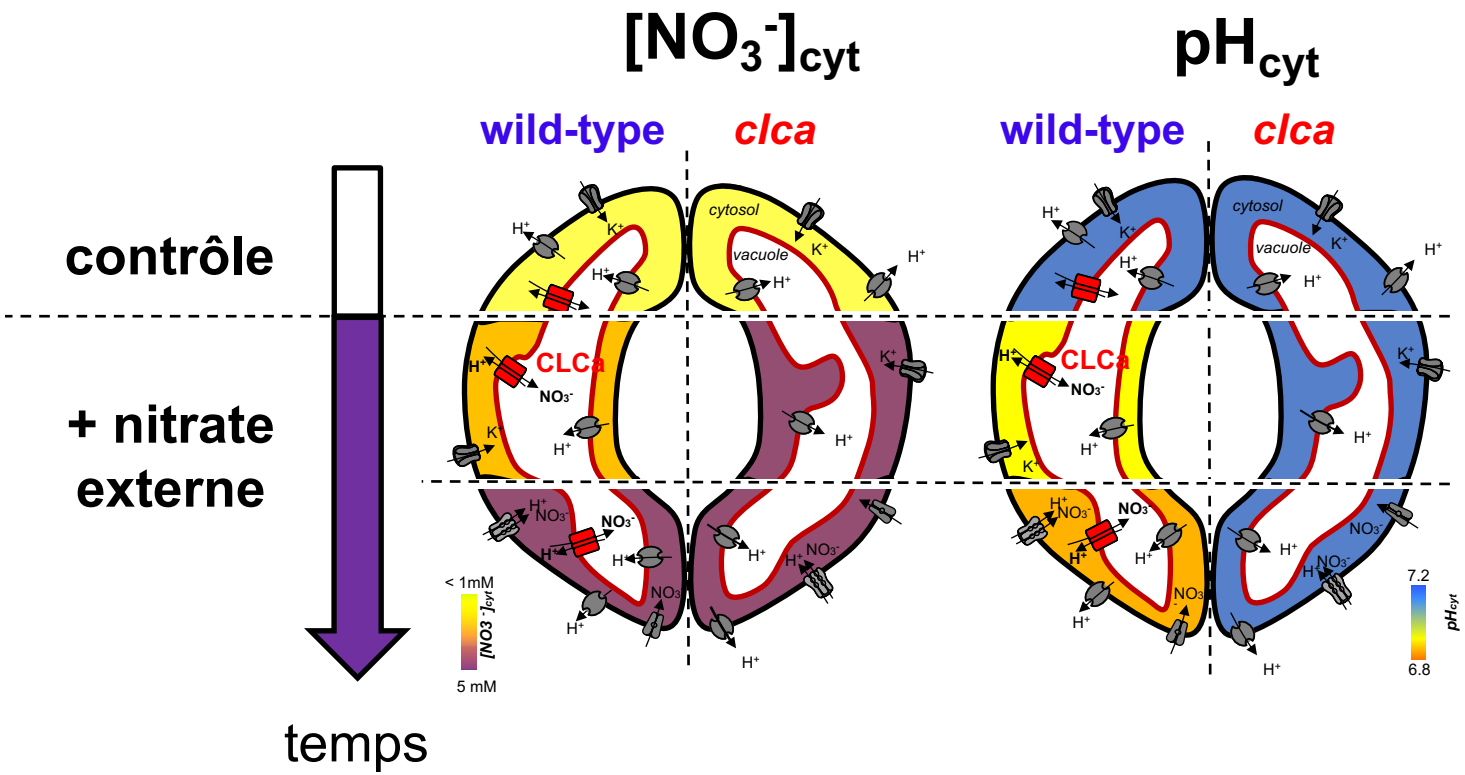






L'exposition au nitrate extracellulaire entraine une augmentation du de concentration en nitrate et une acidification du pH cytosolique.

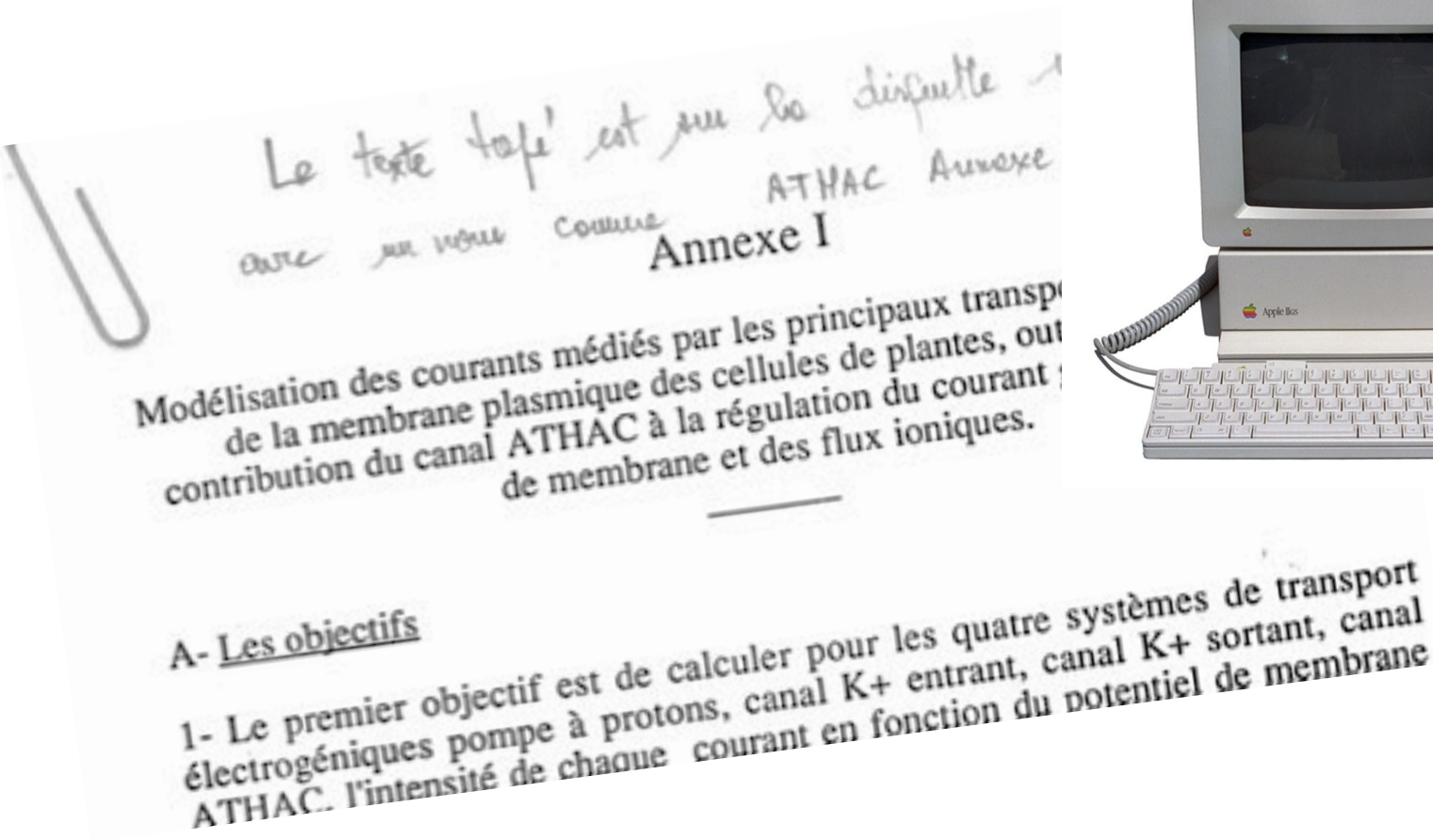
Que se passe-t-il en absence de CLCa?



Chez le mutant *clca*, l'augmentation de la concentration en nitrate est plus rapide…mais surtout **l'acidification associée est complètement abolie**.

CLCa est un régulateur majeur du pH cytosolique!

Modéliser pour mieux comprendre



Annexe I

Modélisation des courants médiés par les principaux transp
de la membrane plasmique des cellules de plantes, out
contribution du canal ATHAC à la régulation du courant
de membrane et des flux ioniques.

A- Les objectifs

1- Le premier objectif est de calculer pour les quatre systèmes de transport électrogéniques pompe à protons, canal K+ entrant, canal K+ sortant, canal ATHAC, l'intensité de chaque courant en fonction du potentiel de membrane

Jean Guern a aussi été un pionnier de la **modélisation** des systèmes biologiques, précurseur d'une **biologie quantitative et prédictive** qui s'impose aujourd'hui!

Merci Jean!

Merci à tous!