

MOEZ SMIRI

VOIES RESPIRATOIRES DES GRAINES

SOMMAIRE

Introduction.....	1
I- Analyse bibliographique.....	2
1- Toxicité du cadmium chez les végétaux.....	2
1-1- Sources de contamination et absorption.....	2
1-2- Perturbation des processus physiologiques	2
2- Effets du cadmium sur la germination.....	3
2-1- Reprise de l'activité respiratoire.....	4
2-1-1- Glycolyse.....	4
2-1-2- Cycle de l'acide citrique.....	5
2-1-3- Phosphorylation oxydative.....	6
2-1-4- Voie de l'oxydase alternative.....	7
2-2- Fermentation.....	8
2-3- Voie des pentoses-phosphates.....	8
2-4- Mobilisation des réserves énergétiques.....	10
II- Matériel & Méthodes.....	12
1- Matériel végétal.....	12
2- Conditions de germination.....	12
3- Récolte.....	12
4- Isolement des mitochondries et extraction des protéines.....	12
5- Extraction des protéines inactivatrices de l'alcool déshydrogénase.....	14
6- Mesure des activités enzymatiques.....	14
6-1- Malate déshydrogénase (EC 1.1.1.40).....	14
6-2- Succinate déshydrogénase (EC 1.3.99.1).....	15
6-3- Oxydoréduction du cytochrome.....	15
6-3-1- Cyt oxydase (EC 1.9.3.1).....	15
6-3-2- NADH-cyt réductase (EC 1.6.2.1).....	16
6-3-3- Succinate-cyt réductase (EC 1.3.99.1).....	16
6-4- Alcool déshydrogénase (EC 1.1.1.1).....	16
6-5- Inactivateur de l'alcool déshydrogénase.....	17
6-6- Glucose-6-phosphate déshydrogénase (EC 1.1.1.49) et 6-phosphogluconate déshydrogénase (EC 1.1.1.44).....	17

6-7- Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40).....	18
6-8- Invertases.....	18
7- Effets de Cd <i>in vitro</i> sur les activités enzymatiques.....	19
8- Extraction et dosage des sucres et acides aminés.....	19
8-1- Extraction.....	19
8-2- Dosage.....	20
8-2-1- Sucres solubles totaux.....	20
8-2-2- Glucose.....	20
8-2-3- Fructose.....	20
8-2-4- Acides aminés libres.....	20
9- Extraction et dosage de Cd, Cu, Fe, Mn et Zn.....	21
9-1- Extraction.....	21
9-2- Dosage.....	21
10- Analyse statistique.....	21
III- Résultats & discussion.....	22
1- Effets de Cd sur le pouvoir germinatif des graines.....	22
2- Effets de Cd sur les activités enzymatiques respiratoires.....	23
2-1- Cycle de Krebs et chaîne respiratoire.....	24
2-2- Fermentation.....	32
2-3- Voie des pentoses-phosphates.....	34
3- Effets de Cd sur la mobilisation des réserves glucidiques dans l'axe embryonnaire.....	36
IV- Conclusions & perspectives.....	41
Références bibliographiques.....	43

Introduction

Par son importance dans le cycle végétatif de la plante, la germination est une phase limitante en conditions de stress par les métaux lourds puisqu'elle constitue la première interaction avec les substrats pollués. Dans le laboratoire de Bio-Physiologie Cellulaires, où s'est effectuée la partie expérimentale de ce travail, un des axes de recherche développé s'intéresse au suivi des réactions métaboliques des graines imbibées par des solutions de sels de métaux lourds.

Les chercheurs de notre laboratoire ont montré, dans un travail précédent, que la vulnérabilité de la germination des graines de petit pois au cadmium est associée à un désordre nutritionnel conséquent à une défaillance dans le processus de mobilisation des réserves à partir des cotylédons vers les axes embryonnaires. La respiration étant la source principale de l'énergie nécessaire pour la reprise des activités métaboliques cellulaires, l'objectif du présent travail est d'étudier l'impact de Cd sur quelques activités enzymatiques représentatives du métabolisme respiratoire. Les analyses portent aussi bien sur les tissus de réserve (cotylédons) que les axes embryonnaires en croissance. Ces derniers sont examinés aussi pour leurs contenances en substrats glucidiques.

1- Toxicité du cadmium chez les végétaux

1-1- Sources de contamination et absorption

A l'unanimité des inventaires des agences de protection de l'environnement, le cadmium figure parmi les métaux lourds polluants et très toxiques (Krenkel et Novotny, 1980 ; Novotny, 1995). Élément trace non essentiel, Cd est considéré comme le plus toxique des contaminants métalliques (Prasad, 1995 ; Das et al., 1997). Son seuil tolérable dans les céréales et les légumineuses comestibles est de 0.1 mg/Kg (Harris et Taylor, 2001). Dans les sols non contaminés, la moyenne de Cd est de l'ordre de 0.5 mg/Kg, mais elle peut atteindre des niveaux extrêmement élevés dans les sols pollués (Vassilev, 2003 ; Benavides et al., 2005) par une forte utilisation des fertilisants phosphatés, des eaux d'égouts (Chaney, 1980) et des pesticides (Singh et Myhr, 1998).

Les mécanismes d'absorption du cadmium varient selon l'espèce végétale ; diffusion passive (Culter et Rains, 1974) ou voie énergétique (Cataldo et Wilding, 1978). L'absorption et le transport du cadmium dans la plante dépendent de certains facteurs comme le pH et la présence d'agents chélateurs dans la solution du sol (Sanders et al., 1986).

1-2- Perturbations des processus physiologiques vitaux

Les effets phytotoxiques du cadmium, qui se manifestent par une inhibition de la croissance et un retard de développement, résultent de nombreux dysfonctionnements nutritionnels et métaboliques dont les plus évidents sont :

- Une altération de la nutrition minérale chez plusieurs espèces végétales (Chaoui et al., 1997a ; Sayar-Hammami, 2005 ; Yoshihara et al., 2006) due à une compétition négative en faveur de Cd vis-à-vis des mécanismes de transport des autres ions (Greger et Lindberg, 1987).
- Une diminution de l'activité photosynthétique (Rascio et al., 1993) par altérations des chloroplastes et de la chlorophylle (Sandalio et al., 2001) et/ou inhibition de l'activité des enzymes de la fixation du carbone (De Fillippis et Ziegler, 1993).
- Un stress oxydant (Baccouch et al., 1998b ; Chaoui et al., 1997b ; 2004 ; Chaoui et El Ferjani, 2005 ; Sayar-Hammami, 2005 ; Smeets et al., 2005).
- Une génotoxicité ; fragmentation et méthylation de l'ADN (Aina et al., 2004) et installation de micronoyaux (Souguir, 2005).

2- Effets du cadmium sur la germination

Depuis l'absorption de l'eau par la graine jusqu'à l'élongation de l'axe embryonnaire et l'émergence de la radicule qui entoure l'embryon se succèdent l'ensemble des événements qui définissent la germination (Bradford, 1995 ; Bewley, 1997).

Au cours de ce processus métabolique complexe se déroulent de nombreux changements biochimiques et nutritionnels ; modification des potentiels hydrique et osmotique, consommation excessive des réserves, libération des sucres solubles, acides aminés et acides gras, diffusion des micronutriments et reprise de l'activité respiratoire (Bewley et Black, 1994). Cette dernière, très importante comme source d'énergie pour le métabolisme germinatif, dépend de l'ampleur de la diffusion de l'oxygène à travers les téguments vers les tissus de la graine, elle-même tributaire de la disponibilité de l'oxygène dans le milieu (Pretorius et al., 1998) et de la perméabilité des tissus tégumentaires (Van Dongen et al., 2003).

L'effet de l'oxygène comme facteur limitant est montré par une corrélation positive entre le pourcentage de germination et la croissance de l'axe embryonnaire, d'une part, et la teneur en O₂ dans les tissus de la graine ainsi que le taux d'émission de CO₂, d'autre part (Booth et Sowa, 2001).

Certes, Cd semble influencer les échanges gazeux (Prasad et al., 2001), mais interfère, surtout, avec l'arsenal enzymatique qui catalyse le métabolisme respiratoire. Ceci a été, d'abord, étudié chez des plantes entières, puis chez des graines en germination.

L'impact du métal sur la respiration se situe à plusieurs niveaux :

- Substitution aux cofacteurs d'enzymes mitochondriales; l'inhibition, par exemple de l'activité ATPase (Lindberg et Wingstand 1985) par formation du complexe ATPase-Cd (Hoganson et al., 1991).
- Perturbation de la chaîne de transport des électrons par induction d'une perméabilité passive des protons à travers la membrane mitochondriale interne suite à une perte du potentiel membranaire "Proton leak". Il en résulte une baisse des rapports stoechiométriques H⁺/O, P/O et ATP/ADP (Miller et al., 1973 ; Bittell et al., 1974 ; Kessler et Brand, 1994a-c).
- Stimulation enzymatique de la voie des pentoses-phosphates par augmentation des activités G6P- et 6PG-déshydrogénases (Mattioni et al., 1997 ; Léon et al., 2002). L'amélioration du pouvoir réducteur qui en résulte, nécessaire pour remédier contre le stress oxydatif (Jiménez et al., 1997), compense le manque en NADPH causé par la limitation de la photosynthèse (Léon et al., 2002).

Au niveau cellulaire, l'oxygène déclenche le métabolisme respiratoire, ce qui est souvent associé à une augmentation du nombre de mitochondries (Kollöffel et Sluys, 1970). Les voies métaboliques sont, alors, activées (glycolyse, cycle de Krebs et chaîne respiratoire) pour produire des quantités adéquates d'ATP indispensables au métabolisme cellulaire de l'axe embryonnaire (Ehrenshaft et Brambl, 1990 ; Attucci et al., 1991).

2-1- Reprise de l'activité respiratoire

2-1-1- Glycolyse

La glycolyse fait intervenir des enzymes cytoplasmiques qui dégradent les hexoses en pyruvate, un composé à trois atomes de carbone. L'oxydation des sucres produit du NADH aussi bien que de l'ATP (Fig. 1).

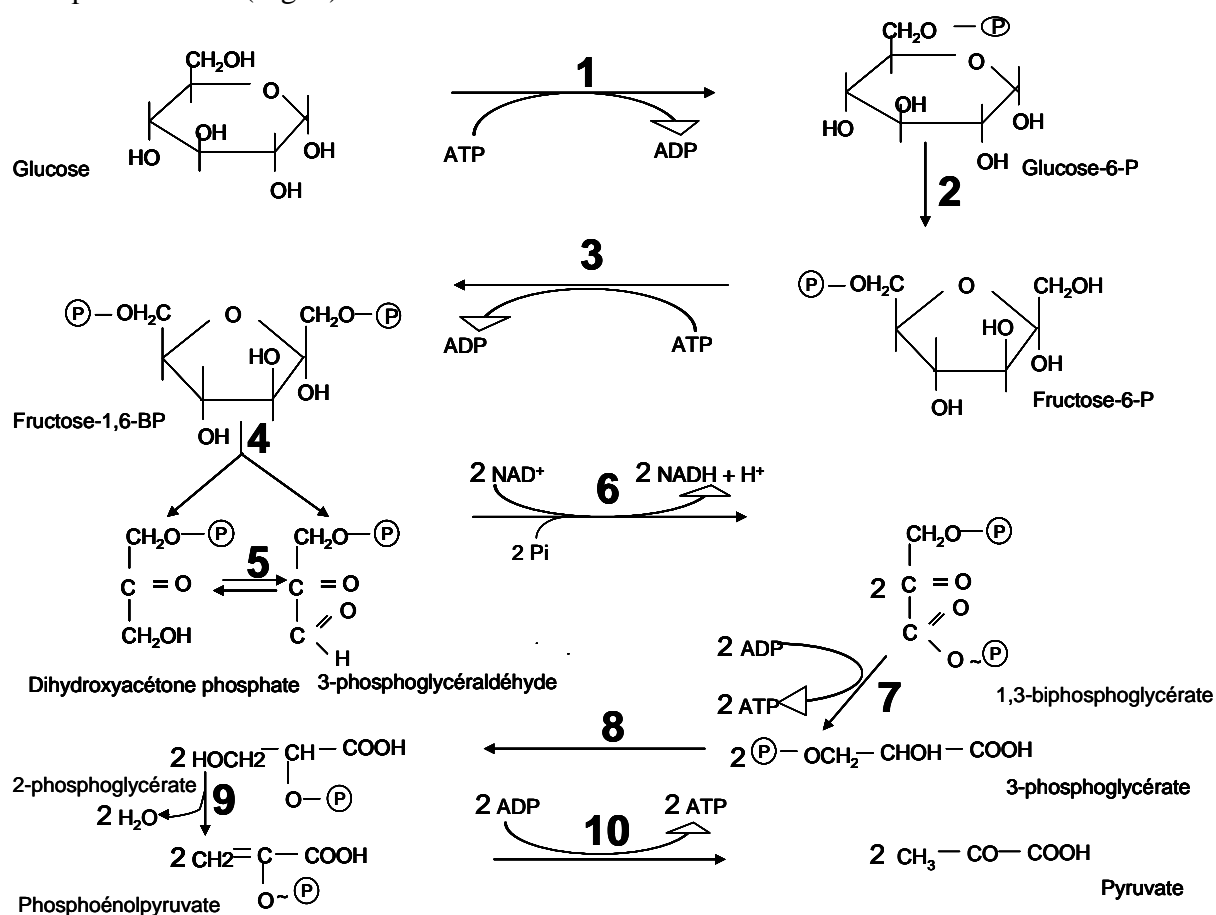


Figure 1 : Glycolyse : 1, hexokinase ; 2, phosphoglucosomerase ; 3, phosphofructokinase ; 4, aldolase ; 5, triose-phosphate isomerase ; 6, glyceraldéhyde-phosphate déshydrogénase ; 7, phosphoglycérate kinase ; 8, phosphoglycérate mutase ; 9, énilase ; 10, pyruvate kinase.

Ce processus métabolique est perturbé par plusieurs stress, et ce par altération de l'activité des enzymes de la glycolyse (Blum et Sinmena, 1994). A des concentrations de 0.25 à 1 mM, le cadmium inhibe, par exemple, l'activité hexokinase au cours de la germination des graines de petit pois (Chugh et Sowhney, 1999). *In vitro*, l'activité enzymatique est réduite de 62 % en présence de Cd (Chugh et Sowhney, 1996 ; 1999).

2-1-2- Cycle de l'acide citrique

Le cycle de Krebs, ou cycle des acides tricarboxyliques, se déroule dans la matrice mitochondriale. Mais avant d'y accéder, le pyruvate est oxydé et décarboxylé par l'activité pyruvate déshydrogénase pour former NADH et l'acétyl-CoA. Ce dernier entame le cycle par l'intermédiaire de l'activité citrate synthase qui transfère le groupement acétyl sur l'acide oxaloacétique pour synthétiser l'acide citrique. Il s'en suit une série de réactions conduisant à la régénération de l'acide oxaloacétique tout en libérant de l'énergie sous forme de composé phosphorylé (GTP) et de pouvoir réducteur (NAD(P)H et FADH₂) (Fig. 2).

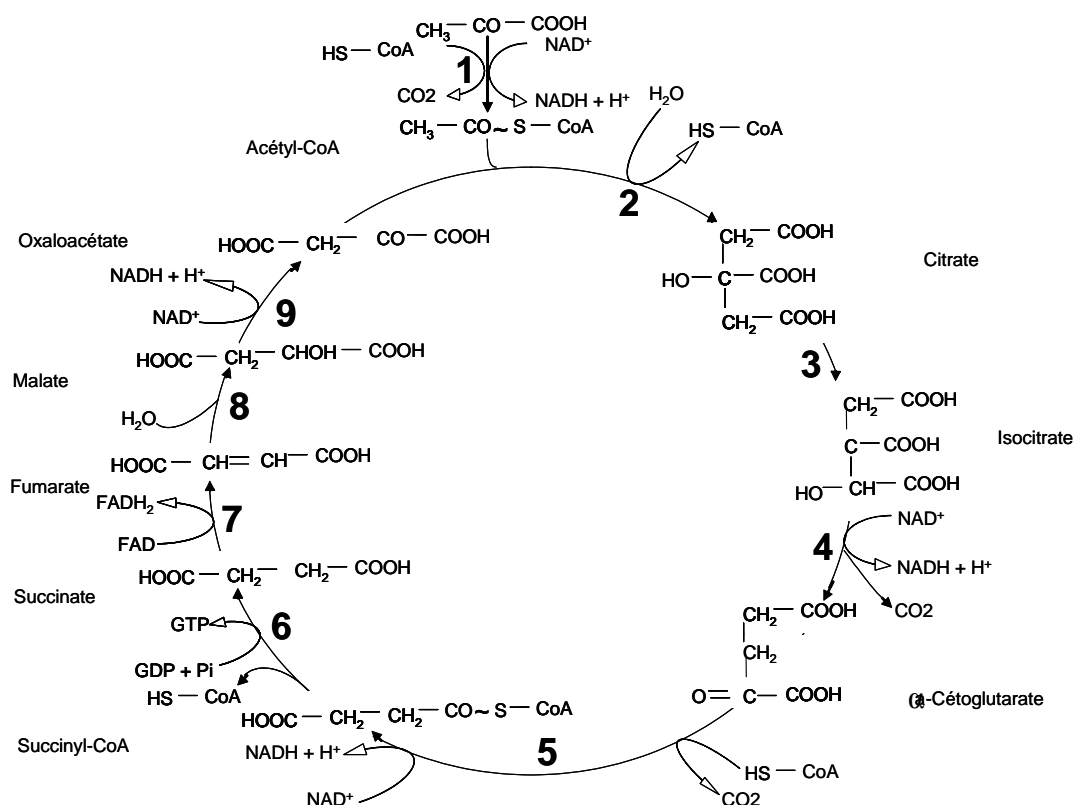


Figure 2 : Cycle de Krebs : 1, pyruvate déshydrogénase (complexe enzymatique) ; 2, citrate synthase ; 3, aconitase ; 4, isocitrate déshydrogénase ; 5, α -cétyoglutarate déshydrogénase (complexe enzymatique) ; 6, succinyl-CoA synthétase ; 7, succinate déshydrogénase ; 8, fumarase ; 9, malate déshydrogénase.

Les effets inhibiteurs de Cd sur l'activité respiratoire des graines de petit pois au cours de la germination peuvent se situer aussi au niveau des enzymes du cycle de Krebs (Chugh, 1991 ; Bansal et al., 2000 ; 2002). Ces derniers auteurs ont montré des diminutions des activités mitochondriales isocitrate-, α -cétoglutarate-, succinate- et malate-déshydrogénases par le stress au Cd.

2-1-3- Phosphorylation oxydative

Localisée dans la membrane mitochondriale interne, la chaîne respiratoire est composée de quatre complexes multiprotéiques appelés complexes I à IV (Fig. 3). Les substrats de la chaîne respiratoire sont le NADH au niveau du complexe I et le FADH_2 au niveau du complexe II. Cette voie de transfert des électrons est appelée aussi voie des cytochromes. Le transfert d'électrons est accompagné au niveau des complexes I, III et IV par un "pompage" de protons dans l'espace intermembranaire. Le gradient de protons ainsi créé permet la synthèse d'ATP lors de la phosphorylation oxydative.

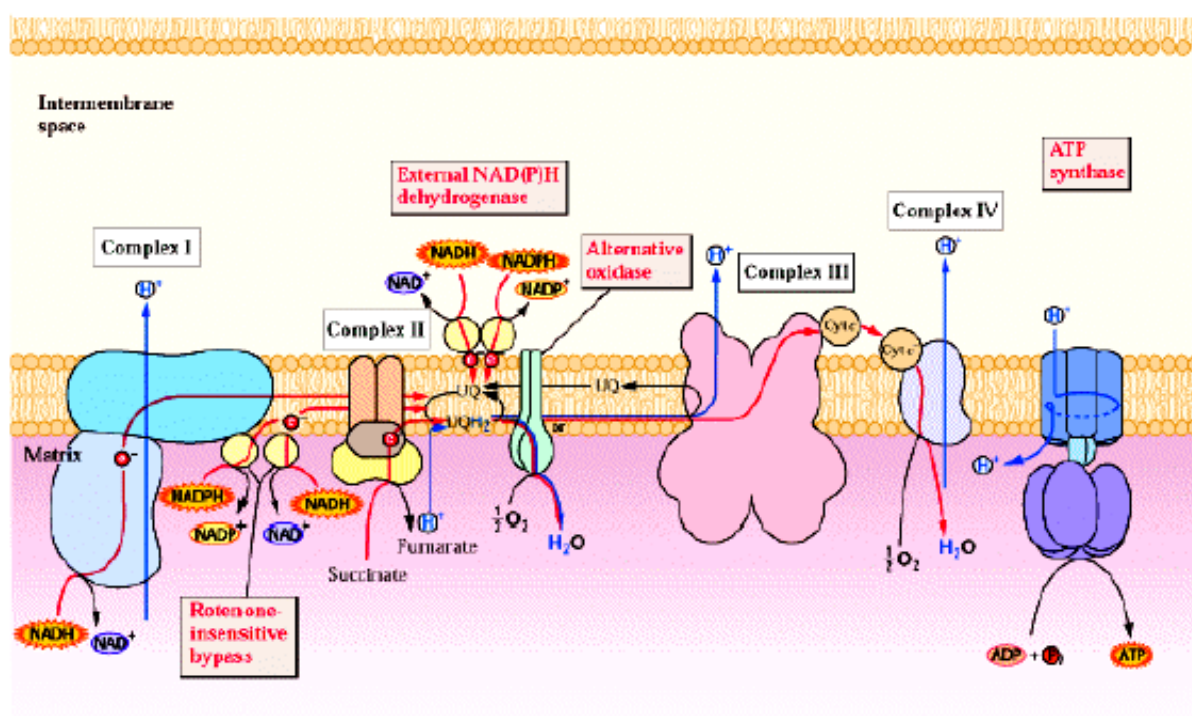


Figure 3 : Chaîne de transfert des électrons de la membrane mitochondriale interne (Buchanan et al., 2000). UQ : ubiquinone.

Le complexe I (NADH: Ubiquinone oxydoréductase), d'un poids moléculaire 900 kDa, est le plus grand des complexes de la chaîne respiratoire. Composé de 30 à 40 sous-unités protéiques, il transfère les électrons du NADH vers l'ubiquinone (coenzyme Q) via un mononucléotide à flavine (FMN). Ce complexe I est inhibé par la roténone et ses analogues au niveau du site de réduction de l'ubiquinone.

Le complexe II (Succinate déshydrogénase) est un composant du cycle de l'acide citrique ; il catalyse l'oxydation du succinate en fumarate (voir Fig. 2). Les électrons résultant de cette oxydation sont transférés sur l'ubiquinone. Le malonate, un analogue du succinate, est un inhibiteur de ce transporteur.

Le complexe III (Ubiquinone-cytochrome c oxydoréductase ou cytochrome c réductase) accepte les électrons de l'ubiquinone et les transfère au cytochrome c. Il possède un cytochrome contenant deux hèmes de type b et un cytochrome c1. L'antimycine A et le myxothiazol sont des inhibiteurs du complexe III.

Le complexe IV (cytochrome c oxydase) transfère les électrons provenant du cytochrome c sur l'oxygène moléculaire pour le réduire en eau. Ce complexe est constitué de deux centres contenant du soufre et deux cytochromes de type a : cyt a et cyt a₃. Le complexe IV est inhibé par le monoxyde de carbone, les azotures et les cyanures.

Le complexe V (ATP synthase) permet la synthèse d'ATP par le retour des protons vers la matrice. Il est composé de deux parties : le domaine F₀ fonctionne comme un canal à protons et le domaine F₁, orienté dans la matrice, catalyse la formation d'ATP. Bien qu'il ne transfère pas d'électrons, le complexe V est parfois considéré comme un composant de la chaîne respiratoire. Ce complexe est inhibé par l'oligomycine B.

En imbibant des graines de petit pois, par une solution contenant Cd, Bansal et Sharma (2000) ont montré une baisse de la capacité de transport des électrons au niveau de la mitochondrie.

2-1-4- Voie de l'oxydase alternative

Une voie alternative comportant une oxydase terminale unique qui transfère directement les électrons de l'ubiquinone à l'oxygène moléculaire (Fig. 3) est présente dans les mitochondries des cellules végétales, de champignons et de certains protozoaires (Vanlerberghe et al., 1995). Cette voie ne génère pas de gradient de protons et elle ne produit pas d'ATP, mais elle a un rôle de régulation. En effet ; elle est activée lorsque la voie des cytochromes est à "saturation" (augmentation des rapports ATP/ADP et NADH/NAD⁺). Normalement, des rapports

ATP/ADP et NADH/NAD⁺ trop élevés entraînent un ralentissement du cycle de l'acide citrique et lorsque la voie alternative est activée, elle permet d'éviter ce ralentissement. Le cycle de l'acide citrique tourne essentiellement pour fournir des précurseurs pour la synthèse de métabolites. Ainsi, la voie alternative et le cycle de l'acide citrique agissent en tandem pour fournir les molécules carbonées nécessaires à la cellule (Mackenzie et McIntosh, 1999). Cependant, la voie la plus fréquente est celle des cytochromes ; principale source de phosphorylations oxydatives assurant la demande cellulaire adéquate en ATP (Heller et al., 1995).

2-2- Fermentation

Une déficience de la teneur en oxygène au cours de la germination, simulée par des expériences de gonflement des graines (Pretorius et al., 1998), induit le métabolisme anaérobie ; essentiellement, la fermentation alcoolique avec une élévation de l'activité ADH (Suzuki et Kyuwa, 1972) et de la teneur en éthanol (Kollöffel, 1970b).

Aussi, la production d'énergie au début de l'imbibition des graines est l'œuvre de la respiration anaérobie, alors que le système rédox mitochondrial n'est prépondérant qu'au cours de la post-germination (Kennedy et al., 1987 ; Vantoai et al., 1987). Cependant, d'autres travaux ont montré que la fermentation est peu génératrice d'ATP durant les stades précoces de la germination (Raymond et al., 1983).

Lors de la fermentation alcoolique, le pyruvate n'accédant pas au cycle de Krebs mitochondrial est d'abord décarboxylé par l'activité pyruvate décarboxylase en acétaldéhyde qui est ensuite réduit en éthanol, en présence du NADH, par l'activité ADH. Cette dernière est inactivée par un inhibiteur de nature protéique ("ADH Inactivator" ; Shimomura et Beevers, 1983a; b) lors du passage de l'anoxie ou de l'hypoxie (Drew, 1997) au métabolisme aérobie.

Chugh et Sawhney (1999) ont montré que Cd inhibe l'activité ADH au cours de la germination des graines de petit pois.

2-3- Voie des pentoses-phosphates

Comme voie secondaire, le cycle des pentoses-phosphates n'est pas utilisé comme source d'ATP, mais surtout comme moyen pour obtenir le pouvoir réducteur (NADPH). Cette voie permet aussi le recyclage des pentoses et des métabolites intermédiaires au profit du métabolisme général (Heller et al., 1995).

La dégradation complète d'une molécule de glucose, en impliquant cette voie (Fig. 4), se déroule en deux étapes ; (i) phase d'oxydation directe et (ii) cycle des pentoses phosphates (régénération de 5 molécules de Glucose-6-P (G6P) à partir de 6 autres de ribulose-5-P).

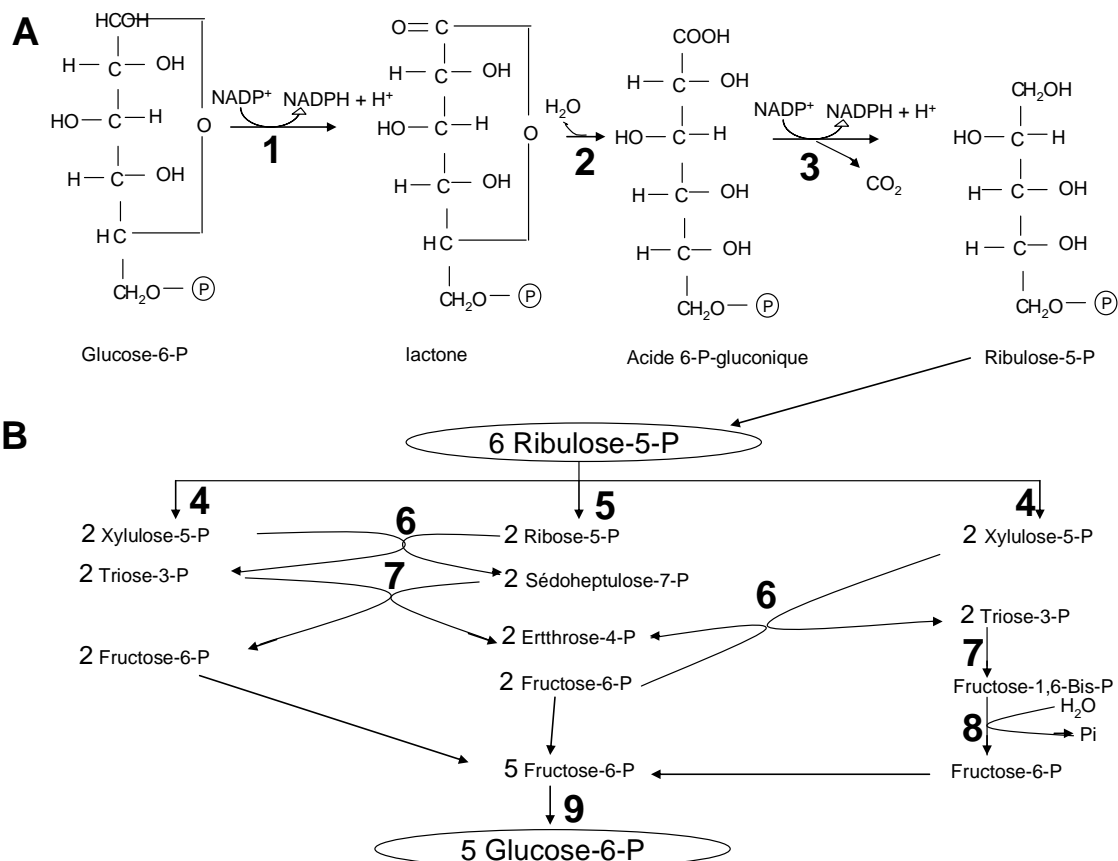


Figure 4 : Voie des pentoses-phosphates: Oxydation directe (A) et cycle des pentoses-phosphates (B). 1, glucose-6-phosphate déshydrogénase ; 2, lactonase ; 3, 6-phosphogluconate déshydrogénase ; 4, phosphopentose épimérase ; 5, phosphopentose isomérase ; 6, transcétolase ; 7, transaldolase ; 8, phosphatase ; 9, glucose-phosphate isomérase.

Lors de l'oxydation, la dégradation de G6P libère CO₂, pentose phosphate (ribulose-5-P) et (NADPH) (Fig. 4). Deux enzymes clés contrôlent cette étape ; G6PDH et 6PGDH (étapes 1 et 3 ; Fig. 4) (Shetty et al., 2002). Toutes les deux sont inhibées par Cd au cours de la germination des graines de petit pois (Chugh et Sawhney, 1999).

2-4- Mobilisation des réserves énergétiques

A partir des lipides de réserve, les acides gras libérés sont utilisés comme source d'énergie, après oxydation dans la matrice mitochondriale, ou comme précurseur de synthèse des phospholipides endomembranaires (Vakharia et al., 1987). Les lipides sont d'abord mobilisés grâce à l'activité lipoxygénase au niveau de la membrane lipidique qui entoure les corps lipidiques (Chateigner et al., 1999), ce qui favorise l'accès des lipases aux triacylglycérols (Fincher, 1989).

Chez le petit pois, les réserves énergétiques utilisées comme substrats respiratoires sont constitués majoritairement de glucides. En plus du saccharose, raffinose, fructanes (Kuo et al., 1988) et polysaccharides des parois cellulaires (Fincher, 1989), l'amidon est la plus abondante réserve glucidique des graines (Robert et Roland, 1989). Formé d'amylose hydrosoluble (α (1-4) D- anhydroglucopyranose) et d'amylopectine (α (1-4) et α (1-6)), il est dépolymérisé par les activités glucosyl-hydrolases (α - et β -amylases et pullulanases) et transglucosylases (Duprat et al., 1980).

L'éventail de métabolites libérés par les hydrolases dépolymérisantes sont véhiculés à partir des tissus de réserve vers les cellules en croissance de l'axe embryonnaire où ils seront utilisés comme substrats énergétiques, monomères de synthèse de macromolécules et groupements prosthétiques, cofacteurs ou activateurs des systèmes enzymatiques. Le transport des métabolites se fait par un "réseau de canaux" aménagé à travers des perforations au niveau des parois cellulaires des tissus de réserve. Il paraît, ainsi, que ceci dépend d'un mécanisme clé ; à savoir les activités hydrolasiques dégradant les parois. En effet ; les niveaux de certaines activités enzymatiques hydrolysant les polysaccharides des parois sont considérablement stimulés au cours de la germination (Fincher, 1989 ; Leubner-Metzger, 2003).

Le processus de la germination profite aussi, d'une autre manière, des hydrolases pariétales. En effet ; les produits de leurs actions, c'est-à-dire oligo- et monosaccharides, peuvent être aussi utilisés comme source d'énergie par l'axe embryonnaire (Nonogaki et Morohashi, 1999).

Dans les graines de petit pois en germination, Cd inhibe considérablement l'activité amylase (Chugh et Sawhney, 1999 ; Bansal et al., 2001). Cet effet ne semble concerner, cependant, que les α -amylases alors que l'activité β -amylase reste insensible au métal (Mihoub et al., 2005). L'inhibition de l'hydrolyse de l'amidon doit aussi avoir des répercussions négatives sur la mobilisation des hydrates de carbone. En effet, Mihoub et al. (2005) ont montré que l'introduction de Cd dans le milieu d'imbibition des graines de petit pois provoque une

restriction significative de la mobilisation du pool des sucres solubles à partir des tissus de réserve.

1- Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est le petit pois (*Pisum sativum* L. var. douce province). Les graines sont fournies par la société Espace Vert-Tunis.

2- Conditions de germination

Les graines sont désinfectées par l'hypochlorite de sodium (2 %) pendant 10 minutes, lavées abondamment avec l'eau distillée puis mises à germer, pendant 5 jours, dans des cristallisoirs sur papier filtre humecté par H₂O ou une solution de Cd (NO₃)₂ 5 mM. Le nombre de graines et le volume des solutions d'imbibition sont identiques pour tous les traitements. La germination est réalisée à l'obscurité en salle climatisée à 25 °C.

3- Récolte

Le taux de germination des graines est déterminé par intervalle de 3 heures jusqu'à l'obtention du maximum de germination du lot témoin (H₂O), considéré comme 100 %.

A chaque récolte, les graines germées sont décortiquées, puis séparées en cotylédons et axes embryonnaires. Une fois lavés dans trois bains d'eau distillée pendant 5 min et séchés entre deux feuilles de papier filtre, puis pesés (Balance de précision Sartorius à 0.1 mg près), les tissus récoltés sont (1) déshydratés dans une étuve à 70 °C pendant au moins 8 jours (détermination de la masse de matière sèche) ou (2) conservés dans l'azote liquide.

Il importe de signaler l'impossibilité d'obtenir des cotylédons et axes embryonnaires séparés à partir des graines sèches, et ce pour les besoins des analyses au temps zéro de la cinétique de germination (état initial avant le début de l'imbibition). Un gonflement préalable de 30 min à 4 °C (Murray et al., 1979 ; Kuo et al., 2004), avant la mise en germination, est nécessaire pour pouvoir éliminer les téguments des graines.

4- Isolement des mitochondries et extraction des protéines

Des fractions cellulaires riches en mitochondries sont obtenues par centrifugation différentielle selon le protocole décrit dans la Figure 5. Cette méthode a permis aussi l'obtention d'extraits protéiques de différentes natures qui, aliquotés et conservés à -80 °C, ont servi aux mesures des activités enzymatiques suivantes :