

**MOEZ SMIRI**

**REPONSES AUX STRESS ET  
REGULATION MOLECULAIRES DES  
PLANTES**

**A LA MEMOIRE DE MON PERE**

## SOMMAIRE

Abréviations.....	1
<u>I- INTRODUCTION.....</u>	<u>4</u>
<u>II- RÉSULTATS ET DISCUSSION.....</u>	<u>22</u>
<b>Chapitre 1- Changements redox induits par Cd dans les mitochondries.....</b>	<b>23</b>
I- <i>Synthèse bibliographique.....</i>	<i>24</i>
1- Rôle des mitochondries dans la reprise de l'activité respiratoire .....	24
2- Protéines mitochondriales de la respiration.....	25
3- Métabolisme redox dans les mitochondries.....	27
II- <i>Résultats et discussion.....</i>	<i>29</i>
1- Effets de Cd sur les teneurs en protéines et en thiols.....	29
2- Effets de Cd sur les composantes du système glutaredoxine.....	30
3- Effets de Cd sur les composantes du système thioredoxine.....	34
<b>Chapitre 2- Effets de Cd sur le comportement des systèmes redox post-mitochondriaux....</b>	<b>40</b>
I- <i>Synthèse bibliographique.....</i>	<i>41</i>
1- Place des protéines redox dans le protéome des compartiments sub-cellulaires.....	41
2- Implication des Grx et Trx dans les activités cellulaires.....	42
3- Réponses des Grx et Trx aux stress biotiques et abiotiques.....	44
II- <i>Résultats et Discussion.....</i>	<i>45</i>
1- Effets de Cd sur la teneur des thiols protéiques.....	45
2- Système Grx .....	46
A. Effets de Cd sur l'expression et l'activité Grx.....	46
B. Effets des ions Cd <sup>2+</sup> sur Grx <i>in vitro</i> .....	46
C. Effets de Cd sur la teneur en GSH et l'activité GR.....	54

3- Système Trx.....	54
A. Effets de Cd sur l'expression et l'activité NTR.....	54
B. Effets de Cd sur l'expression et l'activité Trx.....	57
C. Effets de Cd sur les teneurs en coenzymes.....	60
<b>Chapitre 3- Stress oxydant induit par Cd.....</b>	<b>69</b>
<i>I- Synthèse bibliographique.....</i>	<i>70</i>
1- Sources et marqueurs des oxydations cellulaires.....	70
2- Stress oxydant au cours de la germination.....	72
3- Réponses antioxydantes.....	76
A. Systèmes enzymatiques et non enzymatiques.....	76
B. Sulforéductases.....	78
<i>II. Résultats et discussion.....</i>	<i>80</i>
1- Effets de Cd sur l'activité et l'expression des peroxydases.....	80
A. Guaiacol-peroxydase (GPOX).....	80
B. Glutathion-peroxydase (GPX).....	82
2- Effets de Cd sur les activités NAD(P)H oxydases et l'état redox des coenzymes.....	87
<u>III- CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</u>	<u>94</u>
<u>IV- MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</u>	<u>100</u>
1- <i>Matériel végétal.....</i>	<i>101</i>
2- <i>Conditions de germination.....</i>	<i>101</i>
3- <i>Récolte.....</i>	<i>101</i>
4- <i>Isolement des mitochondries et extraction des protéines.....</i>	<i>102</i>
5- <i>Dosage des thiols- protéiques (-SH).....</i>	<i>104</i>

6- Dosage du glutathion (GSH).....	104
6-1-Extraction des thiols acido-solubles.....	104
6-2- Dosage .....	105
7- Extraction et dosage des coenzymes.....	105
Méthode enzymatique de recyclage « Ethanol-ADH » pour dosage $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ .....	106
Méthode enzymatique de recyclage « G6P-G6PDH » pour dosage $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ .....	107
8- Mesure des activités enzymatiques.....	107
8-1- NTR.....	108
8-2- Trx.....	108
i) Test DTNB.....	108
ii) Test NADP-MDH.....	109
8-3- GR.....	109
8-4- Grx.....	109
8-5- NADPH oxydase.....	110
8-6- NADH oxydase.....	110
8-7- GPOX.....	110
8-8- GPX.....	111
8-9- Effets de Cd sur les activités enzymatiques <i>in vitro</i> .....	111
9- Extraction et dosage des protéines.....	112
9-1- Extraction .....	112
9-2- Dosage .....	112
9-3- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	112
9-4- Coloration des gels de polyacrylamide par le bleu de Coomassie .....	113
9-5- Western blot.....	113

9-5-a- Réaction de transfert.....	113
9-5-b- Réaction avec les anticorps.....	114
9-5-c- Réaction de révélation par bioluminescence sur films autoradiographiques. ....	115
<u>V- RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u> .....	116

**Abréviations**

ADH	alcool déshydrogénase
ADN	acide désoxyribonucléique
AMPS	persulfate d'ammonium
ASC	acide ascorbique
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	adénosine triphosphate
BSA	bovine serum albumine
Cd	cadmium
cm	centimètre
DTNB	5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)
DTT	dithiothréitol
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
FNR	ferrédoxine NADP oxidoréductase
FTR	thiorédoxine réductase ferrédoxine-dépendante
GPOX	guaïacol peroxydase
GPX	glutathion peroxydase
GR	glutathion réductase
Grx	glutarédoxine
GSH	glutathion
G6P	glucose-6-phosphate
G6PDH	glucose-6-phosphate déshydrogénase
h	heure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxyde d'hydrogène

HED	bis(2-hydroxyéthyl) disulfide
HO <sup>•</sup>	radical hydroxyle
kDa	kilodalton
MDH	malate déshydrogénase
ME	milieu d'extraction
MetSO	méthionine sulfoxyde
MF	masse de matière fraîche
mg	milligramme
min	minute
mL	millilitre
mM	millimole par litre
MR	milieu réactionnel
MSR	méthionine sulfoxyde réductase
MTT	3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2H tétrazoliumbromide
NAD(P)	nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)
NADP-MDH	malate déshydrogénase NADP- dépendante
nm	nanomètre
NTR	thiorédoxine réductase NADP- dépendante
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	ion superoxyde
O <sub>2</sub> <sup>2-</sup>	ion peroxyde
OX	oxydé
PES	phenazine éthosulfate
Prx	peroxyrédoxine
Ps	<i>Pisum sativum</i>



réd	réduit
ROS	espèce reactive d'oxygène
SE	erreur standard
Tris	Tris-(hydroxyméthyl) aminométhane
Trx	thiorédoxine
Tween	polyoxyéthylène-sorbitan monolaurate
U	unité d'activité enzymatique
V	volume
WC(G/P)PC	Tryptophane- Cystéine-(Glycine/Proline)-Proline-Cystéine
$\beta$ – MET	$\beta$ - mercaptoéthanol
$\epsilon$	coefficient d'extinction molaire
°C	degré celsius
$\mu$ g	microgramme
$\mu$ L	microlitre
$\mu$ M	micromole par litre

## I- INTRODUCTION

Les pollutions par les métaux lourds deviennent des phénomènes de plus en plus prévalents. La contamination de la chaîne trophique par les métaux lourds est maintenant clairement un facteur de risque pour l'équilibre des écosystèmes, l'agriculture, la production animale et la santé humaine.

On estime qu'il existe 3 millions de sites pollués dans l'Union européenne et le volume de sédiments issus du curage des cours d'eau représenterait entre 100 et 200 millions de mètres cubes chaque année (source <http://www.journaldelenvironnement.net/>). Les problèmes posés par les sites et sols pollués et leurs impacts sanitaires potentiels sont d'autant plus cruciaux que le nombre de friches industrielles ne cesse de croître.

Sur le territoire français uniquement, 751 sites contaminés par Cd ont été recensés en 2007 (source BASOL <http://basol.ecologie.gouv.fr/>). Ces contaminations découlent, dans leur immense majorité, des activités humaines. L'exploitation de divers types de gisements en sous-sol aboutit à l'accumulation de Cd en surface. A ceci s'ajoute la pollution due aux rejets industriels atmosphériques ou solides contenant Cd.

Différentes techniques de décontamination des sols sont disponibles et les plus couramment utilisées relèvent de la physico-chimie. Elles permettent de traiter le sol pollué sur site ou *ex situ* grâce à des techniques faisant intervenir des produits chimiques, comme des chélateurs et des méthodes physiques telles que le pompage ou le chauffage (Paff et Bosilovich 1995; Chandra et al, 2005). Depuis peu, des techniques basées sur l'emploi de microorganismes ou de plantes ont été mises au point pour la dépollution des sols et des eaux. Ces techniques de « bioremédiation » sont moins invasives et moins coûteuses que les techniques physico-chimiques, mais elles impliquent l'identification d'espèces bactériennes ou végétales possédant des capacités particulières (Gadd 1990). En ce qui concerne les plantes, il s'agit de « phytoremédiation ». Pour être utilisées dans ce cadre, les plantes doivent tolérer la présence de contaminants présents

parfois en concentration élevée. De plus, pour certaines applications, elles doivent être capables d'accumuler le polluant dans leurs racines ou dans leurs parties aériennes (Yang et al, 2005).

Les efforts déployés pour dépolluer l'environnement, particulièrement par des procédés de phytoremédiation (phytofiltration et phytoextraction), souffrent de leur très faible rentabilité, même en utilisant des plantes hyperaccumulatrices des métaux lourds. De ce fait, « assumer, subir ou consommer le stress métallique » devient une « fatalité » pour la plante, avec toutes les conséquences liées aux désordres physiologiques et biochimiques qui se produisent à l'intérieur de la plante.

Les activités anthropiques sont la source de nombreux polluants disséminés dans l'environnement. Les éléments traces métalliques, incluant des métaux et des métalloïdes, font partie de ces polluants à risque de préoccupation prioritaire: ce sont des éléments très toxiques et non dégradables. Leur rémanence dans l'environnement implique qu'ils s'accumulent dans les organismes et qu'il est difficile de réduire leur concentration. Les sols ont ainsi été contaminés par des polluants métalliques dont les concentrations n'ont cessé d'augmenter au cours du vingtième siècle (Nriagu et Pacyna 1988) entraînant des effets toxiques chez les êtres vivants et perturbant le bon fonctionnement des écosystèmes.

L'activité industrielle en Tunisie est diversifiée et s'est régulièrement accrue au cours des vingt dernières années. Les activités les plus importantes, du fait de leur taille et de leurs impacts sur l'environnement, sont : l'agro-alimentaire, l'extraction minière, la transformation des phosphates, l'industrie des matériaux de construction, la production d'énergie et l'industrie du textile. D'autres activités de moindres importances telles que le tannage du cuir, les petites industries mécaniques et chimiques .... Ces petites industries qui sont dispersées et de ce fait difficiles à contrôler, sont à l'origine de fortes charges polluantes. Toutefois les données relatives à la

distribution des sites pollués, de la nature du polluant et de sa charge ne sont pas encore disponibles à notre connaissance.

Cette activité se déroule principalement autour des grandes agglomérations urbaines (Tunis, Bizerte et Menzel Bourguiba, Sfax, Gabès, Gafsa et Kasserine) et le long des côtes où est concentré environ 80% de la population. En fait, 13% des unités industrielles sont considérées polluantes (voir carte) (<http://www.environnement.nat.tn>).

Les sols constituent des écosystèmes complexes, supports de nombreux organismes biologiques qui se retrouvent exposés à la pollution. Les microorganismes du sol et les plantes sont les premiers touchés et constituent les premiers maillons de la chaîne alimentaire qui peut à son tour être contaminée. De plus, les sols ne sont pas des ressources renouvelables, ce qui oblige à réutiliser des sites contaminés pour répondre aux besoins croissants de la société humaine.

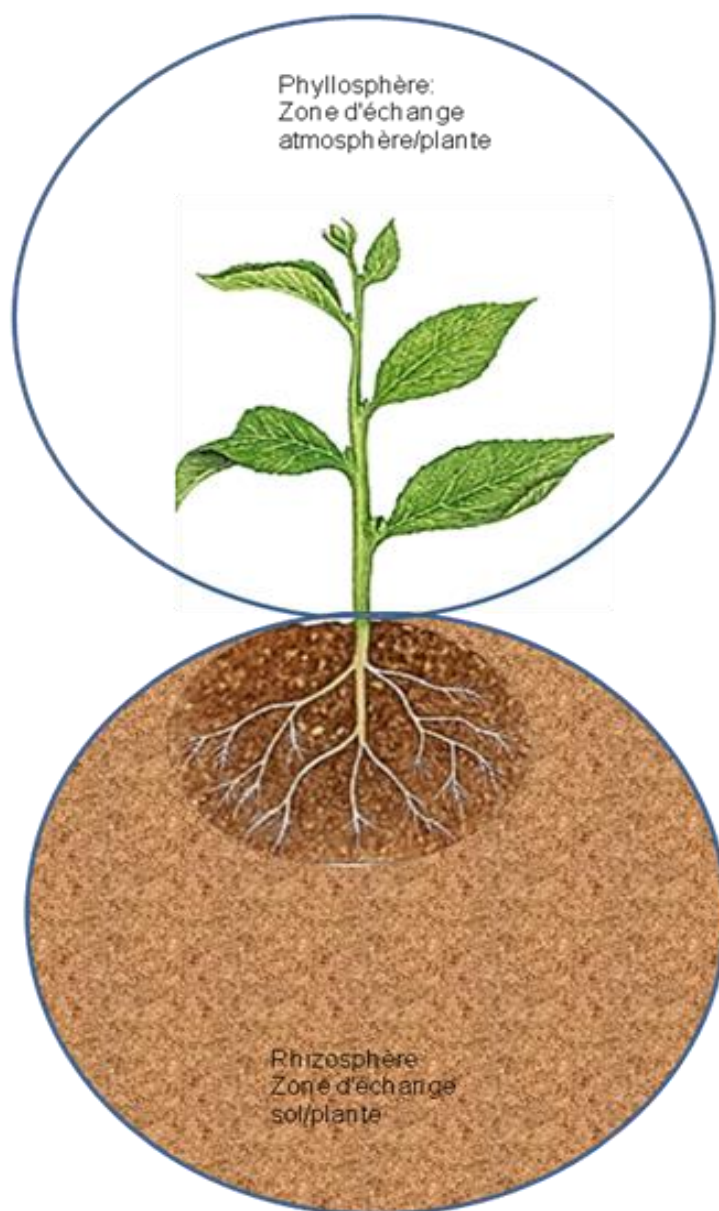


■ LES POLES INDUSTRIELS (Source : <http://www.environnement.nat.tn>)

Le niveau de production d'une plante dépend de son aptitude à surmonter les phases critiques lors de son développement. La phyllosphère est l'ensemble formé par les différentes composantes aériennes de la plante, par la microflore et la faune microscopique présente à la surface des feuilles (Fig. 1). La rhizosphère se situe en périphérie des racines. C'est un lieu d'intense activité biologique et de relations symbiotiques entre la racine et les micro-organismes qui l'entourent.

Le développement du végétal est conditionné par l'intensité des échanges au sein de chacune de ces sphères. L'altération quantitative et qualitative des flux de transfert de matière handicape la croissance de la plante, donc le rendement et la qualité de la récolte. De plus une accumulation

inconsidérée de métaux lourds peut les rendre dangereuses pour la consommation humaine et/ou animale.



**Figure 1.** Les zones clés de la production d'une plante: phyllosphère et rhizosphère (Source: PRP EBV Technologies 2009).

Il existe différentes stratégies de réponse des plantes à l'absorption des métaux (Yang et al, 2008). On distingue quatre groupes de plantes en fonction de leurs teneurs en éléments traces