

La signalisation lipidique chez les plantes et son rôle dans la transduction des signaux en réponse aux contraintes hydriques

Anne-Sophie Leprince et Arnould Savouré

Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire des Plantes, UR5 UPMC; EAC7180 CNRS, Université Pierre et Marie Curie P6, 4 place Jussieu, case 156, 75252 Paris Cedex 05, France

Auteur correspondant : Anne-Sophie Leprince, anne-sophie.leprince@upmc.fr

Reçu le 24 septembre 2009

Résumé – Les plantes, organismes fixés, ont développé la capacité de détecter les variations de leur environnement. Cette propriété est liée à la perception de ces signaux et à leur transduction par des voies de signalisation pour les traduire en une réponse adaptative. Parmi ces voies, la signalisation lipidique joue un rôle considérable chez les végétaux, avec en particulier l'acide phosphatidique (PA) comme acteur clé. Ce second messenger peut être synthétisé *via* deux voies impliquant soit des phospholipases D (PLD), soit des phospholipases C (PLC) et des diacylglycérol kinases (DAGK). La variation des niveaux de PA peut être modulée par sa conversion en diacylglycérolpyrophosphate (DGPP) par les PA kinases (PAK). Les PLCs, à travers la formation d'IP₃ ou de ses dérivés, sont impliquées dans les variations des teneurs en Ca²⁺ intracellulaire, autre second messenger essentiel de la signalisation cellulaire. Les phosphoinositides, comme le PI3P, le PI4P et le PI(4,5)P₂, sont également des éléments importants de la signalisation lipidique. Ils sont à la fois les substrats des PLCs et des PLDs et des seconds messagers. Dans cet article nous nous sommes attachés à présenter l'état des connaissances sur ces voies de signalisation lipidique en mettant l'accent sur les spécificités de ces voies chez les végétaux par rapport aux autres règnes vivants.

Mots clés : Acide phosphatidique / *Arabidopsis thaliana* / contraintes hydriques / phosphoinositides / phospholipases / signalisation lipidique

Abstract – Lipid signaling pathways in plants and their roles in response to water constraints.

Plants are sessile organisms that have developed the capacity to detect slight variations of their environment. They are able to perceive these environmental signals and to transduce them by signaling pathways in order to trigger adaptative responses. Lipid signaling elements play a central role in these pathways in plants. A key element is phosphatidic acid (PA), which can be produced by two pathways. In the first one, phospholipids are hydrolysed by phospholipase D (PLD) to release PA. In the second one, PA is produced through the activity of phospholipase C (PLC) to produce diacylglycerol (DAG) which is then phosphorylated by DAG kinase (DAGK). The amount of PA in the cell is regulated by PA kinase, which phosphorylates PA to produce diacylglycerolpyrophosphate (DGPP), considered as a second messenger as well. PLCs play a dual role in cell signaling by regulating the amount of intracellular Ca²⁺, another essential second messenger. Phosphoinositides, such as PI3P, PI4P and PI(4,5)P₂, are substrates of PLCs and PLDs and are considered as second messengers also. In this review, we present recent data regarding the specific features of these lipid signaling pathways in plant compared with other eukaryotes.

Key words: Phosphatidic acid / *Arabidopsis thaliana* / water constraints / phosphoinositides / phospholipases / lipidic signalisation

Introduction

À la différence des animaux, les plantes sont des organismes fixés qui ne peuvent se soustraire à leur environnement. Tout au long de leur vie, elles sont en interaction directe avec les paramètres physico-chimiques et biotiques de celui-ci. Au cours de l'évolution, les plantes ont développé la capacité de détecter et d'intégrer les fluctuations parfois infimes de ces paramètres afin de mettre en place des réponses adaptatives (Mahajan & Tuteja, 2005). Parmi les contraintes abiotiques, la sécheresse et la salinité sont celles qui limitent le plus sévèrement la croissance et la productivité des plantes (Munns & Tester, 2008).

Pour la plante, la contrainte hydrique se définit comme une moindre disponibilité en eau du sol. Elle s'observe en cas de sécheresse ou de concentration élevée en sel dans le sol. La contrainte hydrique entraîne un abaissement du potentiel hydrique du sol qui devient inférieur à celui de la plante. Dans cette situation, il se crée un déséquilibre entre la capacité d'absorption de l'eau par la plante et la transpiration stomatique. L'ajustement osmotique et la fermeture des stomates sont deux réponses adaptatives qui participent à la limitation des pertes en eau de la plante. L'ajustement osmotique se manifeste par l'accumulation de solutés compatibles appelés osmolytes dans les cellules qui, en plus de leur rôle protecteur vis-à-vis des macromolécules, provoquent une diminution du potentiel hydrique cellulaire facilitant ainsi l'absorption d'eau (Kavi Kishor *et al.*, 2005). Une augmentation importante des teneurs en proline libre est observée en réponse aux contraintes hydriques chez la plupart des végétaux. Cette accumulation résulte d'une régulation fine du métabolisme de la proline (Thiery *et al.*, 2004; Parre *et al.*, 2007). Lors de contraintes hydriques, sa biosynthèse est activée, alors que son catabolisme est réprimé. Le contrôle de la perte de turgescence des cellules stomatiques est sous la dépendance de l'acide abscissique, hormone végétale synthétisée dans ces conditions. Cette hormone permet l'activation de voies de signalisation impliquées dans la fermeture des stomates (Zhu, 2002; Davies *et al.*, 2005).

Peu de données renseignent sur la façon dont la contrainte hydrique est perçue. Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, des protéines histidine-kinases à deux composants, apparentées aux osmosenseurs de levure, sont impliquées dans la perception des contraintes hydriques et salines (Urao *et al.*, 1999; Tran *et al.*, 2007). En aval de cette perception, de nombreux éléments de signalisation sont activés ou réprimés. Ces voies de signalisation peuvent être relayées et/ou amplifiées grâce à des seconds messagers tels que le Ca^{2+} ou des formes actives de l'oxygène (FAO). Des protéines kinases et phosphatases permettent de moduler l'activité de protéines en fonction

de leur état de phosphorylation/déphosphorylation. Les phospholipides, en plus de leur rôle structural au niveau des membranes, participent également à la signalisation cellulaire. En effet, ils sont les substrats d'enzymes telles que des phospholipases et des lipides-kinases. Ainsi, l'acide phosphatidique (PA) et les polyphosphoinositides produits par ces enzymes sont des éléments majeurs des voies de signalisation lipidiques végétales, notamment en réponse à des contraintes abiotiques. Nous nous sommes attachés dans cet article à illustrer les spécificités végétales de ces voies de signalisation à travers leur rôle dans la régulation du métabolisme de la proline et la fermeture des stomates en réponse aux contraintes hydriques.

L'acide phosphatidique, un second messenger

Chez les végétaux comme chez les animaux, le PA est considéré comme un second messenger important dans la signalisation cellulaire. Le PA est un lipide faiblement abondant puisqu'il représente moins de 1 % de la totalité des phospholipides membranaires au niveau des feuilles chez *A. thaliana* (Devaiah *et al.*, 2006). Cependant, de nombreuses études rapportent une accumulation rapide et transitoire de PA en réponse aux contraintes hydriques comme la sécheresse, la salinité ou le froid (Munnik, 2001; Ruelland *et al.*, 2002; Wang, 2004; Munnik & Testerink, 2009). Le PA peut être produit par deux voies de signalisation différentes (figure 1A). La première voie est tributaire de l'activité des phospholipases D (PLD). Ces enzymes hydrolysent les glycérophospholipides comme la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidylsérine (PS) et la phosphatidyléthanolamine (PE) pour former le PA et libérer la tête polaire. Le PA peut être également formé dans une seconde voie grâce à l'activité des phospholipases C (PLC). Cette voie de signalisation est bien connue chez les animaux. Les PLCs hydrolysent le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ($\text{PI}(4,5)\text{P}_2$) pour former l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) et le diacylglycérol (DAG). Chez les animaux, le DAG est un second messenger important qui reste associé à la membrane et participe à la signalisation cellulaire *via* l'activation de protéine-kinase C (PKC). Chez les végétaux, aucune PKC n'a été mise en évidence. Le DAG est rapidement phosphorylé par une DAG-kinase (DAGK) pour former du PA. Le DAG ne semblerait donc pas jouer de rôle de second messenger chez les végétaux (van der Luit *et al.*, 2000).

Les phospholipases D participent à la formation du PA

Le séquençage du génome d'*A. thaliana* a permis d'identifier 12 gènes codant pour des PLDs alors qu'il

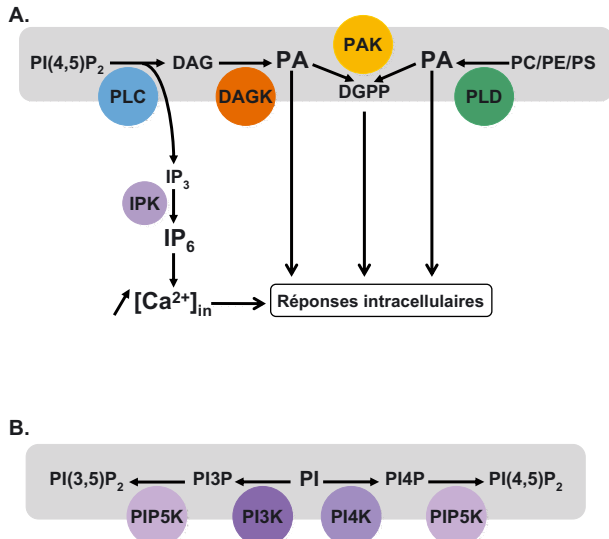


Fig. 1. Les voies de signalisation lipidique. (A) Les voies PLD et PLC. Le PA est formé directement par l'hydrolyse des glycérophospholipides membranaires par une PLD, ou par l'hydrolyse du PI(4,5)P₂ par une PLC pour donner du DAG dont la phosphorylation par une DAGK conduit à la formation du PA. Le PA peut être à son tour phosphorylé par une PAK pour donner le second messager DGPP. L'activité PLC permet aussi la synthèse d'IP₃. Cependant chez les végétaux, celui-ci serait phosphorylé par des IPK en IP₆, qui serait à l'origine de la modulation des niveaux de Ca²⁺ intracellulaire. Le PA, le DGPP et le Ca²⁺_{int} sont impliqués dans le déclenchement des réponses adaptatives. (B) La voie des phosphoinositides. Le PI peut être phosphorylé en position 3D par une PI3-kinase ou 4D par une PI4-kinase pour former respectivement du PI3P et du PI4P. Ceux-ci peuvent être à leur tour phosphorylés en position 5D par des PIP5-kinases pour former du PI(3,5)P₂ et PI(4,5)P₂. PLD : phospholipase D ; PLC : phospholipase C ; PA : acide phosphatidique ; DAG : diacylglycérol ; DAGK : DAG-kinase ; PAK : PA-kinase ; DGPP : diacylglycérolpyrophosphate ; IP₃ : inositol 1,4,5-trisphosphate ; IPK : inositolpolyphosphate-multikinases ; PI : phosphatidylinositol ; PI3P : phosphatidylinositol 3-monophosphate ; PI4P : phosphatidylinositol 4-monophosphate ; PI(3,5)P₂ : phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate ; PI(4,5)P₂ : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate.

n'en existe que deux chez l'homme. L'analyse des séquences protéiques et des données biochimiques ont permis de les classer en deux groupes (figure 2A). Le premier groupe est constitué par les PLD ζ 1 et ζ 2 qui présentent une grande homologie de séquences avec les PLDs animales. En effet, ces protéines possèdent à leur extrémité N-terminale des domaines de régulation de type *Phox Homology* (PX) et *Pleckstrin Homology* (PH), connus chez les animaux pour fixer respectivement le phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) et

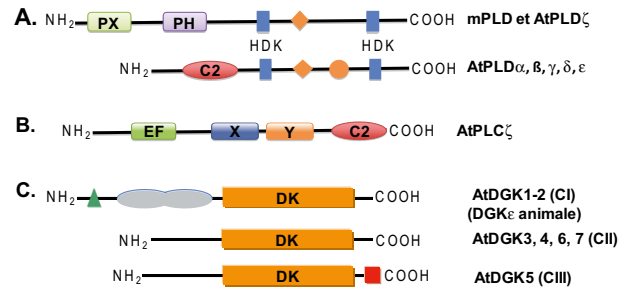


Fig. 2. Structure des enzymes participant à la formation du PA chez les végétaux. (A) Les PLDs végétales sont réparties en deux groupes. Le groupe des PLD ζ , apparenté aux PLDs de mammifères (mPLD), possède un domaine catalytique avec deux motifs HKD (rectangle), des domaines PH et PX et un domaine de fixation du PIP₂ (losange). Le second groupe contient les PLDs spécifiques des végétaux avec un domaine C2 de fixation du PIP₂ dépendant du Ca²⁺ et un motif DRY (rond) (d'après Wang, 2005). (B) Les PLCs végétales appartiennent au groupe des PLC ζ animales. Elles possèdent un domaine *EF-Hand* de fixation du Ca²⁺, un domaine C2 et deux domaines catalytiques X et Y (d'après Munnik & Testerink, 2009). (C) Les DAGKs végétales sont réparties en 3 groupes. Elles possèdent toutes un domaine kinase (DK) à leur extrémité C-terminale. Les protéines du groupe I (CI) possèdent en plus deux domaines C1 riches en cystéine permettant leur interaction avec d'autres molécules et un domaine d'adressage à la membrane (triangle). La DAGK5 possède un domaine potentiel de fixation à la calmoduline (carré) qui résulte d'un épissage alternatif (d'après Arisz *et al.*, 2009).

des polyphosphoinositides (van Leeuwen *et al.*, 2004). L'autre groupe constitué des 10 autres PLDs est subdivisé en cinq classes α , β , γ , δ et ϵ . Les PLDs de chacune de ces classes possèdent à leur extrémité N-terminale un domaine C2 de fixation du PI(4,5)P₂ dépendant du Ca²⁺, la présence de ce domaine étant spécifique de ce groupe de PLDs végétales.

La localisation subcellulaire des PLDs végétales est variable (Li *et al.*, 2009). Les PLD α 3, δ , ϵ et ζ 1 sont par exemple associées à la membrane plasmique (Hong *et al.*, 2008, 2009) alors que les PLD α 1, ζ 2 et γ 1 seraient plutôt localisées au niveau des membranes intracellulaires (Fan *et al.*, 1999 ; Yamaryo *et al.*, 2008).

Il existe peu de données concernant la régulation transcriptionnelle des PLDs en réponse aux contraintes hydriques. Une accumulation des transcrits *PLD δ* a été observée en réponse à une contrainte hyperosmotique (Katagiri *et al.*, 2001). Cependant, plusieurs PLDs semblent être également impliquées dans les réponses à la salinité, à la sécheresse et à l'ABA (Hong *et al.*, 2008 ; Bargmann *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2009). Ainsi, la PLD α 1 est impliquée dans la régulation de la fermeture des stomates en réponse à l'ABA (Zhang *et al.*, 2004). Les PLD α 3

et δ participent à la réponse à la contrainte saline car l'inactivation de ces gènes entraîne une hypersensibilité des plantes au sel (Hong *et al.*, 2008; Bargmann *et al.*, 2009).

Une des propriétés remarquables des PLDs est de présenter une très grande affinité pour les alcools primaires comme le butanol-1. Celui-ci peut être utilisé comme substrat par les PLDs en se substituant à l'eau au cours d'une réaction de transphosphatidylolation (Munnik *et al.*, 1995; Munnik, 2001). Il se forme alors un composé inactif, le phosphatidyl butanol (PBut), à la place du PA. L'application de butanol-1 à de jeunes plantes d'*A. thaliana* conduit à une accumulation de proline en absence de toute contrainte hydrique. Cette accumulation est corrélée à la surexpression du gène *P5CS1*, qui code pour la pyrroline-5-carboxylate synthétase, enzyme clé de la biosynthèse de la proline. Le PA produit par les PLDs en condition normale de croissance participerait donc à l'inhibition de l'expression des gènes du métabolisme de la proline. Cette inhibition serait levée en condition de contrainte hydrique afin de permettre l'accumulation de cet osmolyte. Pour la première fois, nous avons donc pu montrer que les PLDs pouvaient aussi jouer un rôle de régulateur négatif (Thiery *et al.*, 2004). Plus récemment, le mutant *pld α 1* a été montré comme étant plus tolérant au froid (Rajashekar *et al.*, 2006). Les PLDs semblent donc être des régulateurs positifs mais aussi négatifs impliqués dans la signalisation en réponse à des contraintes abiotiques.

Les phospholipases C participent à la formation du PA

Chez les animaux, il existe 13 isoformes de PLC réparties en six classes distinctes β , γ , δ , ε , η et ζ en fonction de la structure des protéines. Chez les végétaux, seule la classe des PLC ζ est présente avec neuf gènes (Munnik & Testerink, 2009). Les PLC ζ végétales sont constituées de deux domaines catalytiques X et Y, d'un domaine C2 de fixation des lipides et d'une extension de type « *EF Hand* » de fixation du Ca^{2+} (figure 2B) (Mueller-Roeber & Pical, 2002; Munnik & Testerink, 2009). Les autres classes de PLC animales, plus complexes, possèdent une deuxième extension *EF Hand* et un domaine de régulation PH. Chez les végétaux, des activités PLCs ont été détectées à la fois dans la fraction soluble et dans la fraction membranaire. Ces activités sont toutes régulées par le Ca^{2+} , les PLCs associées aux membranes présentant une plus grande sensibilité vis-à-vis du Ca^{2+} (Mueller-Roeber & Pical, 2002). Il a été montré que les PLCs membranaires sont capables d'hydrolyser aussi bien le PI4P que le PI(4,5)P₂ (Mueller-Roeber & Pical, 2002). Le PI4P peut représenter jusqu'à 80 % du pool des phos-

phoinositides contrairement au PI(4,5)P₂ qui est lui très peu abondant dans les membranes plasmiques végétales. Les PLCs végétales pourraient donc hydrolyser préférentiellement le PI4P et former de l'inositol 1,4-bisphosphate (IP₂) au lieu de l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) (Munnik & Testerink, 2009). L'IP₂ pourrait alors être phosphorylé par des inositolpolyphosphate-multikinases (IPK) pour donner des formes polyphosphorylées de l'inositol-phosphate.

L'expression de la plupart des gènes *PLC* est induite en réponse à l'ABA et à différentes contraintes environnementales telles que le froid, la sécheresse et la salinité (Hirayama *et al.*, 1995; Hunt *et al.*, 2004; Tasma *et al.*, 2008).

Chez les végétaux, le DAG est rapidement transformé en PA à la suite de sa phosphorylation par une DAGK (Testerink & Munnik, 2005; Arisz *et al.*, 2009). Chez les animaux, il existe 10 gènes *DAGK* répartis en cinq classes. Chez *A. thaliana*, sept gènes *DAGK* ont été mis en évidence et sont répartis en trois classes. Les deux *DAGK* végétales de classe I sont proches des *DAGK ε* animales (figure 2C). Ces protéines sont caractérisées par un domaine catalytique conservé, deux domaines C1 riches en cystéine et une hélice transmembranaire qui permettrait l'association de cette protéine à la membrane. Les cinq *DAGK* végétales de classes II/III se distinguent par une structure plus simple sans domaine C1 ni domaine transmembranaire. La régulation des *DAGK* végétales est donc probablement différente de celle des *DAGK* animales. Les activités *DAGK* sont principalement détectées au niveau de la membrane plasmique. Toutefois, elles apparaissent également associées au noyau, au cytosquelette et au chloroplaste.

La voie PLC/DAGK est à l'origine de la formation de PA en réponse au froid (Ruelland *et al.*, 2002) et en présence de NO afin de réguler la fermeture des stomates (Distefano *et al.*, 2008). Mais il n'existe encore aucune donnée indiquant quelles isoformes des PLCs et des DAGKs sont impliquées dans la production de PA en réponse à des contraintes hydriques.

La complexité des sources du PA

La nature du PA produit par les voies PLC ou PLD peut varier en fonction de la composition en acides gras des substrats de ces enzymes. Cette différence de composition en acides gras pourrait agir sur la spécificité du PA vis-à-vis de ses cibles.

De plus, l'existence de plusieurs isoformes de PLC et PLD avec des localisations intracellulaires différentes suggère une régulation spatio-temporelle de la production de PA. La diversité des cofacteurs participant à la régulation de ces enzymes ajoute un niveau de complexité supplémentaire à la multiplicité

des voies de signalisation activées en réponse à une contrainte. Ces cofacteurs participent vraisemblablement à la spécificité de la réponse induite en permettant par exemple un ancrage de l'enzyme dans une membrane.

Les cibles du PA

Le PA participe à la signalisation intracellulaire en facilitant le recrutement de ses molécules cibles aux membranes. Chez les animaux, les motifs PH, PX et C2 sont connus pour fixer le PA (Lemmon, 2008). Chez *Arabidopsis*, 53 protéines présentent un motif PH, 11 protéines possèdent un motif PX et plus de 200 protéines contiennent un domaine C2 (van Leeuwen *et al.*, 2004). Ces domaines sont présents chez certaines protéines-kinases et -phosphatases, chez des enzymes des voies de signalisation lipidique comme les deux PLD ζ , la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et chez certaines phosphatidylinositol 4-kinases (PI4K). La fixation du PA à ces protéines cibles permettrait de modifier leur localisation cellulaire et de moduler leur activité enzymatique. Ainsi, l'interaction du PA avec la protéine kinase PDK1 conduit à son activation (Deak *et al.*, 1999; Anthony *et al.*, 2004), alors que la protéine phosphatase PP2C ABI1 est inhibée à la suite de cette interaction (Zhang *et al.*, 2004).

Alors que la fixation du PA à PDK1 se fait au niveau d'un domaine PH (Deak *et al.*, 1999; Anthony *et al.*, 2004), la fixation du PA à ABI1 a lieu dans une région de la protéine qui ne présente aucune homologie avec les domaines connus de fixation du PA (Zhang *et al.*, 2004). Ceci suggère qu'il pourrait exister d'autres domaines de fixation du PA spécifiques des végétaux.

Modulation des niveaux de PA par les PA-kinases

Une des particularités que les végétaux partagent avec les levures est que le PA peut être à son tour phosphorylé par une PA-kinase (PAK) pour donner du diacylglycérol-pyrophosphate (DGPP) (pour revue, van Schooten *et al.*, 2006) (figure 1A). La production de DGPP est toujours précédée par une accumulation de PA. La conversion du PA en DGPP est un mécanisme possible de régulation des niveaux intracellulaires de PA, que ce dernier provienne des PLCs ou des PLDs.

Une accumulation de DGPP a été observée en réponse à une contrainte hyperosmotique chez *Craterostigma plantagineum*, dans des cellules de tomate, de luzerne et d'*A. thaliana*, mais aussi en réponse à des contraintes biotiques chez la luzerne (Pical *et al.*, 1999; Munnik *et al.*, 2000; den Hartog *et al.*, 2001, 2003).

L'application d'ABA à des cellules en suspension ou des graines d'*A. thaliana* induit aussi une accumulation de DGPP. Celui-ci est considéré comme un second messager impliqué dans la réponse à la contrainte hydrique (Munnik *et al.*, 2000) et à l'ABA (Zalejski *et al.*, 2005) en raison du fait que l'ajout de certaines formes de DGPP régule les courants anioniques de la membrane plasmique et induit l'expression du gène *Rab18*.

Cependant, aucun gène codant pour une PAK n'a pu être cloné jusqu'à présent chez les végétaux, même si une activité PAK a été détectée au niveau de cellules en suspension de *Catharanthus roseus* (Wissing & Behrbohm, 1993; Wissing *et al.*, 1994).

L'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) participe-t-il à la signalisation calcique chez les végétaux ?

L'hydrolyse du PI(4,5)P₂ par les PLCs conduit à la synthèse de DAG et du second messager IP₃ (figure 1A). Le rôle de ce dernier dans la signalisation cellulaire est bien connu chez les eucaryotes. Chez les animaux, l'IP₃ se fixe sur des canaux calciques localisés au niveau du réticulum endoplasmique et permet ainsi la remobilisation des stocks de Ca²⁺ intracellulaires. Les variations des teneurs en Ca²⁺ cytosoliques sont connues pour être un élément primordial dans la signalisation cellulaire. Chez les végétaux, on a montré que l'IP₃ était impliqué dans la régulation des concentrations en Ca²⁺ intracellulaires, en réponse à un choc thermique chez *A. thaliana* (Liu *et al.*, 2006) et dans la croissance du tube pollinique d'*Agapanthus umbellatus* (Monteiro *et al.*, 2005). Cependant, aucun récepteur à l'IP₃ n'a été mis en évidence jusqu'à présent chez les végétaux. Récemment, d'autres études suggèrent un rôle essentiel du myo-inositol-hexakisphosphate (IP₆) dans la remobilisation des stocks de Ca²⁺ intracellulaires chez les végétaux. En effet, dans les cellules de garde de *Solanum tuberosum*, une augmentation des teneurs en IP₆ est observée en réponse à l'ABA (Lemtiri-Chlieh *et al.*, 2000). Ces auteurs ont montré qu'une injection d'IP₆ conduit à la remobilisation des stocks de Ca²⁺ intracellulaires et induit l'inhibition des canaux K⁺ entrants de la membrane plasmique, ce qui participe à la fermeture des stomates (Lemtiri-Chlieh *et al.*, 2003).

L'IP₆ pourrait être formé par phosphorylations successives par des inositolpolyphosphate-multikinases (IPK) soit de l'IP₂ produit par l'hydrolyse du PI4P (Munnik & Testerink, 2009), soit de l'IP₃ produit par l'hydrolyse du PI(4,5)P₂ (figure 1A). Cela est notamment conforté par le fait que l'expression constitutive du gène *IPK2 β* d'*A. thaliana*, codant pour une inositolpolyphosphate 3/6-kinase, confère

à des plants de tabac une meilleure tolérance aux contraintes hydriques (Yang *et al.*, 2008).

Les variations des concentrations en Ca^{2+} intracellulaires sont considérées comme des signaux par les cellules. On peut définir des signatures calciques qui sont caractérisées par différents paramètres tels que la source du Ca^{2+} , l'amplitude et la fréquence de la variation ainsi que sa localisation spatio-temporelle. Les différentes signatures calciques ainsi générées seraient à l'origine de la mise en place de réponses spécifiques. Ainsi, certaines signatures calciques sont dépendantes d'une activité PLC et participent à la mise en place des réponses aux contraintes environnementales. Chez *Commelina communis*, la fermeture des stomates en réponse à l'ABA est régulée par des oscillations Ca^{2+} dépendantes d'une voie PLC (Staxen *et al.*, 1999).

Cependant, les signatures calciques ne sont pas toujours à l'origine de réponses biologiques. En effet, il a été observé qu'une concentration seuil en Ca^{2+} intracellulaire peut être à l'origine du déclenchement d'une réponse spécifique. Nous avons ainsi pu montrer en utilisant des plantes transgéniques exprimant l'æquorine qu'un certain seuil calcique est nécessaire pour déclencher la réponse prolinique *via* les PLCs en réponse à une contrainte saline (Parre *et al.*, 2007).

Les phosphoinositides

En réponse à des contraintes hydriques et salines, les végétaux, comme les levures, accumulent des phosphoinositides, en particulier le PI3P, le PI(3,5)P₂ et le PI(4,5)P₂ (Pical *et al.*, 1999; DeWald *et al.*, 2001; Meijer *et al.*, 2001). Ces différentes molécules sont considérées comme des seconds messagers chez les végétaux comme chez les animaux. Les phosphoinositides dérivent du phosphatidylinositol (PI) par phosphorylation des groupes hydroxyles libres en position D3, D4 et D5 de l'inositol par des lipide-kinases (figure 1B). On trouve ainsi les phosphoinositides monophosphates tels que les PI3P, PI4P et PI5P, les phosphoinositides bisphosphates comme les PI(4,5)P₂, PI(3,5)P₂ et PI(3,4)P₂ et le phosphoinositide trisphosphate PI(3,4,5)P₃ (Mueller-Roeber & Pical, 2002; Meijer & Munnik, 2003; Munnik & Testerink, 2009). Ces phosphoinositides ont tous été mis en évidence chez les végétaux, à l'exception du PI(3,4)P₂, et du PI(3,4,5)P₃. La caractérisation de ces différentes lipide-kinases est donc indispensable pour mieux appréhender la régulation de la synthèse de ces seconds messagers.

La phosphatidylinositol 3-kinase

Les PI3-kinases (PI3K) phosphorylent le PI en position 3D (figure 1B). Chez *A. thaliana*, un gène unique

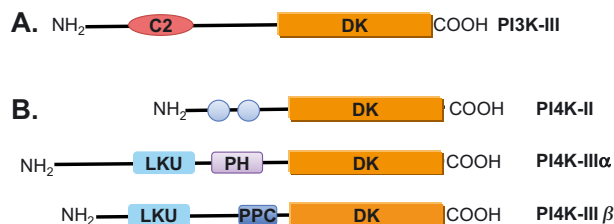


Fig. 3. Structure des PI3-kinases et des PI4-kinases. (A) La PI3K végétale, apparentée aux PI3K de classe III animales et à la protéine VPS34 de levure, possède un domaine catalytique à l'extrémité C-terminale et un domaine C2 de fixation du PIP₂ dépendant du Ca^{2+} (d'après Mueller-Roeber & Pical, 2002). (B) Les PI4K végétales possèdent toutes un domaine kinase en position C-terminale. Les PI4K de classe II possèdent en plus deux domaines d'ubiquitination (rond) dans la partie N-terminale. Les PI4K de classe III possèdent aussi un domaine LKU de fixation de substrats dans la partie N-terminale. Les PI4K de classe III α ont un domaine PH alors que les PI4K de classe III β possèdent un domaine PPC d'adressage à la membrane (d'après Mueller-Roeber & Pical, 2002).

code pour la PI3K. La PI3K végétale est apparentée à la protéine VPS34 de levure et aux PI3K animales de classe III. Ces protéines ont la particularité d'utiliser comme substrat unique le PI contrairement aux PI3K de classes I et II animales qui phosphorylent aussi différents PIP. Les PI3K de classe III possèdent en plus de leur domaine kinase un domaine C2 de fixation du PIP₂ dépendant du Ca^{2+} (figure 3A) (Mueller-Roeber & Pical, 2002).

Chez les animaux et les levures, les protéines de cette classe sont impliquées dans la régulation du trafic vésiculaire, la prolifération cellulaire et l'autophagie (pour revue Backer, 2008). Chez les végétaux, la PI3K est indispensable à la croissance de la plante (Welters *et al.*, 1994) et au développement du grain de pollen (Lee *et al.*, 2008). Plusieurs études ont montré que le PI3P participe à la régulation de la fermeture des stomates en réponse à l'ABA (Jung *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2008). Dans les cellules de garde, le PI3P régulerait la formation de formes actives de l'oxygène (FAO) qui joueraient le rôle d'intermédiaire dans la fermeture des stomates (Park *et al.*, 2003). De plus, en réponse à une contrainte saline, le PI3P formé dans des racines d'*Arabidopsis* permettrait l'endocytose de la NADPH-oxydase. Ce processus favoriserait la formation de FAO qui agiraient comme des seconds messagers dans la mise en place des réponses aux contraintes salines (Leshem *et al.*, 2007).

Le PI3P peut s'associer à des domaines protéiques de type FYVE ou PX (Meijer & Munnik, 2003). Les protéines possédant ces domaines pourraient alors être recrutées à la membrane par ces phosphoinositides pour participer à la transduction du signal et/ou au

déclenchement d'une réponse spécifique (van Leeuwen *et al.*, 2004)

Les phosphatidylinositol 4-kinases

Les PI4-kinases (PI4K) phosphorylent le PI en position 4D (figure 1B). Chez les animaux, comme chez les végétaux, les PI4K sont classées en deux groupes, les groupes II et III, en fonction de leur sensibilité à la wortmannine (Mueller-Roeber & Pical, 2002; Balla & Balla, 2006). Les PI4Ks de type II sont des protéines membranaires insensibles à la wortmannine. Chez *A. thaliana*, huit gènes ont été identifiés. Six de ces protéines possèdent un domaine d'ubiquitination (figure 3B). Les PI4Ks de type III sont sensibles à la wortmannine; elles sont réparties en deux classes α et β , codées chacune par deux gènes. Ces protéines possèdent en plus de leur domaine catalytique un domaine LKU de fixation de substrats et un domaine PPC d'adressage à la membrane (figure 3B). Chez les eucaryotes, les PI4K, en plus de leur rôle dans la production de PI(4,5)P₂, sont impliquées dans la régulation du trafic vésiculaire et de l'endocytose conduisant à la dégradation des protéines (Balla & Balla, 2006). Il existe peu de données sur le rôle du PI4P dans la réponse aux contraintes environnementales. Cependant, à l'instar du PI3P, le PI4P est impliqué dans la régulation de la fermeture des stomates en réponse à l'ABA (Jung *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2008).

Les phosphoinositides monophosphates 5-kinases

Les PIP5-kinases (PIP5K) phosphorylent le PIP en position 5D (figure 1B). Chez *Arabidopsis*, 15 gènes codant pour des PIPkinases ont été identifiés. Quatre d'entre eux possèdent de fortes homologies avec des PI3P5K, les autres seraient plutôt apparentés à des PI4P5K (Mueller-Roeber & Pical, 2002). Les PI3P5K et les PI4P5K phosphorylent le PI3P et le PI4P pour former respectivement le PI(3,5)P₂ et le PI(4,5)P₂.

Le PI(4,5)P₂ pourrait jouer différents rôles dans la signalisation lipidique en réponse aux contraintes hydriques et salines; il est notamment le substrat des PLCs et participerait aussi à la formation de vésicules d'endocytose (Konig *et al.*, 2008). Celles-ci permettraient l'internalisation de portions de la membrane plasmique à la suite de la plasmolyse en réponse à une contrainte hydrique, afin de maintenir l'intégrité de la membrane (Heilmann, 2008).

Conclusion

Les voies de signalisation lipidique végétales présentent de nombreuses similitudes avec celles

décrites chez les animaux. La majeure partie des enzymes impliquées dans ces voies de signalisation, telles que les PI-kinases et les PIP-kinases, les PLCs et les PLDs, les DAG-kinases, est présente à la fois chez les animaux et les végétaux. Cependant, certaines spécificités végétales sont apparues. Ainsi, certains seconds messagers qui sont primordiaux dans la signalisation animale, comme le DAG, ne semblent pas jouer de rôle important dans la signalisation chez les végétaux. À l'inverse, d'autres seconds messagers, comme le PA, ont une place centrale dans la signalisation chez les végétaux. Une autre particularité des végétaux est l'absence de récepteur de l'IP₃. La remobilisation des stocks de Ca²⁺ intracellulaires, acteur fondamental de la signalisation cellulaire, dépendrait plutôt de l'IP₆. L'étude de ces voies de signalisation lipidique impliquées dans la mise en place de réponses adaptatives à la contrainte hydrique, telles que la fermeture des stomates ou l'accumulation de proline, permet de révéler les points de convergence et de divergence qui existent entre le règne animal et le règne végétal.

References

- Anthony R.G., Henriques R., Helfer A., Meszaros T., Rios G., Testerink C., Munnik T., Deak M., Koncz C., Bogre L., A protein kinase target of a PDK1 signalling pathway is involved in root hair growth in *Arabidopsis*. *EMBO J*, 2004, 23, 572-581.
- Arisz S.A., Testerink C., Munnik T., Plant PA signalling via diacylglycerol kinase. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1791, 869-875.
- Backer J.M., The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J*, 2008, 410, 1-17.
- Balla A., Balla T., Phosphatidylinositol 4-kinases: old enzymes with emerging functions. *Trends Cell Biol*, 2006, 16, 351-361.
- Bargmann B.O., Laxalt A.M., ter Riet B., van Schooten B., Merquiol E., Testerink C., Haring M.A., Bartels D., Munnik T., Multiple PLDs required for high salinity and water deficit tolerance in plants. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50, 78-89.
- Choi Y., Lee Y., Jeon B.W., Staiger C.J., Phosphatidylinositol 3- and 4-phosphate modulate actin filament reorganization in guard cells of day flower. *Plant Cell Environ*, 2008, 31, 366-377.
- Davies W., Kudoyarova G., Hartung W., Long-distance ABA signaling and its relation to other signaling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought. *J Plant Growth Regul* 2005, 24, 285-295.
- Deak M., Casamayor A., Currie R.A., Downes C.P., Alessi D.R., Characterisation of a plant 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 homologue which contains a pleckstrin homology domain. *FEBS Lett*, 1999, 451, 220-226.

- den Hartog M., Musgrave A., Munnik T., Nod factor-induced phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate formation: a role for phospholipase C and D in root hair deformation. *Plant J*, 2001, 25, 55-65.
- den Hartog M., Verhoef N., Munnik T., Nod factor and elicitors activate different phospholipid signaling pathways in suspension-cultured alfalfa cells. *Plant Physiol*, 2003, 132, 311-317.
- Devaiah S.P., Roth M.R., Baughman E., Li M., Tamura P., Jeannotte R., Welti R., Wang X., Quantitative profiling of polar glycerolipid species from organs of wild-type *Arabidopsis* and a phospholipase Dalpha1 knockout mutant. *Phytochem*, 2006, 67, 1907-1924.
- DeWald D.B., Torabinejad J., Jones C.A., Shope J.C., Cangelosi A.R., Thompson J.E., Prestwich G.D., Hama H., Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2001, 126, 759-769.
- Distefano A.M., Garcia-Mata C., Lamattina L., Laxalt A.M., Nitric oxide-induced phosphatidic acid accumulation: a role for phospholipases C and D in stomatal closure. *Plant Cell Environ*, 2008, 31, 187-194.
- Fan L., Zheng S., Cui D., Wang X., Subcellular distribution and tissue expression of phospholipase Dalpha, Dbeta, and Dgamma in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 1999, 119, 1371-1378.
- Heilmann I., Towards understanding the function of stress-inducible PtdIns(4,5)P(2) in plants. *Commun Integr Biol*, 2008, 1, 204-206.
- Hirayama T., Ohto C., Mizoguchi T., Shinozaki K., A gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92, 3903-3907.
- Hong Y., Devaiah S.P., Bahn S.C., Thamasandra B.N., Li M., Welti R., Wang X., Phospholipase D epsilon and phosphatidic acid enhance *Arabidopsis* nitrogen signaling and growth. *Plant J*, 2009, 58, 376-387.
- Hong Y., Pan X., Welti R., Wang X., Phospholipase Dalpha3 is involved in the hyperosmotic response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2008, 20, 803-816.
- Hunt L., Otterhag L., Lee J.C., Lasheen T., Hunt J., Seki M., Shinozaki K., Sommarin M., Gilmour D.J., Pical C., Gray J.E., Gene-specific expression and calcium activation of *Arabidopsis thaliana* phospholipase C isoforms. *New Phytologist*, 2004, 162, 643-654.
- Jung J.Y., Kim Y.W., Kwak J.M., Hwang J.U., Young J., Schroeder J.I., Hwang I., Lee Y., Phosphatidylinositol 3- and 4-phosphate are required for normal stomatal movements. *Plant Cell*, 2002, 14, 2399-2412.
- Katagiri T., Takahashi S., Shinozaki K., Involvement of a novel *Arabidopsis* phospholipase D, AtPLDdelta, in dehydration-inducible accumulation of phosphatidic acid in stress signalling. *Plant J*, 2001, 26, 595-605.
- Kavi Kishor P.B., Sangam S., Amrutha R.N., Sri Laxm P., Naidu K.R., Rao K.R.S.S., Rao S., Reddy K.J., Theriappan P., Sreenivasulu N., Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr Sci*, 2005, 88, 424-438.
- Konig S., Ischebeck T., Lerche J., Stenzel I., Heilmann I., Salt-stress-induced association of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate with clathrin-coated vesicles in plants. *Biochem J*, 2008, 415, 387-399.
- Lee Y., Kim E.S., Choi Y., Hwang I., Staiger C.J., Chung Y.Y., The *Arabidopsis* phosphatidylinositol 3-kinase is important for pollen development. *Plant Physiol*, 2008, 147, 1886-1897.
- Lemmon M.A., Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9, 99-111.
- Lemtiri-Chlieh F., MacRobbie E.A., Brearley C.A., Inositol hexakisphosphate is a physiological signal regulating the K⁺-inward rectifying conductance in guard cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97, 8687-8692.
- Lemtiri-Chlieh F., MacRobbie E.A., Webb A.A., Manison N.F., Brownlee C., Skepper J.N., Chen J., Prestwich G.D., Brearley C.A., Inositol hexakisphosphate mobilizes an endomembrane store of calcium in guard cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100, 10091-10095.
- Leshem Y., Seri L., Levine A., Induction of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance. *Plant J*, 2007, 51, 185-197.
- Li M., Hong Y., Wang X., Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1791, 927-935.
- Liu H.T., Gao F., Cui S.J., Han J.L., Sun D.Y., Zhou R.G., Primary evidence for involvement of IP₃ in heat-shock signal transduction in *Arabidopsis*. *Cell Res*, 2006, 16, 394-400.
- Mahajan S., Tuteja N., Cold, salinity and drought stresses : An overview. *Arch Biochem Biophys*, 2005, 444, 139-158.
- Meijer H.J., Berrie C.P., Iurisci C., Divecha N., Musgrave A., Munnik T., Identification of a new polyphosphoinositide in plants, phosphatidylinositol 5-monophosphate (PtdIns5P), and its accumulation upon osmotic stress. *Biochem J*, 2001, 360, 491-498.
- Meijer H.J., Munnik T., Phospholipid-based signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2003, 54, 265-306.
- Monteiro D., Liu Q., Lisboa S., Scherer G.E., Quader H., Malho R., Phosphoinositides and phosphatidic acid regulate pollen tube growth and reorientation through modulation of [Ca²⁺]_c and membrane secretion. *J Exp Bot*, 2005, 56, 1665-1674.
- Mueller-Roeber B., Pical C., Inositol phospholipid metabolism in *Arabidopsis*. Characterized and putative isoforms of inositol phospholipid kinase and phosphoinositide-specific phospholipase C. *Plant Physiol*, 2002, 130, 22-46.
- Munnik T., Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends Plant Sci*, 2001, 6, 227-233.
- Munnik T., Arisz S.A., De Vrije T., Musgrave A., G Protein activation stimulates phospholipase D signaling in plants. *Plant Cell*, 1995, 7, 2197-2210.

- Munnik T., Meijer H.J., Ter Riet B., Hirt H., Frank W., Bartels D., Musgrave A., Hyperosmotic stress stimulates phospholipase D activity and elevates the levels of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant J*, 2000, 22, 147-154.
- Munnik T., Testerink C., Plant phospholipid signaling: "in a nutshell". *J Lipid Res*, 2009, 50 Suppl, S260-S265.
- Munns R., Tester M., Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59, 651-681.
- Park K.Y., Jung J.Y., Park J., Hwang J.U., Kim Y.W., Hwang I., Lee Y., A role for phosphatidylinositol 3-phosphate in abscisic acid-induced reactive oxygen species generation in guard cells. *Plant Physiol*, 2003, 132, 92-98.
- Parre E., Ghars M.A., Leprince A.S., Thiery L., Lefebvre D., Bordenave M., Richard L., Mazars C., Abdely C., Savouré A., Calcium signaling via phospholipase C is essential for proline accumulation upon ionic but not nonionic hyperosmotic stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2007, 144, 503-512.
- Pical C., Westergren T., Dove S.K., Larsson C., Sommarin M., Salinity and hyperosmotic stress induce rapid increases in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, diacylglycerol pyrophosphate, and phosphatidylcholine in *Arabidopsis thaliana* cells. *J Biol Chem*, 1999, 274, 38232-38240.
- Rajashekar C.B., Zhou H.E., Zhang Y., Li W., Wang X., Suppression of phospholipase D α 1 induces freezing tolerance in *Arabidopsis*: response of cold-responsive genes and osmolyte accumulation. *J Plant Physiol*, 2006, 163, 916-926.
- Ruelland E., Cantrel C., Gawer M., Kader J.C., Zachowski A., Activation of phospholipases C and D is an early response to a cold exposure in *Arabidopsis* suspension cells. *Plant Physiol*, 2002, 130, 999-1007.
- Staxen I., Pical C., Montgomery L.T., Gray J.E., Hetherington A.M., McAinsh M.R., Abscisic acid induces oscillations in guard-cell cytosolic free calcium that involve phosphoinositide-specific phospholipase C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96, 1779-1784.
- Tasma I.M., Brendel V., Whitham S.A., Bhattacharyya M.K., Expression and evolution of the phosphoinositide-specific phospholipase C gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem*, 2008, 46, 627-637.
- Testerink C., Munnik T., Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends Plant Sci*, 2005, 10, 368-375.
- Thiery L., Leprince A.S., Lefebvre D., Ghars M.A., Debarbieux E., Savouré A., Phospholipase D is a negative regulator of proline biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 2004, 279, 14812-14818.
- Tran L.S., 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*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104, 20623-20628.
- 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.
- van der Luit A.H., Piatti T., van Doorn A., Musgrave A., Felix G., Boller T., Munnik T., Elicitation of suspension-cultured tomato cells triggers the formation of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant Physiol*, 2000, 123, 1507-1516.
- van Leeuwen W., Okresz L., Bogre L., Munnik T., Learning the lipid language of plant signalling. *Trends Plant Sci*, 2004, 9, 378-384.
- van Schooten B., Testerink C., Munnik T., Signalling diacylglycerol pyrophosphate, a new phosphatidic acid metabolite. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1761, 151-159.
- Wang X., Lipid signaling. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, 7, 329-336.
- Wang X., Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses. *Plant Physiol*, 2005, 139, 566-573.
- Welters P., Takegawa K., Emr S.D., Chrispeels M.J., AtVPS34, a phosphatidylinositol 3-kinase of *Arabidopsis thaliana*, is an essential protein with homology to a calcium-dependent lipid binding domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91, 11398-11402.
- Wissing J.B., Behrbohm H., Phosphatidate kinase, a novel enzyme in phospholipid metabolism (purification, subcellular localization, and occurrence in the plant kingdom). *Plant Physiol*, 1993, 102, 1243-1249.
- Wissing J.B., Kornak B., Funke A., Riedel B., Phosphatidate kinase, a novel enzyme in phospholipid metabolism (characterization of the enzyme from suspension-cultured *Catharanthus roseus* cells). *Plant Physiol*, 1994, 105, 903-909.
- Yamaryo Y., Dubots E., Albrieux C., Baldan B., Block M.A., Phosphate availability affects the tonoplast localization of PLD ζ 2, an *Arabidopsis thaliana* phospholipase D. *FEBS Lett*, 2008, 582, 685-690.
- Yang L., Tang R., Zhu J., Liu H., Mueller-Roeber B., Xia H., Zhang H., Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants constitutively expressing AtIpk2 β , an inositol polyphosphate 6-/3-kinase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 2008, 66, 329-343.
- Zalejski C., Zhang Z., Quettier A.L., Maldiney R., Bonnet M., Brault M., Demandre C., Miginiac E., Rona J.P., Sotta B., Jeannette E., Diacylglycerol pyrophosphate is a second messenger of abscisic acid signaling in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant J*, 2005, 42, 145-152.
- Zhang W., Qin C., Zhao J., Wang X., Phospholipase D α 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101, 9508-9513.
- Zhu J.K., Salt and drought stress signal transduction in plants. *Ann Rev Plant Biol*, 2002, 53, 247-273.