



HAL
open science

**Recherche de gènes impliqués dans la tolérance au zinc
chez l'espèce modèle hyperaccumulatrice de zinc
Arabidopsis halleri : un nouveau rôle possible pour les
défensines de plantes**

Marie Mirouze

► **To cite this version:**

Marie Mirouze. Recherche de gènes impliqués dans la tolérance au zinc chez l'espèce modèle hyperaccumulatrice de zinc *Arabidopsis halleri* : un nouveau rôle possible pour les défensines de plantes. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Montpellier 2 (Sciences et Techniques), 2005. Français. NNT : . tel-02832953

HAL Id: tel-02832953

<https://hal.inrae.fr/tel-02832953>

Submitted on 7 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

T H E S E

pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Physiologie Végétale
Formation Doctorale : Développement et Adaptation des Plantes
Ecole Doctorale : Biologie Intégrée

présentée et soutenue publiquement par

Marie MIROUZE

le 5 Juillet 2005

**Recherche de gènes impliqués dans la tolérance au zinc
chez l'espèce modèle hyperaccumulatrice de zinc
Arabidopsis halleri :
un nouveau rôle possible pour les défensines de plantes**

JURY

Mme Nathalie VERBRUGGEN, Professeur, Université Libre de Bruxelles	Rapporteur
M. Enrico MARTINOIA, Professeur, Université de Zürich	Rapporteur
M. Bruno CAMMUE, Professeur, Katholieke Universiteit Leuven	Examineur
Mme Laurence MARQUÈS, Maître de Conférences, Montpellier II	Co-directrice de Thèse
M. Michel LEBRUN, Professeur, Université de Montpellier II	Directeur de Thèse

Remerciements

Ce travail de thèse a été financé par une bourse doctorale du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, et encadré par le Professeur Michel Lebrun, directeur de thèse, et Laurence Marquès et Odile Richard, codirectrice et codirectrice de thèse, je les en remercie. Je remercie également Pierre Czernic et Stéphane Mari qui m'ont encadré pour l'enseignement et la recherche au début de ce travail.

Je tiens à remercier tous les membres du jury pour avoir accepté d'examiner ce mémoire. Je remercie également :

- A Leuven, toute l'équipe de Bruno Cammue pour leur accueil chaleureux et tout particulièrement Isabelle François et Jan Sels pour leur collaboration dans les tests immunologiques,
- A Lille, Glenda Willems et Maxime Pauwels pour leur visite guidée du site d'Auby et leur aide lors de la récolte d'*A. halleri*, et Pierre Saumitou-Laprade pour son aimable participation au comité de thèse,
- A Montpellier, Geneviève Conéjéro (Plateforme Imagerie, IFR 127, microscopie confocale et vibratome), pour la formation et l'aide technique qu'elle m'a apportée, et Simone Pourtales (dosages ICP-MS, UMII),
- Au laboratoire, Odile Richard et Stéphanie Loubet pour leur aide dans le phénotypage des plantes et la mise au point des western blots ; et les stagiaires qui ont travaillé sur ce sujet : Laurie Vuillet, Nicolas Arnaud, Amaury Jacquier, Zahia Mammasse et Bertrand Delaunois.

J'ai une pensée amicale pour ceux qui sont passés (ou restés) au sein du Bâtiment 15 : Mado & Hélène, et d'Ouest en Est : Michel, Marc, Bruno, Guilhem, Sandrine, Tim, Pierre, Magali, Monique, Francine, Pascal, Mathilde, Stéphane, Fabrice, Marie, sans oublier l'équipe de choc des salles de TP : Karine, Lydia, Eva, Jeannette, M. Jourdas et mes chères co-thésardes Céline, Delphine, Katia et Marie.

Je remercie tous les étudiants de DEUG et de Licence de l'UMII qui m'ont soutenue, sans le savoir.

Je remercie enfin et très chaleureusement les membres de l'équipe qui m'ont encouragée et qui ont participé à ce travail : Laurence Marquès, Odile Richard, Eric Lacombe, Stéphanie Loubet, Claude Chaliès, et Pierre Berthomieu, et je leur souhaite une belle aventure.

Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AFP	Antifungal protein = Protéine antifongique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
BAC	Bacterial artificial chromosome = Chromosome artificiel de bactérie
BET	Bromure d'éthidium
BSA	Bovine serum albumine = Albumine de sérum de bœuf
CAMV	Cauliflower mosaic virus = Virus de la mosaïque du chou-fleur
CDF	Cation diffusion facilitator
COT1	Cobalt transporteur
CS $\alpha\beta$	Cystein stabilised $\alpha\beta$ motif
dNTP	Didéoxynucléotides tri-phosphate
DO	Densité optique
DTE	Dithio érythréol
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
ELISA :	Enzyme-linked immunosorbent assay
EXAF	Extended X-ray absorption spectroscopy
GFP	Green fluorescent protein
GlcCér	Glucosyl céramide
ICP-MS	Induced-coupled plasma mass spectrometry
IPTG	Isopropyl thio β -Dgalactoside
kb	kilo paire de bases
kD	kilo Dalton
LB	Milieu de culture de Luria Broth
MF	Matière fraîche
M(IP) ₂ C	Mannose-(inositol-phosphate) ₂ céramide
MS	Milieu de culture de Murashige et Skoog
MT	Métallothionéine
MTP	Metal tolerance protein
NAS	Nicotianamine synthase
NRAMP	Natural resistance associated macrophage protein
pb	paire de bases
pI	point isoélectrique
ppm	partie par million
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction = Réaction de polymérisation en chaîne
PDF	Plant Defensin = Défensine de plante
PEG	Polyéthylène glycol
RILs	Recombinant inbred lines
RMN	Résonance magnétique nucléaire
rpm	rotation par minute
RT-PCR	Reverse Transcription PCR = PCR sur un produit de transcription inverse
SSC	Sodium salt citrate
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamide gel electrophoresis
SOD	Superoxyde dismutase
ssp.	Sous-espèce
TAE	Tampon tris acétate EDTA
TPI	Triose-phosphate isomérase
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside
ZIP	ZRT IRT like Protein
ZRE	Zinc responsive element = Séquence promotrice de réponse au zinc

Sommaire

PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION.....	9
CHAPITRE 1 : LE ZINC.....	11
A. La dualité du zinc : un métal essentiel mais toxique	11
B. Mécanismes moléculaires impliqués dans l'homéostasie du zinc chez les plantes.....	14
CHAPITRE 2 : LA TOLERANCE AUX METAUX, UNE REPONSE ADAPTATIVE DES PLANTES	
A LA POLLUTION PAR LES METAUX LOURDS	18
A. Origine de la pollution par les métaux lourds.....	18
B. Les sites pollués.....	19
C. Un exemple de stratégie d'adaptation des plantes sur les sols pollués : la tolérance aux métaux	20
CHAPITRE 3 : LES PLANTES HYPERACCUMULATRICES, UN CAS PARTICULIER DE TOLERANCE AUX METAUX	
A. Qu'est-ce que l'hyperaccumulation de métaux chez les plantes ?.....	21
B. Arabidopsis halleri : un modèle d'étude pour les mécanismes de la tolérance aux métaux et de l'homéostasie du zinc	23
C. Bases moléculaires de l'hyperaccumulation de zinc.....	26
CHAPITRE 4 : QUELLES APPROCHES POUR ETUDIER LES MECANISMES MOLECULAIRES	
DE LA TOLERANCE AU ZINC CHEZ LES PLANTES ?	29
A. Utilisation des ressources génétiques chez A. thaliana	29
B. Utilisation des plantes hyperaccumulatrices.....	29
C. Approche choisie pour le travail de thèse.....	30
CHAPITRE 5 : LES DEFENSINES DE PLANTES	32
A. Les défensines appartiennent à la grande famille des peptides antimicrobiens.....	32
B. Les PDF ont d'abord été caractérisées chez le radis.....	32
C. Caractéristiques structurales des PDF	36
D. Localisation de l'expression des gènes chez A. thaliana.....	37
E. L'expression tissulaire des PDF est en accord avec leur rôle antifongique	39
F. Expression de défensine en hétérologue in planta.....	39
G. Le mode d'action antifongique des PDF implique l'interaction avec des phospholipides membranaires conduisant à une perméabilisation de la membrane.....	40
H. Quel rôle pour les PDF dans les stress abiotiques ?	43
DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES.....	45
CHAPITRE 1 : MATERIEL VEGETAL ET CONDITIONS DE CULTURE	46
A. Origine du matériel végétal.....	46
B. Conditions de culture des plantes.....	46
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET MILIEUX MICROBIOLOGIQUES	48
A. Souches bactériennes.....	48
B. Milieux de culture bactériens	48

C. Souches de levures	48
D. Milieux de culture de levure.....	49
CHAPITRE 3 : TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	50
A. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	50
B. Séparation des acides nucléiques par électrophorèse.....	50
C. Extraction d'un fragment d'ADN à partir d'un gel d'agarose.....	51
D. Digestion par les enzymes de restriction	51
E. Ligations	51
F. Préparation de bactéries électrocompétentes	51
G. Transformation des bactéries par électroporation	52
H. Minipréparation d'ADN plasmidique	52
CHAPITRE 4 : CLONAGES.....	53
A. Construction de la banque d'ADNc.....	53
B. Constructions AhPDF1.1mature et MF-AhPDF1.1	55
C. Construction de la cassette p35S::AhPDF1.1::t35S.....	57
CHAPITRE 5 : MANIPULATIONS DES LEVURES	60
A. Transformation des levures	60
B. Extraction d'ADN plasmidique de levure.....	61
C. Test en gouttes de la croissance des levures	61
D. Minéralisation des levures pour le dosage du zinc	61
CHAPITRE 6 : OBTENTION ET ETUDE DES PLANTES TRANSGENIQUES.....	63
A. Transformation des agrobactéries	63
B. Transformation des plantes	63
C. Obtention de lignées homozygotes mono-insertionnelles.....	64
D. Pesée de la matière sèche	64
CHAPITRE 7 : DOSAGE DES METAUX	65
A. Dosage du zinc dans les plantes par le Zincon®.....	65
B. Dosage des métaux dans les plantes par spectrophotométrie de flamme.....	65
C. Dosage du zinc dans la levure par ICP-MS.....	66
CHAPITRE 8 : ANALYSE DE L'EXPRESSION DES DEFENSINES	67
A. Analyse de l'accumulation des transcrits de défensines.....	67
B. Immunodétection des défensines	68
CHAPITRE 9 : OUTILS D'ANALYSE BIOINFORMATIQUE.....	74

TROISIEME PARTIE : RESULTATS.....	75
CHAPITRE 1 : RECHERCHE D'ADNC D'ARABIDOPSIS HALLERI CONFERANT UNE TOLERANCE AU ZINC	
A LA LEVURE.....	77
<i>A. Étapes préliminaires au criblage sur zinc de la banque d'expression d'A. halleri.....</i>	<i>79</i>
<i>B. Identification des ADNC conférant à la levure une tolérance au zinc.....</i>	<i>83</i>
<i>C. Phénotype des levures transformées par des ADNC de défensines sur zinc.....</i>	<i>91</i>
<i>D. Vers la compréhension du mode d'action des PDF dans la tolérance au zinc.....</i>	<i>95</i>
<i>F. Immunolocalisation des défensines d'A. halleri dans la levure.....</i>	<i>103</i>
<i>Conclusions du premier chapitre des résultats.....</i>	<i>104</i>
CHAPITRE 2 : CARACTERISATION DU ROLE D'UNE DEFENSINE D'A. HALLERI	
DANS LA TOLERANCE AUX METAUX IN PLANTA.....	115
<i>A. Caractérisation des lignées transgéniques 35S::AhPDF1.1 d'A. thaliana.....</i>	<i>117</i>
<i>B. Phénotype des plantes transgéniques 35S::AhPDF1.1 vis-à-vis du zinc.....</i>	<i>120</i>
<i>C. La tolérance des plantes produisant AhPDF1.1 se limite-t-elle au zinc ?.....</i>	<i>129</i>
<i>Conclusions du second chapitre des résultats.....</i>	<i>132</i>
CHAPITRE 3 : ÉTUDE DE L'EXPRESSION DES DEFENSINES CHEZ L'ESPECE TOLERANTE ET	
HYPERACCUMULATRICE DE ZINC ARABIDOPSIS HALLERI.....	138
<i>A. Vers l'identification des membres de la famille des défensines chez A. halleri.....</i>	<i>138</i>
<i>B. Localisation de l'expression des défensines chez A. halleri.....</i>	<i>142</i>
<i>C. L'expression des défensines chez A. halleri répond-elle à un traitement par le zinc ?.....</i>	<i>148</i>
<i>Conclusions du troisième chapitre des résultats.....</i>	<i>156</i>
QUATRIEME PARTIE : CONCLUSION.....	165
CINQUIEME PARTIE : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	170
ANNEXES.....	181

Liste des figures

PREMIÈRE PARTIE

Figure I.1. Comparaison des phénotypes sur zinc chez *A. thaliana* et *A. halleri*.

Figure I.2. Effet de la présence d'une défensine sur la croissance et la morphologie d'hyphes mycéliennes.

Figure I.3. Alignement des séquences protéiques des défensines d'*A. thaliana* des familles PDF1 et PDF2.

Figure I.4. Structure tridimensionnelle de la défensine de radis RsAFP2.

Figure I.5. Données d'expression des gènes de défensines dans les différents organes chez *A. thaliana*.

Figure I.6. Modèle d'action antifongique de deux défensines de plantes.

DEUXIÈME PARTIE

Figure II.1. Carte du plasmide pYX212 multicopie utilisé pour la construction de la banque d'ADNc.

Figure II.2. Représentation schématique de la stratégie de clonage de la séquence *AhPDF1.1* mature et *AhPDF1.1* MF dans le plasmide pXY212.

Figure II.3. Carte du plasmide pJIT62 permettant la construction de la cassette pCaMV35S::AhPDF1.1::tCaMV35S.

Figure II.4. Carte du plasmide binaire pGreen0029 permettant le clonage de la construction pCaMV35S::AhPDF1.1::tCaMV35S.

Tableau II.1. Compositions des solutions utilisées pour les analyses de protéines.

TROISIÈME PARTIE

Figure III.1. Dosage de la teneur en zinc dans les parties aériennes d'*A. lyrata* et *A. halleri* cultivées sur terreau ou sur terre contaminée en zinc.

Figure III.2. Estimation de la taille des premiers et seconds brins d'ADNc synthétisés lors de la construction de la banque de feuilles d'*A. halleri*.

Figure III.3. Phénotype de résistance au zinc de la souche de levure BY4741his⁺ transformée par le plasmide pYX212.

Figure III.4. Confirmation du phénotype de tolérance au zinc de levures transformées par un ADNc issu du criblage sur zinc de la banque d'*A. halleri*.

Tableau III.1. Caractéristiques des ADNc isolés suite au criblage sur zinc de la banque d'ADNc d'*A. halleri* dans la levure et des protéines déduites de ces ADNc.

Figure III.5. Alignement des séquences nucléotidiques et protéiques des 4 ADNc de défensines d'*A. halleri* isolés lors du criblage de la banque d'ADNc d'*A. halleri*.

Figure III.6. Alignement des séquences protéiques déduites des 5 ADNc de défensines d'*A. halleri* isolés lors du criblage de la banque d'ADNc d'*A. halleri*.

Figure III.7. Séquences protéiques de défensines de plantes (PDF).

Figure III.8. Phénotype de tolérance au zinc des levures transformées par les ADNc *AhPDF1.1*, *AhPDF1.2*, *AhPDF1.3*, *AhPDF1.4* ou *AhPDFL*.

Figure III.9. Phénotype de tolérance au zinc des levures transformées par un ADNc d'*A. halleri* (*AhPDF1.1*) ou d'*A. thaliana* (*AtPDF1.2c*).

Figure III.10. Dosage du zinc dans la levure transformée par l'ADNc *AhPDF1.1*.

Figure III.11. Phénotype de tolérance au zinc des levures transformées par l'ADNc *AhPDF1.1*, *AhPDF1.1* mature, ou MF-*AhPDF1.1* d'*A. halleri*.

Figure III.12. Phénotype de tolérance au zinc des levures mutantes $\Delta zrc1$ transformées par un ADNc d'*A. halleri* (*AhPDF1.1*).

Figure III.13. Phénotype de sensibilité au cadmium des levures transformées par les ADNc *AhPDF1.1*, *AhPDF1.2*, *AhPDF1.3* ou *AhPDF1.4*.

Figure III.14. Test de croissance des levures transformées par l'ADNc *AhPDF1.1*, *AhPDF1.1 mature*, ou MF-*AhPDF1.1* sur des fortes concentrations de nickel.

Figure III.15. Immunolocalisation de la défensine *AhPDF1.1* dans les levures transformées par le plasmide pYX212 *AhPDF1.1*.

Figure III.16. Mécanismes impliqués dans l'homéostasie du zinc dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Tableau III.2. Tableau récapitulatif des phénotypes de tolérance ou sensibilité métallique conférés par les différents ADNc ou constructions de PDF dans la levure *S. cerevisiae*.

Tableau III.3. Analyse de ségrégation du caractère de résistance à la kanamycine pour les lignées transgéniques transformées par le vecteur pGreen0029 contenant *AhPDF1.1*.

Figure III.17. Détection des messagers hybridant avec la sonde *AhPDF1.1* chez *A. thaliana* Col-0 et chez 3 lignées transgéniques 35S::*AhPDF1.1*.

Figure III.18. Immunodétection de défensines dans les parties aériennes des lignées transgéniques ou de plantes témoins.

Figure III.19. Phénotype de tolérance au zinc des plantes transgéniques 35S::*AhPDF1.1* de la lignée 1C.

Figure III.20. Phénotype de tolérance au zinc des plantes transgéniques 35S::*AhPDF1.1*.

Figure III.21. Analyse du contenu en zinc des parties aériennes de plantes transgéniques 35S::*AhPDF1.1* de la lignée 1C en fonction de la concentration en zinc du milieu.

Figure III.22. Phénotype des plantes transgéniques 35S::*AhPDF1.1* de la lignée 1C cultivées *in vitro* sur des milieux enrichis en différents métaux lourds.

Figure III.23. Phénotype de tolérance au nickel des plantes transgéniques 35S::*AhPDF1.1* de la lignée 1C.

Figure III.24. Identification des clones BAC issus de la banque d'*A. halleri* hybridant avec la sonde *AhPDF1.1*.

Figure III.25. Accumulation des messagers hybridant avec la sonde *AhPDF1.1* dans les parties aériennes et les racines chez *A. halleri*.

Figure III.26. Identification de différentes formes de défensines dans les parties aériennes d'*A. halleri* et *A. thaliana*.

Figure III.27. Immunolocalisation réalisée sur des coupes de feuilles, des trichomes et anthères et d'*A. halleri*.

Figure III.28. Effet d'un traitement par le zinc sur l'accumulation de messagers de défensines dans les parties aériennes chez *A. halleri*.

Figure III.29. Effet d'un traitement par le zinc sur la teneur en zinc et sur l'accumulation de messagers *AhPDF1.1*, *AhPDF1.2*, *AhPDF1.3* et *AhPDF1.4* dans les parties aériennes d'*A. halleri*.

Figure III.30. Cinétique d'accumulation des messagers *AhPDF1.1* dans les parties aériennes d'*A. halleri* en réponse à un traitement par le zinc.

Figure III.31. Accumulation de défensines dans les parties aériennes d'*A. halleri* et *A. thaliana* en réponse à un traitement par le zinc.

Tableau III.4. Facteur d'accumulation des défensines chez *A. halleri*.

Première Partie

Introduction

Avant-propos

Dans cette introduction au travail de thèse, nous proposons de présenter les aspects liés à l'homéostasie du zinc et le cas particulier des plantes hyperaccumulatrices. L'étude de la tolérance au zinc chez *Arabidopsis halleri* nous ayant amené à nous intéresser aux défensines de plantes, nous donnerons ensuite brièvement l'état des connaissances actuelles relatives aux défensines de plantes.

Chapitre 1

Le zinc

A. La dualité du zinc : un métal essentiel mais toxique

A. 1. Le zinc : définition

Un métal est défini comme un corps simple caractérisé par un éclat particulier dit éclat métallique, une aptitude à la déformation et une bonne capacité à conduire la chaleur et l'électricité. Les métaux sont dits lourds lorsque leur densité est supérieure à 5. Ils sont présents dans tous les compartiments écologiques de la biosphère : terre, air, eau. Cependant leur concentration étant généralement inférieure à 1‰ (1 g.kg⁻¹) en matière sèche dans la croûte terrestre, et à 0,1‰ (100 mg.kg⁻¹) dans la matière sèche des organismes, les métaux lourds sont également appelés éléments traces métalliques (ETM). Le zinc est un métal de densité égale à 7,14 : il est donc qualifié de métal lourd.

A.2. Problèmes de santé liés au zinc

Le zinc est indispensable aux êtres vivants. Chez l'homme, il est le deuxième métal en abondance, après le fer. Les problèmes nutritionnels liés au zinc sont dus principalement à des carences. Les carences sévères sont rares, en revanche les carences modérées sont courantes dans les populations des pays en voie de développement et concerneraient 23% de la population mondiale. Ces carences sont liées à la malnutrition, et affectent essentiellement les femmes et les enfants. Elles seraient responsables de retards dans le développement et de diminutions des réponses immunitaires. On estime

à 800.000 le nombre de décès liés chaque année dans le monde aux maladies infectieuses dues à la carence en zinc (Walker and Black, 2004).

Les effets bénéfiques de l'apport complémentaire de zinc ont été montrés dans le traitement de cas de diarrhées, de pneumonie et de malaria. Cependant, à long terme, la réduction du taux de mortalité lié à la carence en zinc passe non seulement par l'amélioration générale de la nutrition des populations des pays en voie de développement mais également par l'amélioration de la biodisponibilité du zinc dans les aliments (Zimmermann and Hurrell, 2002). En effet, les graines de céréales, qui constituent une source majeure pour l'alimentation, contiennent des phytates qui diminuent la biodisponibilité du zinc. Les recherches en amélioration des plantes ont montré la possibilité de diminuer la quantité de phytates dans les graines, que ce soit par sélection de mutants pauvres en phytates ou par transgénèse en exprimant des phytases dans l'endosperme. Ainsi il a été montré que l'absorption du zinc était supérieure de 78% à partir de maïs sélectionnés pour leur faible contenu en phytates, par rapport à du maïs normal (Adams *et al.*, 2002).

La recherche médicale liée au zinc concerne également des maladies dégénératives. En effet, des perturbations dans l'homéostasie du zinc pourraient être impliquées dans la maladie d'Alzheimer et dans l'encéphalopathie spongiforme. Le prion, par exemple, pourrait jouer un rôle, dans le transport ou le « sensing » du zinc (Watt and Hooper, 2003). Ces recherches pourraient conduire à la compréhension des mécanismes de l'homéostasie du zinc dans la cellule, un sujet qui reste mal connu.

A.3. Rôles essentiels du zinc dans la cellule

Le zinc est un élément essentiel pour les être vivants car il joue un rôle majeur dans le métabolisme cellulaire. On estime, par exemple, que 12 à 50% du zinc intracellulaire est impliqué dans la machinerie de transcription et de traduction (Finney and O'Halloran, 2003). Son rôle intervient à deux niveaux différents : catalytique et structural (O'Dell, 1992). Tout d'abord au niveau catalytique, il est le cofacteur de plus de 300 enzymes (Guerinot and Eide, 1999) dont la SOD (Super Oxyde Dismutase), l'ARN polymérase, la phosphatase alcaline et l'alcool déshydrogénase. De plus, au niveau structural, il assure la stabilisation de la conformation spatiale de nombreux

facteurs de transcription en participant à des structures, telles que les doigts de zinc, qui permettent la liaison à l'ADN (Berg, 1990; Berg and Shi, 1996). Dans ces domaines protéiques, le zinc est généralement tétra-coordonné, établissant des liaisons avec des groupements soufrés (tels les groupements thiols des cystéines) ou azotés (asparagine). La fonction structurale du zinc dans les facteurs de transcription est due à une caractéristique essentielle de ce métal : contrairement au fer et au cuivre, le zinc n'a qu'un seul état redox (Zn^{2+}) et n'intervient donc pas dans des réactions redox. Ceci lui permet de « s'approcher » de l'ADN sans risque de créer de stress oxydatif.

Le zinc libre se présentant sous forme de cation Zn^{2+} hydrophile, il ne peut traverser les membranes par simple diffusion passive. Au niveau cellulaire, un transport transmembranaire du zinc est donc nécessaire. Or le zinc représente en quantité le deuxième métal lourd présent dans la cellule après le fer, la cellule concentre donc généralement le zinc par rapport au milieu extérieur, à des concentrations de 0,1 mM chez *Escherichia coli* par exemple (Finney and O'Halloran, 2003). Paradoxalement, la concentration de zinc sous forme de métal libre étant de l'ordre du femtomolaire dans la cellule, on peut considérer qu'il n'y a pas de zinc libre dans la cellule (Outten and O'Halloran, 2001). Le cytoplasme possède donc une forte capacité de chélation du métal.

A.4. Effets toxiques liés au zinc

Bien qu'essentiel au métabolisme cellulaire, le zinc peut avoir des effets toxiques aux fortes concentrations. Contrairement aux autres métaux comme le fer ou le cuivre, l'excès de zinc ne génère pas de stress oxydatif. En revanche, il est susceptible de réagir avec les groupements -S, -O et -N (Berg and Shi, 1996) et de modifier la conformation spatiale de molécules biologiques. De plus le zinc en excès peut entrer en compétition avec d'autres cations métalliques. Il est donc nécessaire pour la cellule de mettre en place des mécanismes efficaces afin de pouvoir détoxifier l'excès de zinc. Le maintien de l'homéostasie du zinc requiert des senseurs de zinc, des transporteurs transmembranaires mais également des métallochaperonnes, protéines chélatrices de zinc et capables d'assurer le trafic du zinc dans la cellule jusqu'aux protéines à zinc.

Chez les plantes, seuls certains transporteurs et chélateurs de zinc sont documentés pour l'instant.

B. Mécanismes moléculaires impliqués dans l'homéostasie du zinc chez les plantes

B.1. Transporteurs de zinc impliqués dans l'absorption du zinc

Chez les plantes, la teneur en zinc varie entre 1 et 400 mg par gramme de matière sèche (Marschner, 1995). Le zinc est absorbé grâce à des transporteurs d'influx de zinc appartenant à la famille des ZIP (pour Zinc-regulated transporter Iron-regulated transporter-like Proteins, Fox and Guerinot, 1998). Cette famille est composée de protéines à 8 domaines transmembranaires, comportant une région variable cytoplasmique riche en résidus histidine (Guerinot, 2000). Parmi les IRT (Iron Regulated Transporter), on distingue IRT1 (Eide *et al.*, 1996) qui a une affinité pour le zinc (Korshunova *et al.*, 1999) et IRT2 également susceptible de transporter le zinc (Vert *et al.*, 2001). Les transporteurs ZIP1-4 pour leur part, semblent montrer une affinité pour le zinc et le cadmium. Les gènes *ZIP1*, *ZIP2* et *ZIP3* d'*A. thaliana* ont été clonés par complémentation d'un mutant de *Saccharomyces cerevisiae* déficient dans le transport à haute et basse affinité du zinc (Grotz *et al.*, 1998; Guerinot and Eide, 1999). Il a été montré que les transcrits *ZIP1* et *ZIP3* s'accumulent dans les racines lors d'une carence en zinc (Grotz *et al.*, 1998). Les messagers du gène *ZIP4*, cloné par homologie de séquence, sont également accumulés dans les racines et les feuilles de plantes carencées en zinc (Grotz *et al.*, 1998).

B.2. Transporteurs de zinc impliqués dans la compartimentation extracytosolique du zinc

Les transporteurs d'efflux de zinc appartiennent à la famille des CDF (Cation Diffusion Facilitator), également appelée CE (Cation Effusion, Mäser *et al.*, 2001).

Cette famille est composée de protéines à 6 domaines transmembranaires comportant une région riche en histidine, semblable à celle des ZIP, et qui pourrait être impliquée dans la liaison au métal (Mäser *et al.*, 2001). Ces transporteurs permettraient l'efflux de cations, principalement le zinc et le cadmium. Ils ont d'abord été caractérisés chez les mammifères qui en comptent quatre appelés ZnT1 à 4 (Palmiter and Findley, 1995; Palmiter *et al.*, 1996a; Palmiter *et al.*, 1996b; Huang and Gitschier, 1997; Wenzel *et al.*, 1997). Un seul transporteur de cette famille, appelé AtMTP1 (ancien ZAT, Zn transporter of *Arabidopsis thaliana*), a été caractérisé chez *A. thaliana* (van der Zaal *et al.*, 1999). Ce transporteur est vacuolaire chez *A. thaliana* (Kobae *et al.*, 2004), et il complète un mutant de levure *Schizosaccharomyces pombe* sensible au zinc (Bloss *et al.*, 2002). De plus, Blaudez *et al.* (2004) ont montré qu'un transporteur CDF (PdtMTP1 pour Metal Tolerance Protein) de Peuplier restaurait également la croissance d'une souche de levure sensible au zinc, et conférait une tolérance au zinc par expression chez *A. thaliana*. La localisation tonoplastique de ce transporteur suggère un rôle dans l'efflux de zinc vers la vacuole, détoxiquant ainsi le cytoplasme.

Dans la famille des ATPases de type P_{IB}, 8 membres transporteurs de métaux divalents (appelés AtHMA1 à 8) ont été identifiés chez *A. thaliana*, parmi lesquels trois seraient susceptibles de transporter le zinc (AtHMA2, 3 et 4) (Hussain *et al.*, 2004). Une telle diversité dans les ATPases de type P_{IB} semble être une particularité des plantes, parmi les eucaryotes, ce qui les rend d'autant plus intéressants. Il a été montré que AtHMA2 et AtHMA4 fonctionnent effectivement comme des pompes à zinc, détoxiquant le cytoplasme (Eren and Arguello, 2004; Mills *et al.*, 2005).

B.3. Chélation du zinc dans la cellule

Si l'absorption du zinc est assez bien décrite dans les plantes, peu de données sont en revanche disponibles concernant son stockage dans les cellules. Or, un mécanisme récurrent de détoxification des métaux lourds au sein de la cellule (aussi bien chez les plantes que dans d'autres organismes) repose sur la fixation du métal à un ligand (chélation) puis éventuellement à la neutralisation de ce complexe par compartimentation (séquestration) grâce à un transporteur spécifique (Briat and Lebrun, 1999). Quatre types de ligands de cations métalliques sont connus chez les plantes : les

métallothionéines, les phytochélatines, et les acides aminés et organiques (Rauser, 1999; Clemens, 2001b).

Les métallothionéines sont des protéines de petite taille (4-6 kD), comportant des séquences conservées riches en cystéines et qui chélatent les métaux, en particulier le cuivre et le zinc (Vasak and Hasler, 2000). Elles sont réparties en 4 classes suivant l'organisation de leurs motifs cystéines : CXC, CXXC et CC.

Chez les mammifères, les métallothionéines sont impliquées dans la détoxification et le transport du zinc (Jacob *et al.*, 1998). Elles jouent un rôle de chaperonnes, chélatant puis redistribuant les ions Zn^{2+} aux métalloprotéines (Jacob *et al.*, 1998; Costello *et al.*, 2004). Par leur pouvoir de chélation (7 atomes de Zn^{2+} pour une molécule de métallothionéine, Vasak and Hasler, 2000), elles peuvent également protéger les organismes contre l'effet toxique du zinc (Kelly *et al.*, 1996; Palmiter, 2004).

Chez les plantes, la grande diversité trouvée chez les métallothionéines suggère une diversité de fonctions (Cobbett and Goldsbrough, 2002). Cependant, aucune étude n'a clairement établi de rôle des métallothionéines dans la tolérance générale aux métaux. Ceci peut s'expliquer par la difficulté de purifier les métallothionéines qui apparaissent sensibles à l'oxydation et donc instables. À ce jour seules des métallothionéines de blé et d'*A. thaliana* (Murphy *et al.*, 1997) ont été purifiées. Les études concernant les métallothionéines chez les plantes reposent donc essentiellement sur des données d'expression. L'expression des métallothionéines est notamment forte dans la graine, où elles pourraient jouer un rôle dans le stockage du zinc (Kawashima *et al.*, 1992). L'expression de certaines métallothionéines peut être induite par un stress métallique comme le cuivre dans des plantules d'*A. thaliana* (Zhou and Goldsbrough, 1995) ou le zinc dans les racines de peuplier (Kohler *et al.*, 2004). Mais l'induction de l'expression des métallothionéines est liée à bien d'autres stress que les stress directement métalliques, comme la sénescence ou la réponse hypersensible (Cobbett and Goldsbrough, 2002).

Bien que les phytochélatines (peptides dérivés du glutathion et riches en cystéines) jouent un rôle majeur dans la détoxification du cadmium (Cobbett, 2000; Cobbett and Goldsbrough, 2002), il n'a pas été montré à ce jour qu'elles interviennent dans la détoxification du zinc.

Enfin, les acides aminés et organiques peuvent jouer un rôle de chélateurs de zinc chez les plantes, comme nous le détaillerons dans le chapitre 3.

Chapitre 2

La tolérance aux métaux, une réponse adaptative des plantes à la pollution par les métaux lourds

A. Origine de la pollution par les métaux lourds

Les métaux lourds sont présents dans les roches sous formes de minerais, d'où ils peuvent être mobilisés par des phénomènes naturels comme l'érosion ou les éruptions volcaniques, mais également par des activités anthropiques. Ces dernières sont dues pour une part aux rejets physiques liés aux activités métallurgiques et minières et aux rejets de produits en fin de vie tels que les piles et batteries. D'autre part, les émissions atmosphériques constituent une source importante de pollution par les métaux lourds.

Contrairement au plomb, dont l'émission atmosphérique, liée à la pollution automobile, a diminué de 90% en dix ans grâce à l'interdiction du plomb dans l'essence, les émissions atmosphériques de zinc n'ont pas évolué en France depuis 1990. Ces émissions de zinc sont dues pour 97% à l'industrie (sidérurgie et incinération des déchets), et représentent en 2002 les trois-quarts des émissions atmosphériques de métaux lourds (Miquel, 2001). Aux retombées atmosphériques résultant de ces émissions, s'ajoutent les apports de zinc liés aux déchets agricoles (présence de zinc dans le lisier, due à la supplémentation de zinc dans l'alimentation du bétail), aux déchets urbains (boues de stations d'épuration) ou aux déchets liés au transport routier (présence de zinc dans les pneus).

Ces pollutions par le zinc présentent un potentiel toxique important tant pour les plantes qui y sont directement exposées, que pour l'Homme *via* l'entrée dans la chaîne alimentaire par la production agricole.

B. Les sites pollués

B.1. Définition des sites pollués

Un site pollué est défini comme un site qui, du fait d'anciens dépôts de déchets ou d'infiltrations de substances polluantes, présente une pollution susceptible de provoquer une nuisance ou un risque pérenne pour les personnes ou pour l'environnement. En 1998, 1.400.000 sites contaminés par les métaux lourds ont été répertoriés en Europe (European Topic Centre Soil). En France, quelque 3.000 sites pollués ont été répertoriés en l'an 2000 (BASOL, <http://basol.environnement.gouv.fr>). La répartition de ces sites n'est pas uniforme sur le territoire français, et la région Nord-Pas-de-Calais est celle qui comptabilise le plus grand nombre de sites pollués (plus de 400), la région Languedoc-Roussillon étant relativement épargnée (50 sites) (Miquel, 2001). Pour ce qui est des sites pollués par des métaux lourds, la pollution par le zinc, qui concerne près de 400 de ces 3000 sites, arrive en seconde position après celle due au plomb (Miquel, 2001).

B.2. Exemple du site d'Auby (Nord-Pas-de-Calais)

Le site dit du Bois des Asturies à Auby (Nord-Pas-de-Calais) présente un gradient majeur de concentrations en métaux lourds (Zn, Pb) dans le sol depuis une zone dite peu polluée (3.000 ppm de Zn) vers une zone dite très polluée (33.000 ppm de Zn), le seuil de contamination admis par la norme française étant de 300 ppm de zinc (teneur maximale tolérée pour l'épandage des boues, norme NFU44 041, citée par Bert *et al.*, 2002). C'est sur ce site que nous avons prélevé le matériel végétal (*Arabidopsis halleri*) utilisé dans la thèse.

C. Un exemple de stratégie d'adaptation des plantes sur les sols pollués : la tolérance aux métaux

La tolérance au zinc est définie comme la capacité d'une plante à se développer sur un sol présentant une toxicité, alors que la majorité des espèces végétales ne peuvent pas s'y développer. Cette définition est cependant contestée du fait de son caractère relatif (Hall, 2002). On distingue les espèces métalphytes (poussant sur un sol contaminé) des espèces non métalphytes (poussant sur un sol non contaminé).

Dans le règne végétal, plusieurs stratégies sont observées pour faire face à un sol contaminé en métaux lourds (Briat and Lebrun, 1999). La plupart des espèces végétales sont qualifiées « d'excluders », c'est-à-dire qu'elles limitent le passage des métaux, que ce soit au niveau de l'interface sol/racine ou au niveau du transfert racines/parties aériennes. Au contraire, certaines plantes peuvent accumuler les métaux et les stocker dans leurs parties aériennes. Ces plantes sont définies comme hyperaccumulatrices, nous les détaillerons dans le chapitre suivant.

Chapitre 3

Les plantes hyperaccumulatrices, un cas particulier de tolérance aux métaux

A. Qu'est-ce que l'hyperaccumulation de métaux chez les plantes ?

A.1. Définition des plantes hyperaccumulatrices de métaux

On compte aujourd'hui plus de 400 espèces de plantes hyperaccumulatrices qui accumulent des métaux tels que le zinc, le cadmium, le cobalt, le cuivre, le manganèse ou le nickel. Le seuil d'accumulation de métal dans les parties aériennes, qui définit une plante hyperaccumulatrice, diffère en fonction du métal considéré. Les plantes hyperaccumulatrices de zinc ont ainsi la capacité d'accumuler plus de 1% de ce métal par rapport à leur matière sèche dans leurs parties aériennes (Baker and Brooks, 1989). On en connaît 16 espèces communes en Europe du Nord, dont *Thlaspi caerulescens* et *Arabidopsis halleri* qui appartiennent à la famille des *Brassicaceae*. Contrairement à la majorité des plantes hyperaccumulatrices qui n'accumulent qu'un seul métal, ces deux espèces peuvent accumuler plusieurs métaux : le zinc, le cadmium et le nickel pour *T. caerulescens* (Assunção *et al.*, 2003), le zinc et le cadmium pour *A. halleri* (Bert *et al.*, 2000, Bert *et al.*, 2003).

Ces plantes représentent une ressource fragile mais irremplaçable tant pour la compréhension génétique et moléculaire de la physiologie des métaux, que pour la manipulation des caractéristiques du prélèvement, du transport et de l'accumulation des métaux dans les plantes. De ce fait elles ont fait l'objet d'un nombre croissant d'études au cours de ces dix dernières années (Pollard *et al.*, 2002).

A.2. Origine évolutive de l'hyperaccumulation

Plusieurs hypothèses ont été avancées quant à l'origine évolutive de l'hyperaccumulation : l'hypothèse la mieux documentée repose sur la défense contre des attaques de pathogènes ou d'herbivores. Cependant, les études sont contradictoires, certaines montrant que l'hyperaccumulation protège la plante de l'attaque (chez *T. caerulescens* : cas du cadmium protégeant contre les thrips, Jiang *et al.*, 2005, cas du zinc protégeant contre des chenilles, Jhee *et al.*, 1999) alors que d'autres montrent que la plante n'est pas protégée par l'hyperaccumulation de métaux contre les herbivores (cas du zinc ne protégeant pas *A. halleri* contre les escargots, Huitson and Macnair, 2003). Ces résultats contradictoires tendent à montrer que l'hyperaccumulation de métaux ne constitue pas un mécanisme général de protection de la plante contre les attaques biotiques, mais que cet effet protecteur et bénéfique peut être observé dans certaines conditions écologiques particulières.

A.3. Plantes hyperaccumulatrices : quels enjeux pour la phytoremédiation ?

L'augmentation importante des surfaces polluées par les activités industrielles nécessite la mise en place de stratégies nouvelles de dépollution et/ou de limitation de la propagation de cette pollution. Dans cette optique les concepts de phytoremédiation tels que la phytostabilisation et la phytoextraction sont technologiquement très intéressants car ils représentent une alternative écologique et peu coûteuse face aux traitements physico-chimiques. La phytoremédiation désigne la technique visant à la réhabilitation de sols modérément pollués par l'utilisation de plantes (Clemens, 2001a; Krämer, 2005; Pilon-Smits, 2005). Ce terme englobe les concepts de phytoextraction et phytostabilisation.

La phytoextraction consiste en l'utilisation de plantes qui vont extraire les métaux du sol pollué et les stocker dans leurs parties aériennes qui sont alors récoltées (McGrath and Zhao, 2003). Cependant, la plante idéale pour répondre à cette approche doit conjuguer la capacité d'accumuler des métaux en grande quantité dans ses parties

aériennes –récoltables- avec une biomasse importante et une croissance rapide. Malheureusement, la plupart des plantes hyperaccumulatrices, bien qu'ayant la capacité de stocker de grandes quantités de métaux dans leurs parties aériennes, n'ont ni une forte biomasse, ni une croissance rapide. Ainsi, la connaissance des déterminants moléculaires de la tolérance et de l'hyperaccumulation de métaux pourrait permettre d'apporter à des espèces à forte biomasse et à croissance rapide des caractères de plantes hyperaccumulatrices, que ce soit par le biais de la transgénèse, ou par celui plus classique de la sélection variétale.

Les plantes hyperaccumulatrices présentent néanmoins un danger potentiel pour la santé humaine car elles constituent un point d'entrée pour les métaux lourds dans la chaîne alimentaire. Pour cette raison, les plantes tolérantes aux métaux mais présentant des teneurs faibles en métaux font aussi l'objet d'études afin d'être utilisées en phytostabilisation. Ainsi récemment l'expression chez *A. thaliana* d'un transporteur bactérien de plomb, cadmium et zinc (ZntA) a permis l'obtention de plantes transgéniques tolérantes au plomb et au cadmium mais contenant des teneurs moindres en ces métaux (Lee *et al.*, 2003).

B. *Arabidopsis halleri* : un modèle d'étude pour les mécanismes de la tolérance aux métaux et de l'homéostasie du zinc

Arabidopsis halleri (L.) (anciennement *Cardaminopsis halleri*, O'Kane and Al-Shehbaz, 1997) ssp. *halleri* est une espèce pérenne herbacée, allogame et auto-incompatible, qui forme des stolons. Elle présente une tolérance pour le zinc et le cadmium, et une capacité d'hyperaccumulation pour ces deux métaux (Bert, 2000; Bert *et al.*, 2000, Bert *et al.*, 2003). Cependant, on trouve des populations se trouvant sur sol pollué (métallicole) et sur sol non pollué (non métallicole). De ce fait *A. halleri* est qualifiée de métalphyte facultative (Bert, 2000).

Arabidopsis halleri est phylogénétiquement très proche d'*Arabidopsis thaliana*, leur spéciation datant de 5 millions d'années (Koch *et al.*, 2000), cependant, *A. thaliana* est une espèce autogame sensible aux métaux, en particulier au zinc (Figure I.1). Cette

proximité fait d'*A. halleri* une espèce modèle pour l'étude de la tolérance au zinc. En effet, beaucoup d'outils moléculaires développés chez *A. thaliana* peuvent être utilisés chez *A. halleri* : marqueurs moléculaires (Saumitou-Laprade, communication personnelle) ; cartographie physique par synténie (Loubet *et al.*,) et utilisation de puces à ADN pour des approches transcriptomiques (Becher *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2004). L'étude d'*A. halleri* peut également contribuer à approfondir nos connaissances fondamentales sur l'homéostasie du zinc dans la plante. De plus la compréhension des mécanismes de détoxification du zinc pourrait trouver des applications biotechnologiques en phytoremédiation.

Cependant, les études sur *A. halleri* sont récentes et assez peu nombreuses. Elles portent essentiellement sur le déterminisme génétique des caractères de tolérance et d'hyperaccumulation de cette plante (Macnair *et al.*, 1999; Bert *et al.*, 2000, Bert *et al.*, 2003). L'étude de la descendance d'un croisement interspécifique entre *A. halleri* (tolérante et hyperaccumulatrice de zinc) et *A. lyrata* (non tolérante, non accumulatrice) a montré que la tolérance au zinc chez *A. halleri* semblait être sous le contrôle d'un gène majeur dont l'effet peut être modifié par quelques gènes appelés modificateurs (Macnair *et al.*, 1999). Des études en cours semblent au contraire indiquer que le caractère de tolérance au zinc pourrait être sous le contrôle de 3 QTL (P. Saumitou-Laprade, communication personnelle). Quoi qu'il en soit, la réponse cellulaire à la toxicité du zinc est susceptible d'impliquer l'expression de plusieurs gènes en aval.

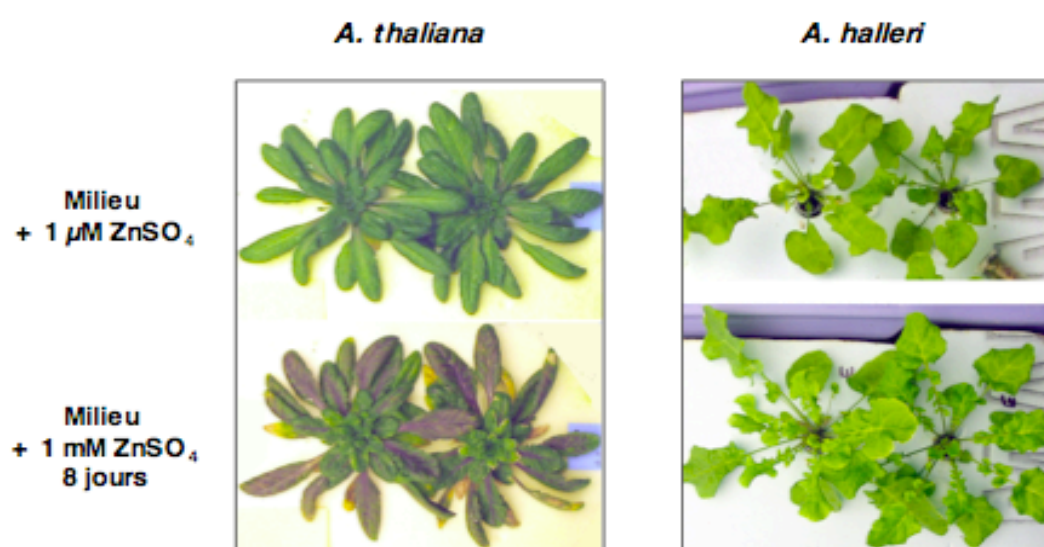


Figure I.1. Comparaison des phénotypes sur zinc chez *A. thaliana* et *A. halleri*.

Les plantes cultivées pendant 5 (*A. thaliana*) ou 8 semaines (*A. halleri*) en hydroponie sur 1 μM de zinc ont été traitées pendant une semaine sur 1 mM de zinc. On voit que les plantes d'*A. thaliana* présentent des symptômes de toxicité (présence d'anthocyanes) liés à la présence de zinc. Au contraire, le développement des plantes d'*A. halleri* est favorisé par la présence de zinc.

C. Bases moléculaires de l'hyperaccumulation de zinc

La capacité surprenante des plantes hyperaccumulatrices à stocker de grandes quantités de métaux, et en particulier de zinc, dans leurs parties aériennes repose sur quatre mécanismes physiologiques distincts : (1) une large prospection/ exploration racinaire dans des sols contenant des métaux (Schwartz *et al.*, 1999), (2) un fort niveau d'absorption de ces métaux au niveau des racines, (3) une translocation importante des métaux des racines vers les parties aériennes, (4) une détoxification efficace des métaux dans les parties aériennes par le biais de la compartimentation et/ou de la chélation. Cette dernière comprend le stockage des métaux dans des compartiments extracytosoliques de la cellule et métaboliquement moins actifs tels que les vacuoles (Cosio *et al.*, 2004; Marquès *et al.*, 2004) ou la paroi, mais également dans des cellules particulières comme les trichomes (Küpper *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2000).

C.1. Transporteurs de zinc chez les plantes hyperaccumulatrices

Chez *T. caerulescens*, espèce résistante et hyperaccumulatrice de zinc, la comparaison avec une espèce proche sensible, a permis de montrer que l'absorption racinaire de zinc, plus importante chez *T. caerulescens*, était liée à une augmentation de V_m et non de K_m , indiquant un plus grand nombre de transporteurs sur la membrane plasmique par unité de surface chez cette dernière (Lasat *et al.*, 1996). Enfin trois transporteurs de zinc ont été caractérisés chez *Thlaspi caerulescens* : ZNT1 (Pence *et al.*, 2000) et ZNT2 (Assunção *et al.*, 2001) appartiennent à la famille des ZIP, ZTP1 (Assunção *et al.*, 2001) appartient à la famille des CDF.

Chez *A. halleri*, le transporteur AhMTP1, appartenant à la famille CDF, complémente le mutant de *Saccharomyces cerevisiae* $\Delta zrc1\Delta cot1$ qui présente une sensibilité au zinc (Becher *et al.*, 2004). La même complémentation est obtenue par expression de l'orthologue chez *T. goesingense* (TgMTP1, Kim *et al.*, 2004), suggérant que les transporteurs CDF, pourraient jouer un rôle dans la tolérance aux métaux, en assurant un efflux de zinc depuis le cytoplasme. Dans la famille des ATPases de type P_{1B}, l'orthologue de AthMA3 pourrait également jouer un tel rôle (Becher *et al.*, 2004).

L'ensemble de ces études sur les transporteurs de zinc tend à montrer qu'ils sont constitutivement plus fortement exprimés dans les plantes hyperaccumulatrices que chez des espèces sensibles au zinc. C'est le cas de par exemple de ZNT1 chez *T. caerulescens* (Lasat *et al.*, 2000; Pence *et al.*, 2000) et AhHMA3 chez *A. halleri* (Becher *et al.*, 2004).

C.2. Rôle de la chélation du zinc chez les plantes hyperaccumulatrices

Le rôle des chélateurs potentiels de zinc tels les métallothionéines et phytochélatines n'a pas été montré chez les plantes hyperaccumulatrices. Chez *Silene vulgaris* par exemple, espèce tolérante au zinc, les phytochélatines ne sont pas impliquées dans la tolérance au zinc (Harmens *et al.*, 1993).

Une étude menée chez *Alyssum* a permis de corréler de façon claire le caractère d'hyperaccumulation du nickel chez cette espèce à la présence du complexe nickel/histidine dans le xylème (Krämer *et al.*, 1996). Ces résultats ont incité les chercheurs à considérer le rôle des acides aminés mais aussi organiques dans la tolérance à d'autres métaux, en particulier le zinc. Chez *Thlaspi caerulescens*, il a été montré que le zinc était majoritairement chélaté à l'histidine dans les racines (70%), alors que, dans les parties aériennes, il était chélaté à des acides organiques comme le citrate (38%) (Salt *et al.*, 1999). Chez *A. halleri*, le zinc est principalement lié au malate dans les parties aériennes, au niveau des vacuoles (Sarret *et al.*, 2002). Les acides organiques assureraient ainsi le stockage final du zinc dans les parties aériennes, chez ces deux espèces.

Un acide aminé non protéinogène, la nicotianamine, pourrait également jouer un rôle dans la tolérance au zinc. Weber *et al.* (2004) ont ainsi montré que l'expression de la nicotianamine synthase (NAS) d'*A. halleri* dans la levure *Schizosaccharomyces pombe* Δzhf restaurait la croissance de cette souche en présence de 0,5 mM de zinc. La souche Δzhf présente une sensibilité au zinc liée à la mutation dans un transporteur de zinc situé sur le réticulum endoplasmique et impliqué dans la détoxification du zinc en excès dans le cytoplasme (Clemens *et al.*, 2002). L'enzyme NAS est responsable de la synthèse de la nicotianamine, par condensation de 3 molécules de S-adénosyl

méthionine. Or il a été montré que la nicotianamine pouvait chélater le zinc et le nickel *in vitro*, bien que la chélation *in vivo* n'ait été montrée que pour le nickel chez *T. caerulescens* (Vacchina *et al.*, 2003). Enfin, *in planta*, la surproduction de nicotianamine chez *A. thaliana* entraîne une tolérance accrue au zinc (Pianelli, 2004), suggérant ainsi un rôle possible de la nicotianamine dans la tolérance au zinc.

Chapitre 4

Quelles approches pour étudier les mécanismes moléculaires de la tolérance au zinc chez les plantes ?

A. Utilisation des ressources génétiques chez *A. thaliana*

Une des approches possibles pour l'étude des mécanismes de la tolérance au zinc repose sur la génétique quantitative, par l'utilisation des outils développés chez *A. thaliana*. L'exploitation des variations naturelles de tolérance au zinc entre les différents écotypes d'*A. thaliana*, par exemple ou le phénotypage d'une population recombinante (RILS) sont deux stratégies qui peuvent être utilisées pour cartographier le ou les QTL de tolérance au zinc.

L'étude du « ionome » par détection systématique des profils d'accumulation d'éléments minéraux dans des populations mutantes d'*A. thaliana* (« element profiling »), peut également conduire à l'identification de gènes impliqués dans l'homéostasie voire la tolérance au zinc (Lahner *et al.*, 2003; Rea, 2003).

Ces approches, bien que prometteuses, sont lourdes à mettre en place et nécessitent la mise au point d'un phénotypage standardisé. Elles n'ont pas encore permis d'identifier des acteurs moléculaires de la tolérance au zinc.

B. Utilisation des plantes hyperaccumulatrices

Les plantes hyperaccumulatrices, naturellement adaptées aux sols toxiques et présentant une tolérance aux métaux, sont des ressources précieuses pour l'étude des mécanismes de tolérance au zinc. De plus, la possibilité de croisement interspécifique

par exemple entre *A. halleri*, espèce tolérante au zinc, et *A. lyrata*, non tolérante, permet de mener des approches de cartographie génétique pour l'identification du ou des QTL de tolérance au zinc (Saumitou-Laprade, communication personnelle).

D'autre part, la proximité phylogénique entre *A. halleri* et *A. thaliana* a permis l'utilisation de puces à ADN d'*A. thaliana* pour une étude du transcriptome d'*A. halleri*. Cette approche a conduit à l'identification de la nicotianamine synthase et de transporteurs de la famille ZIP et CDF dont l'expression est constitutivement plus forte chez *A. halleri* que chez *A. thaliana* (Becher *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2004). Cependant la limite de cette approche est liée à la différence de séquences qui ne permet pas l'hybridation de tous les oligonucléotides. Sur 8300 gènes d'*A. thaliana* représentés sur une puce, un signal positif d'hybridation est obtenu dans 70% des cas pour *A. thaliana*, mais dans seulement 37% des cas avec *A. halleri* (Becher *et al.*, 2004).

Enfin, les mécanismes de tolérance au zinc et plus largement de l'homéostasie du zinc étant encore assez mal connus, une approche « gène candidat » pose le problème de la faible diversité des candidats, seuls les transporteurs et métallothionéines pouvant être envisagés dans ce sens.

C. Approche choisie pour le travail de thèse

Des expériences menées dans notre équipe ont montré que des protoplastes préparés à partir de feuilles d'*A. halleri* présentaient une tolérance accrue au zinc par rapport à ceux d'*A. lyrata*, espèce non tolérante au zinc (Marquès *et al.*, 2004). Ces résultats suggèrent qu'un des mécanismes de la tolérance au zinc de l'espèce *A. halleri* s'exprime au niveau cellulaire. Nous nous sommes précisément intéressés à ce mécanisme de tolérance cellulaire.

Aussi avons-nous choisi de mettre en œuvre une approche cellulaire par expression en système hétérologue. Une banque d'ADNc de feuilles d'*A. halleri* a donc été construite puis a servi à transformer la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

De nombreux travaux décrivent l'identification de gènes impliqués dans la physiologie des métaux par le biais du criblage de banque d'ADNc dans la levure. Parmi les criblages sur toxicité métallique, on note le cas de ZRC1 (transporteur tonoplastique d'efflux de zinc vers le cytoplasme) isolé par expression homologue

d'une banque de levure en condition de toxicité en zinc (Kamizono *et al.*, 1989). Plus récemment, des criblages en conditions de toxicité en cadmium ont conduit au clonage de la phytochélatine synthase AtPCS1 à partir d'une banque d'ADNc d'*A. thaliana* (Vatamaniuk *et al.*, 1999), et d'un transporteur HMA4 à partir d'une banque de *Thlaspi caerulescens* (Bernard *et al.*, 2004). Le criblage sur nickel a permis d'isoler des protéines impliquées dans les mécanismes de régulations épigénétiques à partir d'une banque de maïs (HMGY, Forzani *et al.*, 2001), et une enzyme impliquée dans la production d'un chélateur de nickel à partir d'une banque de *Thlaspi caerulescens* (NAS, Vacchina *et al.*, 2003). Le criblage d'une banque d'ADNc d'*A. halleri* dans une levure mutée sensible au zinc a permis d'identifier le transporteur AhMTP1 impliqué dans la tolérance au zinc d'*A. halleri* (Dräger *et al.*, 2004).

Le criblage de banque d'expression dans la levure est en effet un outil d'analyse puissant car il permet de tester un grand nombre d'ADNc potentiellement intéressants et d'accéder directement à un phénotype lié à l'expression d'un de ces ADNc. Ce type d'approche permet également de révéler de nouveaux acteurs dans la tolérance aux métaux. C'est le cas de protéines membranaires riches en cystéines qui ont été isolées par criblage d'une banque d'expression d'*A. thaliana* dans la levure, et qui sont impliquées dans la tolérance au cadmium (Song *et al.*, 2004).

Le criblage nous a permis d'isoler cinq ADNc conférant un phénotype stable de tolérance au zinc dans la levure. Ces ADNc codent des protéines très fortement homologues à des protéines appelées défensines de plantes (PDF, Terras *et al.*, 1995; Thomma *et al.*, 2002). Ces protéines ont été caractérisées pour leur activité antifongique, cependant aucune donnée bibliographique ne fait état, à ce jour, de relations entre les défensines et la physiologie des métaux.

Chapitre 5

Les défensines de plantes

A. Les défensines appartiennent à la grande famille des peptides antimicrobiens

Plusieurs familles de peptides antimicrobiens ont été caractérisées chez les plantes. La majorité d'entre eux sont de petits peptides riches en cystéines qui forment des ponts disulfures assurant une structure spatiale globulaire. Ces peptides sont souvent codés par des familles multigéniques dont les différents gènes présentent des particularités tissulaires d'expression, certains gènes étant par ailleurs induits par le pathogène, alors que d'autres sont d'expression constitutive (Broekaert *et al.*, 1995; Garcia-Olmedo *et al.*, 1998). Parmi ces peptides antimicrobiens, on distingue, entre autres, les nsLTP (non specific Lipid Transfer Protein, Garcia-Olmedo *et al.*, 1995), les « snakines » récemment découvertes chez la pomme de terre, (Segura *et al.*, 1999; Berrocal-Lobo *et al.*, 2002), les thionines et les défensines de plantes (PDF). Notons que les défensines sont également retrouvées chez les mammifères où elles jouent un rôle dans l'immunité innée (Ganz, 2003a).

B. Les PDF ont d'abord été caractérisées chez le radis

Au début des années quatre-vingt-dix, Terras *et al.* sont à la recherche de molécules antifongiques. La germination représentant un processus crucial dans la lutte de la plante contre les micro-organismes, ils choisissent d'isoler ces molécules à partir



Figure 1.2. Effet de la présence d'une défensine sur la croissance et la morphologie d'hyphes mycéliennes.

Ces photographies sont extraites de l'article de Terras *et al.*, (1992) paru dans *JBC*.

Une solution de spores de *Pyricularia oryzae* est incubée 24 heures en présence de milieu de croissance (a) ou de milieu additionné d'une protéine fongistatique : RsAFP1, $3 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (b). La morphologie du champignon en présence de la défensine est qualifié « d'hyperbranching ». Une coloration au bleu de méthylène 0,01% est effectuée avant la photographie. La barre représente environ $25 \mu\text{m}$.

de graines de radis. Les molécules isolées par séparation chromatographique sont criblées pour leur activité antifongique contre *Fusarium culmorum* en présence de 1 mM de CaCl₂ et 50 mM de KCl. En effet, les compartiments cellulaires et intercellulaires sont riches en cations ; l'activité d'une molécule antifongique doit donc pouvoir s'exercer dans ces conditions. Ils présentent la purification de deux défensines appelées RsAFP1 et RsAFP2 (pour AntiFungal Protein, Terras *et al.*, 1992). La présence de RsAFP à de faibles concentrations, de l'ordre du micromolaire, entraîne l'arrêt de croissance de l'hyphe mycélien. Cependant cet effet est réversible : si les hyphes sont transférés sur un milieu sans défensines, leur croissance peut reprendre. Aussi l'activité des défensines RsAFP1 et RsAFP2 est elle qualifiée de fongistatique et non de fongicide. Les champignons filamenteux cultivés en présence des peptides RsAFP1 et RsAFP2 purifiés montrent une morphologie particulière : leurs hyphes sont boursouflées et fortement ramifiées. Ce phénotype est qualifié d'« hyperbranching » (Figure I.2). Notons que toutes les défensines à activité antifongique ne conduisent pas à ce phénotype d'« hyperbranching », on distingue les défensines morphogéniques (exp : RsAFP2) et non morphogéniques (exp : DmAMP1, Osborn *et al.*, 1995) qui, bien qu'ayant une activité antifongique, n'entraînent pas de modifications morphologiques chez le champignon.

Ces peptides isolés chez le radis présentent plusieurs particularités intéressantes : (i) une forte activité antifongique (l'activité antifongique étant mesurée par la concentration de défensines requise pour une inhibition de 50% de la croissance du champignon, avec IC₅₀ 0,4 à 25 µg.ml⁻¹, soit une concentration de l'ordre du micromolaire), (ii) un large spectre d'activité envers les champignons filamenteux (*Alternaria brassicola*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *Pyricularia oryzae*, *Verticillium dahliae* Terras *et al.*, 1993), (iii) une sensibilité plus faible à la présence de cations par rapport aux autres protéines antifongiques connues alors. Le nom de défensines de plantes, en relation avec leur rôle dans la défense des plantes contre les pathogènes, a été proposé par Terras *et al.*, (1995), en remplacement de l'ancienne terminologie de gamma-thionin (Colilla *et al.*, 1990; Mendez *et al.*, 1990).

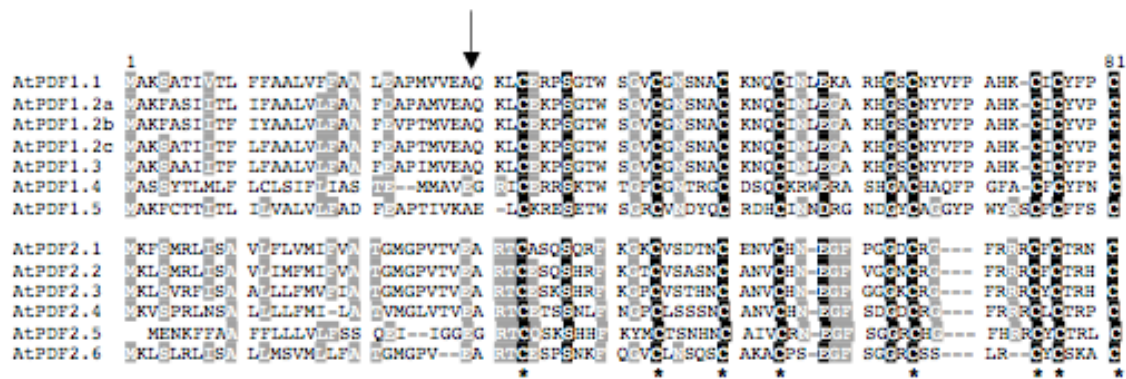


Figure I.3. Alignement des séquences protéiques des défensines d'*A. thaliana* des familles PDF1 et PDF2.

L'alignement a été réalisé grâce au logiciel MULTALIN (Corpet, 1988). Les acides aminés sont surlignés : en noir lorsque toutes les séquences sont identiques, en gris lorsqu'au moins 50% des séquences le sont. La position conservée des cystéines est marquée par des astérisques (*). La flèche indique le site potentiel de clivage de la protéine. Les accèsions sont données en annexe.

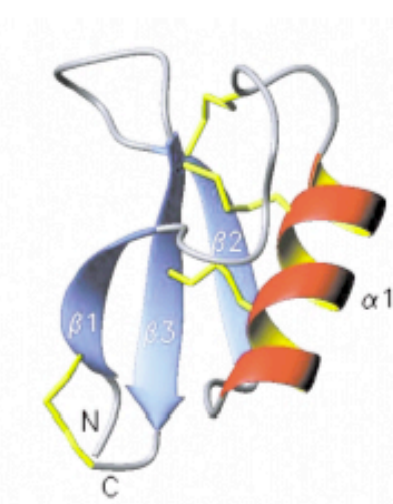


Figure I.4. Structure tridimensionnelle de la défensine de *Nicotiana glauca* NaD1.

L'hélice $\alpha 1$ (en rouge) est reliée au dernier feuillet ($\beta 3$, en bleu) par deux ponts disulfures (en jaune). Un troisième pont disulfure relie les parties N et C terminale de la protéine. Le quatrième pont est établi entre le feuillet $\beta 2$ et une boucle située entre $\alpha 1$ et $\beta 2$. D'après Lay *et al.*, 2003b.

Quatre défensines ont donc d'abord été isolées à partir de graines et de feuilles de radis (RsAFP1 à 4, Terras *et al.*, 1995) puis à partir de graines d'autres Brassicacées : *Brassica napus*, *Brassica rapa*, *Sinapis alba* et *A. thaliana* (Terras *et al.*, 1993). Depuis de nombreuses défensines ont été isolées (Lay and Anderson, 2005). Chez *A. thaliana*, on compte 15 gènes codant des PDF qui se répartissent en 3 familles, les familles 1 et 2 étant les plus proches (Thomma *et al.*, 2002, Figure I.3).

C. Caractéristiques structurales des PDF

Les défensines sont définies comme des petites protéines basiques et riches en cystéines. Lors de la purification des défensines de radis, Terras *et al.* (1995) ont montré que les défensines étaient présentes dans les tissus sous forme mature, le peptide signal ayant été clivé. La protéine entière est alors définie comme une « pré-protéine » (Figure I.3). Des études par RMN menées sur la défensine de radis RsAFP1 ont confirmé ces données (Fant *et al.*, 1998).

La séquence peptidique des défensines de plantes est caractérisée par la présence de 8 cystéines organisées selon des motifs conservés entre les espèces végétales : CXC, GXC, CXXC (où X désigne n'importe quel résidu) (Thomma *et al.*, 2002, Figure I.3). Le motif consensus, décrit par Cornet *et al.* (1995), trouvé au niveau de la structure primaire de la protéine, s'écrit: C-(X)_n-C-3X-C-(X)_{n'}-G-X-C-(X)_{n''}-C-X-C. La présence de cystéines conservées dans ce motif permet l'établissement de ponts disulfures qui relie une hélice α (comprenant le motif CXXXC) au second des trois feuillets β antiparallèles (comprenant le motif CXC), selon une structure tridimensionnelle appelée « cystein-stabilised α helix ». La structure tridimensionnelle des défensines apparaît donc comme une structure compacte (Figure I.4).

Néanmoins, malgré la présence de huit cystéines, RsAFP1 et RsAFP2 ne présentent pas de thiols libres sous leur forme native (Terras *et al.*, 1992). De plus, sous leur forme non réduite, ces peptides pourraient exister sous forme quaternaire, en oligomères composé de trois ou quatre monomères (Terras *et al.*, 1992). Récemment, une forme dimérique de défensine a été identifiée chez *Pachyrrhizus erosus* (Song *et al.*, 2005). Ceci suggère que les cystéines pourraient être impliquées dans des ponts

disulfures inter et/ou intramoléculaires. De plus, les peptides n'exercent leur activité antifongique que sous leur forme native, et non pas lorsqu'ils sont réduits, suggérant ainsi un rôle de la structure quaternaire dans la fonction antifongique.

D. Localisation de l'expression des gènes chez *A. thaliana*

Bien que les gènes codant des défensines aient été répertoriés chez *A. thaliana* (Thomma *et al.*, 2002), aucune étude systématique de l'expression des gènes des 3 familles *AtPDF* n'a été publiée à ce jour. Parmi les gènes *AtPDF*, *AtPDF1.2a* est celui dont l'expression a été le plus largement décrite. Ce gène est couramment utilisé comme gène marqueur de réponse au signal éthylène ou jasmonate. En effet, son expression est induite par les voies de signalisation de ces deux hormones (Penninckx *et al.*, 1996; Manners *et al.*, 1998; Penninckx *et al.*, 1998), en particulier via un élément cis (GCC box) situé dans sa séquence promotrice (Brown *et al.*, 2003).

Certains gènes de défensines sont présents sur les puces à ADN et les résultats des hybridations sont disponibles sur plusieurs sites internet. Nous avons résumé dans la figure I.5 les données relatives aux défensines disponibles sur le site Genevestigator (<https://www.genevestigator.ethz.ch>). Bien que ces données ne soient pas publiées, elles restent très informatives. Dans la famille *PDF1*, seuls 4 gènes sont présents sur les puces utilisées (*At1g75830*, *At5g44420*, *At2g26020* et *At1g19610*). Dans les familles *PDF2* et *PDF3*, tous les gènes sont représentés. Deux types de profils d'expression apparaissent : (i) certains gènes ont une expression ubiquitaire (*AtPDF1.4*, *AtPDF2.2*, *AtPDF2.3* et *At4g30070*), (ii) d'autres ont une expression spécifique d'un organe (*AtPDF1.1* et *AtPDF2.1* dans les graines ; *AtPDF1.2a* et *AtPDF1.2b* dans les feuilles ; *AtPDF2.4* dans les fleurs ; *AtPDF2.6* dans les carpelles ; *At5g38330* dans les étamines ; *AtPDF2.5* dans les racines). Une étude d'expression par RT-PCR de certains membres de la famille *PDF2* confirme en partie ces données (Thomma and Broekaert, 1998). Ces

Famille	Gène	Accession	Feuilles	Fleurs	Graines	Racines
PDF1	<i>AtPDF1.1</i>	At1g75830			+	
	<i>AtPDF1.2a</i>	At5g44420	+			
	<i>AtPDF1.2b</i>	At2g26020	+			
	<i>AtPDF1.4</i>	At1g19610	+	+	+	+
PDF2	<i>AtPDF2.1</i>	At2g02120			+	
	<i>AtPDF2.2</i>	At2g02100	+	+	+	+
	<i>AtPDF2.3</i>	At2g02130	+	+	+	+
	<i>AtPDF2.4</i>	At1g61070		+		
	<i>AtPDF2.5</i>	At5g63660				+
	<i>AtPDF2.6</i>	At2g02140		+ ^E		
PDF3		At5g38330		+ ^C		
		At4g30070	+	+	+	+

Figure 1.5. Données d'expression des gènes de défensines dans les différents organes chez *A. thaliana*.

Ce tableau présente une compilation des résultats d'hybridation sur puce (ATH1 22K) établis d'après les données disponibles sur le site Genevestigator (<https://www.genevestigator.ethz.ch>), grâce à l'outil Gene Atlas. Le signe + indique une accumulation des messagers dans l'organe en question. Par souci de clarté, ce signe est surligné de la même couleur que l'organe, lorsque l'expression du gène est détectée préférentiellement dans cet organe spécifique. Dans le cas d'une expression ubiquitaire, le signe + est surligné en gris. Les signes ^E et ^C précisent la localisation des messagers dans la fleur: dans les étamines (^E) ou dans les carpelles (^C).

résultats montrent que, chez *A. thaliana*, les gènes *PDF* semblent globalement exprimés dans tous les tissus de la plante, avec néanmoins des spécificités possibles en fonction des gènes.

E. L'expression tissulaire des PDF est en accord avec leur rôle antifongique chez plusieurs espèces

Les premières défensines, isolées dans la graine de radis, sont très fortement exprimées (5 µg de RsAFP par graine soit 0,6% des protéines totales, Terras *et al.*, 1995). On les trouve majoritairement entre les organes de la graine, plus précisément dans les espaces intercellulaires (lamelle moyenne) au niveau des cellules périphériques des cotylédons de l'hypocotyle et de l'endosperme (Terras *et al.*, 1995). Elles sont secrétées dans le milieu lors de la germination (Terras *et al.*, 1995), 30% des RsAFP étant relarguées de la graine 4 heures après son incision. Plus récemment, des défensines ont également été isolées dans les fleurs de *Nicotiana glauca* et *Petunia hybrida* (Lay *et al.*, 2003a). Ces PDF présentent peu de similarité avec les protéines RsAFP, en dehors de l'arrangement du squelette de cystéines. En particulier, elles possèdent une extension C-terminale d'environ 30 acides aminés, qui est absente de la forme mature. La présence de cette extension pourrait expliquer leur localisation vacuolaire (Lay *et al.*, 2003a). Enfin, une défensine de *Dahlia merckii* (DmAMP1) est retrouvée dans les exsudats racinaires (Turrini *et al.*, 2004).

Ces différentes localisations correspondent à des tissus en contact avec les micro-organismes (graine, racine) ou d'importance primordiale pour la reproduction de la plante (anthère), et permettent aux PDF d'assurer un rôle dans les mécanismes de défense.

F. Expression de défensine en hétérologue *in planta*

Des expériences de surproduction de défensines diverses chez plusieurs espèces végétales ont été réalisées, dans le but d'augmenter la résistance de ces plantes aux attaques pathogènes. Les plantes transgéniques de tabac surexprimant une défensine de

radis (RsAFP2) sous le contrôle du promoteur 35S présentent effectivement une résistance accrue à *Alternaria longipes*, mesurée par la surface réduite des lésions foliaires (Terras *et al.*, 1995). Des résultats concluants ont également été obtenus par surproduction d'une défensine de *Medicago sativa* dans la pomme de terre vis-à-vis de la résistance à *Verticillium dahliae* (Gao *et al.*, 2000) ; d'une défensine de *Brassica campestris* dans le tabac vis-à-vis de la résistance à *Phytophthora parasitica* (Park *et al.*, 2002) ou encore d'une défensine de dahlia dans l'aubergine vis-à-vis de la résistance à *Botrytis cinerea* (Turrini *et al.*, 2004).

G. Le mode d'action antifongique des PDF implique l'interaction avec des phospholipides membranaires conduisant à une perméabilisation de la membrane

G.1. Les PDF modifient les flux ioniques

L'activité antifongique des défensines se traduit, au niveau de la membrane de l'hyphe du champignon filamenteux, par un influx de Ca^{2+} , un efflux de K^+ , une alcalinisation du milieu extérieur et une hyperpolarisation de la membrane (Thevissen *et al.*, 1996; Thevissen *et al.*, 1999). Cette perméabilisation est observée pour des concentrations de défensines inhibant la croissance du champignon. Le maintien d'un gradient calcique étant essentiel à la croissance polarisée de l'hyphe, la perturbation des flux calciques pourrait conduire à cet arrêt de croissance. Récemment, la découverte des partenaires lipidiques des défensines, décrites ci-dessous, a conduit à un modèle pour l'action antifongique des PDF (Figure I.6).

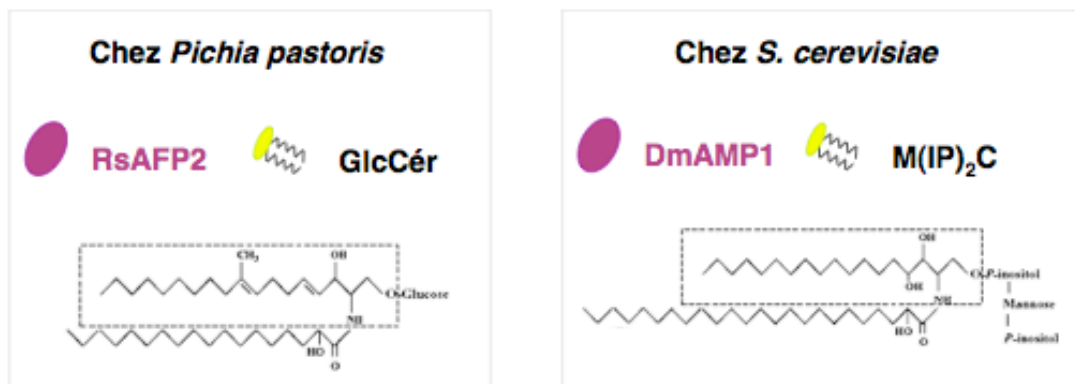
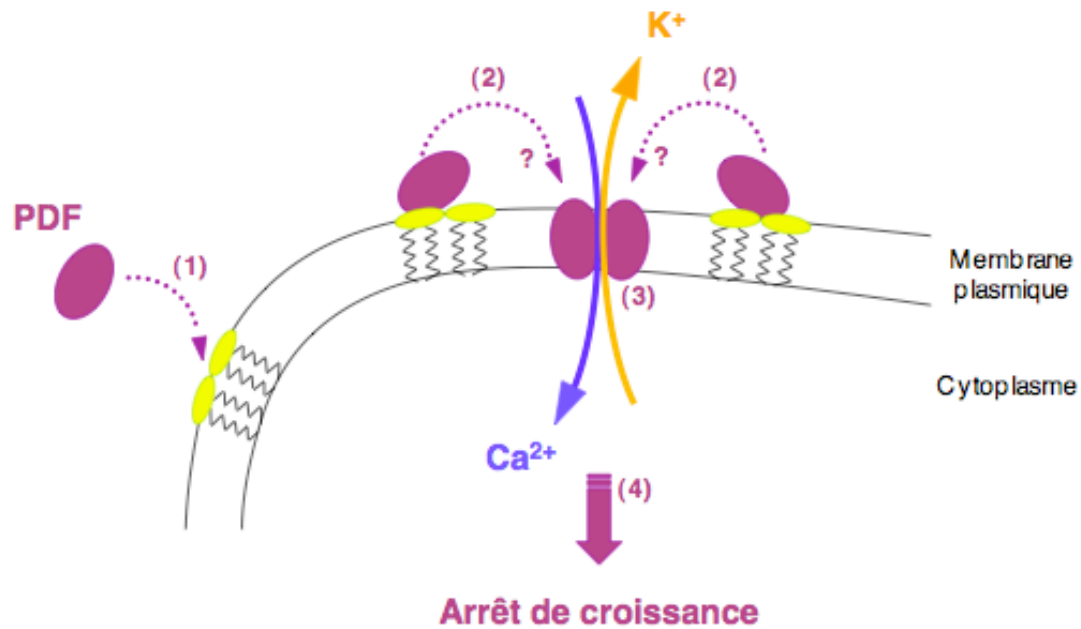


Figure I.6. Modèle d'action antifongique de deux défenses de plantes.

Ce schéma est inspiré du modèle proposé par Thevissen *et al.* (2003) dans la revue Peptides. Les encadrés illustrent les acteurs moléculaires présents dans le cas d'une activité antifongique envers les levures *Pichia pastoris* ou *Saccharomyces cerevisiae*. Les formules des sphingolipides concernés sont données, le squelette sphingoïde étant entouré.

(1) Interaction des défenses avec certains sphingolipides membranaires. Deux exemples d'interactions connues sont donnés en légende : chez *Pichia pastoris* la défense RsAFP2 interagit avec des GlucosylCéramides (GlcCér) ; chez *S. cerevisiae* la défense DmAMP1 interagit avec des Mannosyl-di-Inositol-PhosphorylCéramides (M(IP)₂C).

(2) L'internalisation des défenses dans la membrane plasmique conduisant à la formation de pores reste une hypothèse.

(3) Flux ioniques résultants de la perméabilisation de la membrane plasmique : entrée de calcium (Ca²⁺) et sortie de potassium (K⁺).

(4) Arrêt, de façon directe ou indirecte, de la croissance du champignon.

G.2. Mode d'action d'une défensine non morphogénique DmAMP1

La levure *S. cerevisiae* est sensible à l'activité antifongique de la défensine de dahlia DmAMP1. Après criblage de mutants de levure *S. cerevisiae* résistants à DmAMP1, deux gènes ont été identifiés. De façon remarquable, les produits de ces deux gènes interviennent dans la biosynthèse des sphingolipides.

Le premier gène, *IPT1*, code une enzyme de la voie de biosynthèse des sphingolipides qui assure la formation de mannose-(inositol-phosphate)₂ céramide (M(IP)₂C) (Thevissen *et al.*, 2000a, Figure I.6). Or *in vitro*, DmAMP1 interagit directement avec ces céramides (Thevissen *et al.*, 2003b). *In vivo*, la fixation de DmAMP1 sur des cellules de *S. cerevisiae* est irréversible, suggérant une insertion dans la membrane (Thevissen *et al.*, 2000b). Un modèle est donc proposé (Figure I.6). Notons qu'une ou plusieurs autres voies de biosynthèse indépendantes de *IPT1* sont à envisager. En effet, le milieu de culture peut influencer sur la composition en lipides de la membrane plasmique de *S. cerevisiae*. Ainsi dans certaines conditions de culture, des céramides M(IP)₂C sont détectés chez le mutant *ipt1*, sans que leur origine soit identifiée (Im *et al.*, 2003).

Le second gène isolé, *SKN1*, pourrait également être impliqué dans la biosynthèse de M(IP)₂C (Thevissen *et al.*, 2005).

G.3. Mode d'action de la défensine morphogénique RsAFP2

La défensine RsAFP2 inhibe la croissance de la levure *Pichia pastoris*, mais elle n'a pas d'activité antifongique envers la levure *S. cerevisiae*. Or cette dernière ne possède pas de glucosylcéramide (GlcCér) dans sa membrane plasmique, contrairement à *Pichia pastoris*. Cette observation a conduit Thevissen *et al.* (Thevissen *et al.*, 2004), à tester l'activité antifongique de RsAFP2 envers une souche de *Pichia pastoris* mutée dans le gène codant l'enzyme GCS. Cette enzyme est une glucosyl-transférase qui transfère un glucose sur un céramide à partir d'UDP-glucose. Elle intervient dans la dernière étape de biosynthèse des GlcCér membranaires. La souche de *Pichia pastoris*

mutée dans ce gène (Δgcs) est donc dépourvue de GlcCér. Les auteurs ont montré que l'activité antifongique de RsAFP2 envers cette souche Δgcs était au moins 20 fois plus faible qu'envers la souche sauvage Thevissen *et al.*, 2004. De plus, ils ont montré par des expériences *in vitro* qu'il existe une interaction entre la défensine RsAFP2 et les GlcCér extraits de *Pichia*. Cette interaction est sélective : elle n'est pas observée avec d'autres GlcCér de source animale ou végétale. Cependant cette interaction est également observée entre les GlcCér et une forme mutée et inactive de RsAFP2 (RsAFP2(Y38G)). Enfin, *in vivo*, ils montrent que l'activité antifongique de RsAFP2 envers des cellules de *Pichia* préincubées avec un anti-corps anti-GlcCér est diminuée d'un facteur 4. Il semble donc que l'interaction entre la défensine RsAFP2 et les GlcCér soit nécessaire mais non suffisante à l'activité antifongique du peptide.

De façon intéressante les mêmes études sur *Pichia* ont été menées avec la défensine d'insecte appelée héliomicine, et qui présente une structure tridimensionnelle semblable à celle des défensines de plantes. Ces études ont montré que l'héliomicine interagissait avec des GlcCér de *Pichia* mais également avec des GlcCér d'origine végétale, alors qu'elle n'a pas d'activité phytotoxique. Ceci appuie l'hypothèse selon laquelle deux phénomènes seraient à découpler en ce qui concerne l'activité antifongique des défensines : en premier lieu une interaction avec un GlcCér membranaire puis une perméabilisation de la membrane conduisant l'effet antifongique. En revanche, il n'existe pas de compétition entre la défensine RsAFP2 et l'héliomicine pour l'interaction avec les GlcCér, suggérant que plusieurs motifs dans les GlcCér pourraient être reconnus par différents types de défensines.

H. Quel rôle pour les PDF dans les stress abiotiques ?

L'expression des PDF est induite par des stress biotiques mais également, de façon plus surprenante, par des stress abiotiques. Quelques travaux rapportent l'induction des PDF par un stress au froid (chez le blé, Koike *et al.*, 2002), un stress de déshydratation ou un stress salin (Yamada *et al.*, 1997; Maitra and Cushman, 1998). Il est intéressant de noter que chez *Thellungiella halophila*, une espèce halophyte, l'orthologue du gène *AtPDF1.2* est exprimé de façon forte et constitutive (Taji *et al.*, 2004). Bien qu'aucune fonction des défensines en réponse au stress environnementaux

n'ait été montrée, ces données suggèrent que les PDF pourraient être impliquées dans des réponses abiotiques. Cependant, à ce jour, aucune donnée bibliographique ne fait état de relations entre les défensines et la physiologie des métaux, en particulier le stress métallique.

Seconde Partie

Matériel et Méthodes

Chapitre 1

Matériel végétal et conditions de culture

A. Origine du matériel végétal

Les plantes d'*Arabidopsis halleri* (L.) (O’Kane & Al-Shehbaz) ssp. *halleri* utilisées pour construire la banque proviennent du site contaminé en métaux lourds d’Auby (lieu-dit du Bois des Asturies, région de Lille). Elles sont issues d’une population naturelle métallicole. Des graines d’A. *halleri* provenant du même site ont été également récoltées puis cultivées en salle de culture.

Des plantes d'*Arabidopsis thaliana* (L.) écotype Columbia (0) ont été utilisées pour la transformation.

Les graines d'*Arabidopsis lyrata* ssp. *petraea* nous ont été fournies par P. Samitou-Laprade (Lille).

B. Conditions de culture des plantes

B.1. Culture des plantes en sol

Les plantes, après germination des graines sur du papier Whatman humide, ont été cultivées selon deux méthodes : sur terreau (80% de terreau, 10% de vermiculite, 10% de sable) ou sur terre toxique prélevée sur le site d’origine et dont la teneur en zinc est de 5000 ppm (Bert *et al.*, 2000).

Pour les traitements zinc, après 3 semaines de culture sur terreau, les plantes ont été arrosées tous les deux jours avec une solution contenant 0,1 M ZnSO₄, pendant 1 semaine.

Les conditions en salle de culture sont : 10 heures de photopériode ($150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), température de 22°C le jour et de 17°C la nuit, arrosage bihebdomadaire à l'eau osmosée.

B.2. Culture des plantes en hydroponie

Les conditions en salle de culture en hydroponie sont : photopériode de 16 heures ($150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), température de 22°C le jour et de 17°C la nuit. Les milieux de culture sont renouvelés de façon hebdomadaire. Ces solutions sont composées de macroéléments : $0,5 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$; $1,25 \text{ mM KNO}_3$; $1,5 \text{ mM Ca(NO}_3)_2$; $0,75 \text{ mM MgSO}_4$; et de micro-éléments : $50 \mu\text{M NaFeEDTA}$; $50 \mu\text{M H}_3\text{BO}_3$; $19 \mu\text{M MnCl}_2$; $1 \mu\text{M CuSO}_4$; $0,2 \mu\text{M MoO}_4\text{Na}_2$. En conditions normales, les concentrations de zinc dans le milieu de culture sont de $1 \mu\text{M ZnSO}_4$ pour *A. thaliana* et de $10 \mu\text{M ZnSO}_4$ pour *A. halleri*. Pour le traitement par le zinc, le milieu est supplémenté par 1 mM ZnSO_4 (Cf. Zhao *et al.*, 2000).

B.3. Culture des plantes *in vitro*

Pour les expériences de culture *in vitro*, les graines d'*A. thaliana* (Col-0 et 35S::*AhPDF1.1*) sont stérilisées dans de l'eau de Javel ($4,5^{\circ} \text{ Cl}$) pendant 10 minutes puis rincées quatre fois avec de l'eau stérile. Les graines sont ensuite semées individuellement sur milieu MS/2 (Murashige and Skoog, 1963) modifié : $2,2 \text{ g.l}^{-1}$ MS ; 10 mM de MES ; 2% (p/v) de saccharose ; 8 g.l^{-1} d'agar. Lors des traitements toxiques, les métaux sont ajoutés sous forme de sulfate à différentes concentrations (Cf. Résultats). Les boîtes de Pétri sont placées au froid (4°C) pendant 2 jours afin de synchroniser la germination, puis placées en salle de culture.

Les conditions en salle de culture *in vitro* sont les suivantes : photopériode de 16 heures ($100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), température de 21°C le jour et de 17°C la nuit.

Chapitre 2

Matériel et milieux microbiologiques

A. Souches bactériennes

Trois souches d'*Escherichia coli* ont été utilisées : la souche XL1-Blue MRF' a été utilisée pour la construction de la banque d'ADNc, et les souches HB101 et DH5 α pour les manipulations de biologie moléculaire en routine.

La souche GV3101 pMP90 d'*Agrobacterium tumefaciens* a été utilisée pour la transformation d'*A. thaliana*.

B. Milieux de culture bactériens

Les milieux de culture sont le milieu LB (10 g.l⁻¹ tryptone ; 5 g.l⁻¹ extrait de levure ; 5 g.l⁻¹ NaCl) et le milieu SOC (0,5% (p/v) extrait de levure ; 2% (p/v) tryptone ; 10 mM NaCl ; 2,5 mM KCl ; 10 mM MgCl₂ ; 20 mM MgSO₄ ; 20 mM glucose).

C. Souches de levures

La souche de *Saccharomyces cerevisiae* utilisée pour le criblage est la souche BY4741 (ATCC: 4040002) (Mat a, *his3 Δ 1*, *leu2 Δ 0*, *met15 Δ 0*, *ura3 Δ 0*).

Afin d'éviter l'addition d'histidine (acide aminé chélateur de zinc) dans le milieu de culture, la souche BY4741his⁺ a été utilisée. Dans ce but, la souche BY4741, naturellement auxotrophe pour l'histidine, a été rendue autotrophe pour l'histidine par intégration d'un fragment *HIS3* (Czernic, communication personnelle).

La souche de *S. cerevisiae* utilisée pour cloner la séquence « Mating Factor » est la souche WB2d (Mat α , *ade2-1 can1-100 ura3-1 trp1-1 his3-12,5*).

D. Milieux de culture de levure

Le milieu riche YPD est constitué de bactopectone (20 g.l⁻¹), dextrose (20 g.l⁻¹) et d'extrait de levure (10 g.l⁻¹). Il permet la croissance des levures non transformées par le plasmide pYX212.

Le milieu minimum comprend du Yeast Nitrogen Base (sans sulfate d'ammonium ni acides aminés, Difco) (1,7 g.l⁻¹), du nitrate d'ammonium (6,4 g.l⁻¹ NH₄NO₃), du glucose (20 g.l⁻¹), et du succinate (50 mM). Son pH est ajusté à 4,3 par ajout de KOH 5N. Les acides aminés sont ajoutés dans les concentrations suivantes : leucine 60 mg.l⁻¹, méthionine 20 mg.l⁻¹. Le zinc est apporté sous forme de ZnSO₄ à partir d'une solution mère à 1 M. Ces milieux sont solidifiés par ajout d'agar (20 g.l⁻¹).

Chapitre 3

Techniques de biologie moléculaire

A. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Les réactions de polymérisation en chaîne sont effectuées dans 25 µl de milieu réactionnel contenant 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 7,8), 1% Triton X-100, 250 µM dNTP, 1 µM d'amorces, et 0,25 U de Taq polymérase (Extra-Pol, Eurobio ou Pfu, Promega). Les séquences des amorces sont données en Annexes. Les PCR sont réalisées sur l'automate "Mastercycler" (Eppendorf). La quantification des acides nucléiques est réalisée par spectrophotométrie à 260 nm.

B. Séparation des acides nucléiques par électrophorèse

Les acides nucléiques sont analysés après séparation par électrophorèse horizontale en gel d'agarose. La migration des échantillons d'ADN s'effectue dans un champ de 7 V.cm⁻¹, en présence de tampon TAE 0,5X. Un marqueur de taille migrant en parallèle (1Kb Plus DNA Ladder, GibcoBRL et 1Kb DNA Ladder, GibcoBRL) permet de déterminer la taille des acides nucléiques. La visualisation se fait grâce au bromure d'éthidium (BET), intercalant des acides nucléiques qui fluoresce sous un rayonnement ultraviolet (310 nm).

C. Extraction d'ADN à partir d'un gel d'agarose

Après avoir découpé sous rayonnement ultraviolet les bandes d'intérêt sur le gel, le fragment d'ADN est extrait de l'agarose conformément au protocole décrit dans la notice du système commercialisé par Qiagen (QIAquick gel extraction Kit, Qiagen). Son principe repose sur l'adsorption de l'ADN sur une matrice de silice.

D. Digestion par les enzymes de restriction

Les réactions sont effectuées à 37°C (sauf cas particulier) pendant 1 h 30 dans un volume final de 50 µl contenant de 500 ng à 1 µg d'ADN, 2 unités d'enzyme de restriction dans le tampon fourni par le fournisseur (Promega).

E. Ligations

Les ligations sont réalisées dans un volume final de 10 µl. Les ratios Insert / Plasmide varient en fonction de la ligation effectuée, de 3/1 à 10/1. Nous utilisons pour toutes les réactions la ligase « T4 DNA ligase » (3 unités par réaction) et le tampon « 2X Rapid Buffer » de Promega.

F. Préparation de bactéries électrocompétentes

Pour la préparation de bactéries électrocompétentes, une culture de bactéries de 500 ml (DO_{600nm} : 0,6) est centrifugée à 5000 g pendant 10 min, à 4°C. Le culot bactérien ainsi obtenu est remis en suspension par deux lavages successifs dans 250 ml d'eau stérile, puis un lavage dans 50 ml de glycérol 10%. Le dernier culot de centrifugation est repris dans 0,5 ml de glycérol 10%. Enfin les cellules sont aliquotées en microtube (50 µl par tube), puis congelées immédiatement dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

G. Transformation des bactéries par électroporation

Dans une cuve à électroporation (1 mm d'épaisseur) placée dans la glace, 1 μ l d'ADN plasmidique est ajouté à 50 μ l de bactéries électrocompétentes. La cuve est introduite dans l'électroporateur (Eppendorf) et une décharge est appliquée (1500 V, 25 μ F, 200 Ohms). Les bactéries sont immédiatement reprises dans 1 ml de milieu SOC et incubées à 37°C pendant 1 h, sous agitation légère, afin d'assurer l'expression du gène de résistance à l'antibiotique. Un aliquot de 100 μ l de cette culture est étalé sur milieu solide LB Agar contenant l'antibiotique de sélection approprié (pour l'ampicilline : 75 mg.l⁻¹).

H. Minipréparation d'ADN plasmidique

Les bactéries sont cultivées dans 6 ml de milieu LB liquide additionné d'antibiotique, pendant 16 heures à 37°C sous agitation. Deux stocks glycérol conservés à -80°C sont réalisés en additionnant, pour chacun, 500 μ l de glycérol (20% final) à 1 ml de la culture bactérienne. La préparation d'ADN plasmidique est réalisée à partir des 4 ml du volume de culture restant.

Les bactéries sont culottées par une centrifugation d'une minute à 14.500 rpm en microtube de 1,5 ml. Le plasmide est purifié grâce au système « GenElute Plasmid Miniprep Kit » (Sigma). Ce système est basé sur l'adsorption de l'ADN sur une résine et permet d'obtenir la qualité de plasmide nécessaire au séquençage (Génome Express).

Chapitre 4

Clonages

A. Construction de la banque d'ADNc

Les plantes utilisées pour construire la banque sont cultivées sur terreau pendant 3 mois, puis repotées avec de la terre toxique prélevée sur le site d'Auby (5.000 ppm de zinc, Bert *et al.*, 2000). Les feuilles de trois plantes sont récoltées après 8 jours, broyées dans de l'azote liquide et conservées à -80°C. Les ARN totaux sont extraits au Trizol[®] (solution monophasique de phénol et de guanidine isothiocyanate, Life Technologies) et leur intégrité est vérifiée par migration d'un aliquot (2 µg) sur gel d'agarose 1%. Les ARNm sont obtenus à partir des ARN totaux grâce au système « polyATtract mRNA isolation system IV » de Promega (Streptavidine Magnetic Sphere). La construction de la banque est réalisée à l'aide du système « cDNA Synthesis Kit » de Stratagène. Une amorce oligodT contenant un site XhoI a été utilisé pour initier la synthèse du premier brin ADNc. Les instructions du fournisseur ont été suivies, cependant certaines enzymes ont été remplacées par des enzymes plus concentrées : MMLV-RT à 200 U.µl⁻¹, RNaseH à 9,2 U.µl⁻¹, T4 DNA ligase à 20 U.µl⁻¹. De plus, la synthèse du 1^{er} brin, réalisée à partir de 5 µg d'ARNm, a été modifiée par rapport aux instructions du fournisseur : les ARN ont été dénaturés pendant 5 min à 70°C, avant d'être incubés pendant 1 h à 42°C. Des adaptateurs contenant un site EcoRI sont ligués aux ADNc qui sont ensuite digérés par les enzymes EcoRI / XhoI, afin de permettre un clonage orienté au niveau du site multiple de clonage du vecteur.

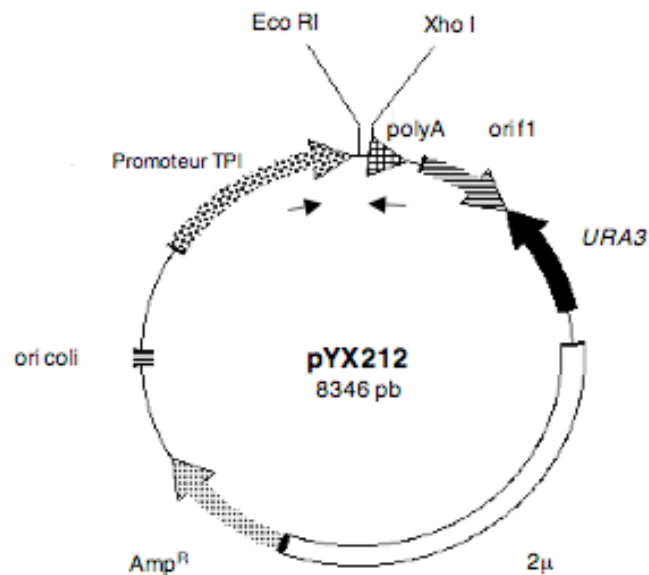


Figure II.1. Carte du plasmide pYX212 multicopie utilisé pour la construction de la banque d'ADNc.

Ce plasmide navette peut être répliqué dans la bactérie *E. coli* et dans la levure *S. cerevisiae* grâce aux deux origines de réplication (respectivement *ori coli* et *orif1*). La présence d'une partie du plasmide $2\ \mu\text{m}$ de levure (2μ) assure un grand nombre de copies. *Amp^R* indique un gène de résistance à l'ampicilline utilisé comme marqueur de sélection dans *E. coli* ; *URA3* est le gène qui confère l'autotrophie pour l'uracile chez *S. cerevisiae*. La présence du promoteur de la triose phosphate isomérase de levure (promoteur TPI) et de la séquence polyA permet l'expression de l'insert dans la levure. Au niveau du site multiple de clonage, seuls les sites de restriction des enzymes EcoRI et XhoI utilisés pour le clonage orienté de la banque sont donnés. Les flèches indiquent la position des amorces (appelées TPI et POLYA) utilisées pour l'amplification des inserts par PCR et pour le séquençage.

Cette banque a donc ensuite été clonée dans le vecteur pYX212 (Figure II.1). Ce plasmide possède deux origines de réplication lui permettant de se maintenir à la fois dans *E. coli* (*ori coli*) et dans la levure (2 μ). Il contient un gène de sélection bactérien qui confère la résistance à l'ampicilline (Amp^R), ainsi que le gène *URA3* assurant l'autotrophie vis-à-vis de l'uracile, permettant la sélection dans la levure. Ils seront exprimés sous le contrôle d'un promoteur fort et constitutif : promoteur de la triose-phosphate isomérase (TPI). La ligation entre les ADNc et le vecteur a été réalisée à 4°C pendant une nuit en présence de 200 ng d'ADNc, 1 μ g de plasmide digéré par XhoI et EcoRI et déphosphorylé, 1 μ l de tampon 10X et 1 μ l de ligase (400 U. μ l⁻¹). La banque d'ADNc a ensuite été amplifiée dans la souche XL1-Blue MRF' (*McrA*⁻ et *McrB*⁻) d'*E. coli*. Cette souche a été utilisée car elle ne dégrade pas les ADN méthylés. Après cette transformation, les bactéries ont été étalées sur un milieu LB contenant de l'ampicilline à une concentration de 75 μ g.ml⁻¹ et cultivées dans une étuve à 37°C jusqu'à la confluence des colonies. La surface des boîtes de Pétri a été raclée avec 5 ml de milieu LB, afin de mettre les colonies en suspension. Ce mélange a été centrifugé à 5.000 g pendant 5 min, afin de culotter les cellules. Après élimination du surnageant, le culot a été repris dans 15 ml de tampon (50 mM Tris-HCl, pH 7,5 ; 10 mM EDTA ; 100 μ g.ml⁻¹ RNase A), afin de procéder à une extraction des ADN plasmidiques.

Des aliquots marqués au [$\alpha^{32}P$] dATP et prélevés lors de la synthèse des premiers et deuxièmes brins sont déposés sur gel d'agarose 1%. Le gel est exposé contre un écran de PhosphorImager (Kodak) pendant 12 heures. La radioactivité est détectée grâce à un PhosphorImager (Molecular Dynamics).

B. Constructions *AhPDF1.1*mature et MF-*AhPDF1.1*

Le principe du clonage est illustré par la Figure II.2. D'une part, la séquence du « mating factor », appelée MF, a été amplifiée à partir de l'ADN génomique de levure WB2d, grâce aux amorces MF_{Eco} et MF_{HindXho} dans lesquelles des sites EcoRI et HindIII ont été introduits. Le produit PCR a été cloné dans le vecteur pGEMT. D'autre

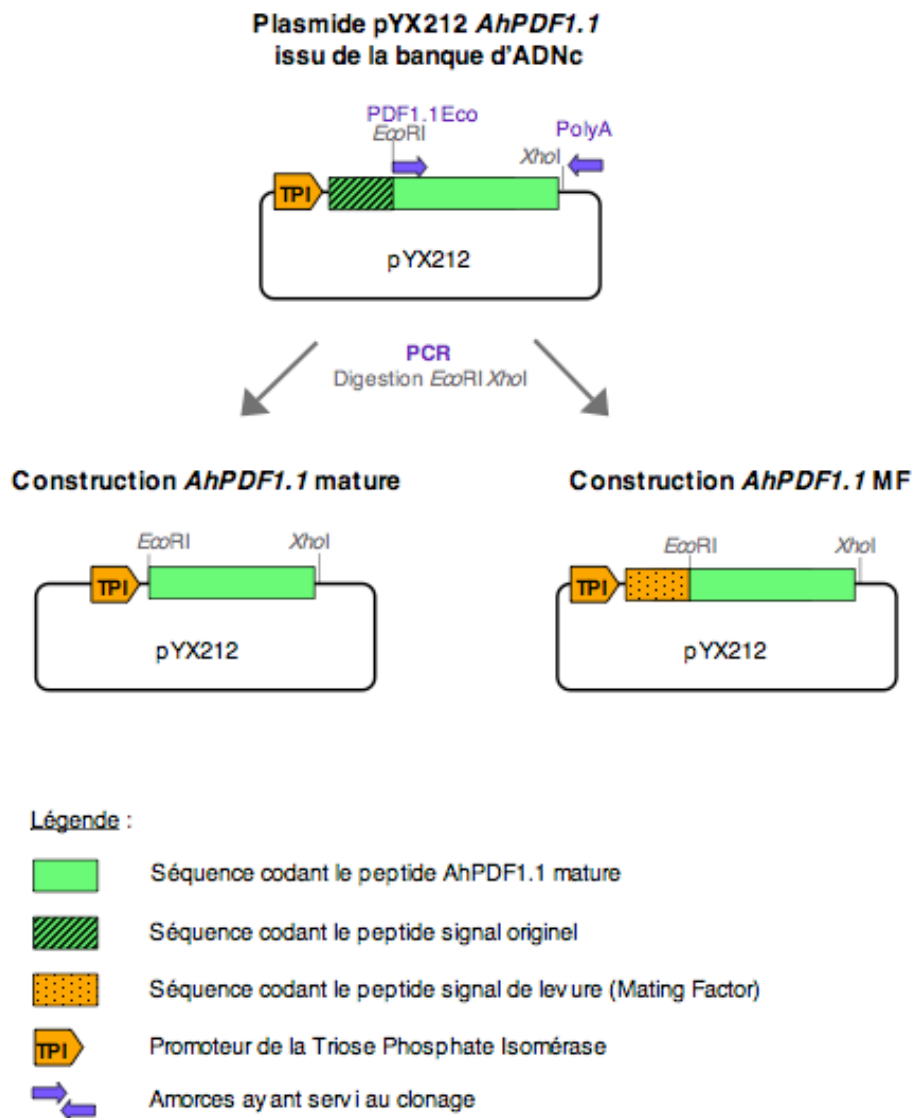


Figure 11.2. Représentation schématique de la stratégie de clonage de la séquence *AhPDF1.1* mature et *AhPDF1.1* MF dans le plasmide pXY212.

La séquence codant la partie mature de la protéine *AhPDF1.1* est amplifiée à partir du plasmide de la banque d'ADNc d'*A. halleri* isolé lors du criblage. En 5' l'amorce choisie est située sur l'ADNc (*PDF1.11 Eco*), elle contient un site *EcoRI* et un codon ATG pour insérer une méthionine, assurant la traduction du peptide mature. En 3' l'amorce est située sur le plasmide (*PolyA*). Le produit PCR obtenu est sous-cloné dans le plasmide pGEMT puis cette construction est digérée par les enzymes *EcoRI* et *XhoI* et clonée à nouveau dans le plasmide pYX212 (construction *AhPDF1.1* mature). La même stratégie a été utilisée pour obtenir la construction *AhPDF1.1* MF, sans insertion de codon ATG. Le produit PCR digéré est cloné dans le plasmide pYX212 contenant la séquence du peptide signal issu du gène de *S. cerevisiae* codant le mating factor.

part, la séquence *AhPDF1.1* mature, a été amplifiée grâce aux amorces MFAFP1 et PolyA à partir du plasmide pYX212::*AhPDF1.1*. Cette cassette *AhPDF1.1* mature de 360 pb a également été clonée dans le vecteur pGEMT. Le plasmide pGEMT contenant la séquence *AhPDF1.1* mature a été linéarisé par HindIII tandis que le plasmide pGEMT::MF a été digéré par EcoRI et HindIII. Ces deux fragments d'ADN ont ensuite été fusionnés au niveau de leurs extrémités cohésives HindIII grâce à la T4 DNA ligase. Par PCR sur le produit de ligation, et avec les amorces MFEco et M13, la construction *MF-AhPDF1.1* (634 pb) a été amplifiée. Elle a alors été clonée dans le vecteur pGEMT et la construction a été séquencée. La séquence *MF-AhPDF1.1* est clonée de façon orientée grâce à la digestion par des enzymes de restriction (EcoRI et XhoI) dans le plasmide pYX212. Ce vecteur est utilisé pour permettre l'expression des protéines MF-AhPDF1.1 dans *S. cerevisiae*.

C. Construction de la cassette p35S::*AhPDF1.1*::t35S

Le clonage comporte deux étapes : (i) clonage de l'ADNc *AhPDF1.1* dans le plasmide pJIT62 en aval du promoteur 35S (promoteur fort et constitutif, issu du gène codant l'ARN35S du virus de la mosaïque du chou-fleur) formant ainsi la cassette p35S::*AhPDF1.1*::t35S ; (ii) clonage de cette cassette dans le plasmide binaire pGreen0029 (Hellens *et al.*, 2000) au niveau du site multiple de clonage contenu dans l'ADN-T.

La séquence codante de l'ADNc *AhPDF1.1* a été amplifiée par PCR à partir d'une amorce spécifique de l'ADNc contenant un site EcoRI (AFPSTOP) et d'une amorce du vecteur (TPI) (données en Annexes). Le produit PCR purifié sur gel d'agarose a été digéré par l'enzyme de restriction EcoRI. Il a ensuite été cloné au site unique EcoRI du plasmide pJIT62, en aval du promoteur 35S et en amont du terminateur 35S (t35S). Ce clonage non orienté permet une insertion en orientation sens ou anti-sens de l'ADNc par rapport au promoteur. Le plasmide pJIT62 est un vecteur

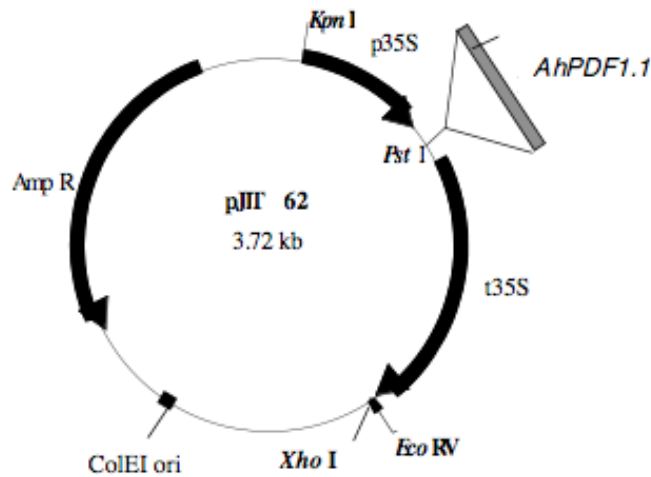


Figure II.3. Carte du plasmide pJIT62 permettant la construction de la cassette pCaMV35S::AhPDF1.1::tCaMV35S.

AmpR correspond au gène de résistance à l'ampicilline (marqueur de sélection bactérien). Ce plasmide provient du John Innes Center (JIC, Angleterre); p35S et t35S correspondent respectivement au promoteur et au terminateur CaMV35S.

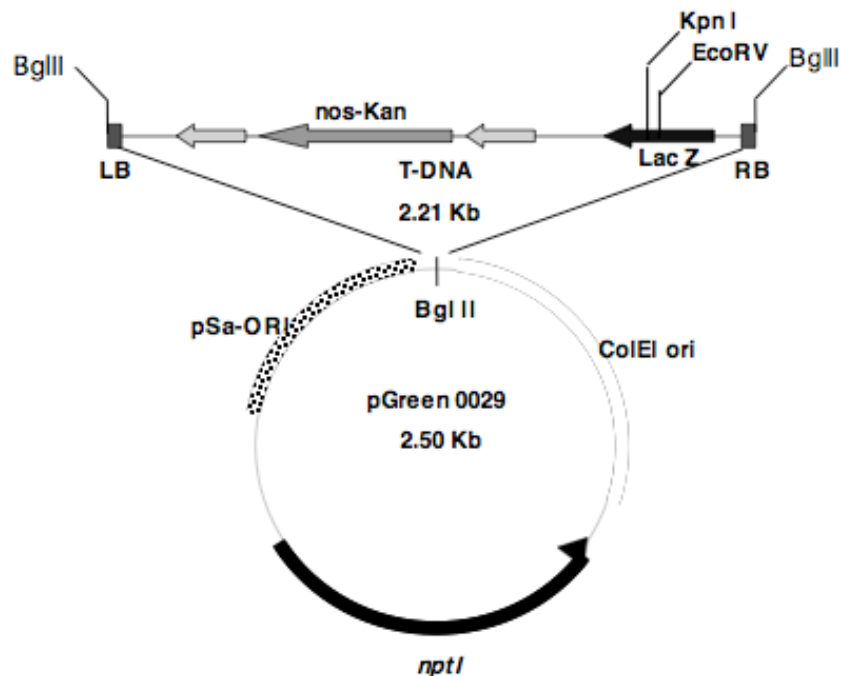


Figure II.4. Carte du plasmide binaire pGreen0029 permettant le clonage de la construction pCaMV35S::AhPDF1.1::tCaMV35S.

PSa-ORI et ColEI ori correspondent à l'origine de répliation dans *A. tumefaciens* et dans *E. coli*, respectivement ; *nptII* correspond au gène de résistance à la kanamycine, (marqueur de sélection bactérien), *nptII* correspond au gène de résistance à la kanamycine, (marqueur de sélection dans les plantes). Ce plasmide provient du John Innes Center (Angleterre).

intermédiaire d'expression dans *E. coli* permettant d'obtenir la cassette p35S::*AhPDF1.1*::t35S par digestion KpnI et EcoRV. La détermination de l'orientation de la construction (sens ou anti-sens) est effectuée par analyse des profils de restriction.

Après digestion par les enzymes de restriction KpnI et EcoRV, la cassette p35S::*AhPDF1.1*::t35S a été purifiée sur gel d'agarose puis insérée aux sites KpnI et EcoRV de l'ADN-T du plasmide pGreen0029 (Hellens *et al.*, 2000). Ces sites de restriction sont localisés dans le gène *lacZ*, permettant une sélection des clonages effectifs par un crible blanc/bleu sur un milieu contenant de l'IPTG et de l'X-gal. Le séquençage de la construction a permis de vérifier qu'aucune mutation n'avait été introduite durant ce clonage.

Chapitre 5

Manipulations des levures

A. Transformation des levures

La souche BY4741 de *S. cerevisiae* a été transformée par la méthode utilisant de l'acétate de lithium (Gietz and Schiestl, 1991). Une culture de 50 ml de levures en phase exponentielle de croissance ($DO_{600nm} = 0,7$) dans du milieu YPD est centrifugée à 3000 g pendant 5 min, puis le culot est repris dans 25 ml d'eau stérile et centrifugé à nouveau. Les cellules sont alors reprises dans 1 ml d'acétate de lithium à 100 mM afin de fragiliser les membranes, puis centrifugées quelques secondes et concentrées dans 400 μ l d'acétate de lithium 100 mM. Ces cellules compétentes sont aliquotées en microtube par 50 μ l et le mélange de transformation suivant est ajouté (dans l'ordre) : 240 μ l de PEG 3350 (50%), 36 μ l d'acétate de lithium 1 M, 75 μ l d'ADN de sperme de saumon (2 g.l⁻¹) préalablement dénaturé 5 min à 95°C, et 1 μ g de préparation plasmidique d'ADN. Après avoir été rapidement homogénéisé, le mélange est incubé à 30°C pendant 30 min, puis un choc thermique à 42°C est appliqué durant 30 min. Après une brève centrifugation, le surnageant est enlevé et les cellules sont reprises délicatement dans 1 ml d'eau stérile. Enfin la totalité, ou un aliquot, de ces cellules transformées est étalée sur du milieu minimum solide additionné de leucine et de méthionine mais sans uracile afin de sélectionner les transformants. La croissance en étuve (à 30°C) dure 2 jours. Dans nos conditions, cette méthode permet d'obtenir jusqu'à $1,4 \cdot 10^6$ transformants par μ g d'ADN plasmidique.

B. Extraction d'ADN plasmidique de levure

Une culture de levure de 1,5 ml, inoculée à partir d'une seule colonie dans du milieu minimum, est incubée à 30°C jusqu'en phase stationnaire. Les cellules sont récupérées par une centrifugation de 30 s à 13.000 g, puis remises en suspension dans 200 µl de tampon de lyse (2% (v/v) Triton X-100 ; 1% (p/v) SDS ; 100 mM NaCl ; 10 mM Tris-HCl pH 8 ; 1 mM EDTA pH 8) additionné de 200 µl de phénol/chloroforme. Après l'ajout de 0,3 g de billes de zirconium (0,5 mm de diamètre), le mélange est agité au vortex pendant 2 min, puis centrifugé pendant 2 min à 13000 g. La phase aqueuse, contenant le plasmide, est récupérée et traitée au phénol/chloroforme puis au chloroforme. L'ADN plasmidique purifié est utilisé pour la transformation d'*E. coli*.

C. Test en gouttes de la croissance des levures

Une colonie isolée de levure transformée est inoculée dans 2 ml de milieu de culture liquide sélectif (sans uracile afin de maintenir la pression de sélection sur le plasmide). Lorsque la DO_{600nm} de la culture atteint 2, des dilutions en série (d'un facteur 5) sont effectuées avec du milieu sélectif. Pour chaque dilution, 10 µl sont déposés sur milieu gélosé sans uracile et contenant une concentration toxique de zinc ou d'un autre métal. La quantification des dilutions est appréciée sur une boîte de milieu sélectif sans zinc. Pour chaque transformation de levure, au moins quatre colonies, issues de transformations indépendantes, sont testées. Par souci de clarté, seule une colonie représentative est généralement présentée dans les figures de tests gouttes.

D. Minéralisation des levures pour le dosage du zinc

Les levures ont été cultivées en milieu liquide sélectif en présence de différentes concentrations jusqu'à une DO_{600nm} égale à 1. Les levures ont été récupérées par centrifugation (5.000 g, 10 min à 4°C) puis les culots ont été lavés en présence de 50 mM d'EDTA (15 min, 4°C) puis en présence d'eau ultra-pure (Millipore), pendant 15

min à 4°C. Les culots ont ensuite été pesés à la balance de précision puis minéralisés à l'acide nitrique 69% pendant 1 heure à 150°C. Le dosage est décrit dans le paragraphe « dosage du zinc ».

Chapitre 6

Obtention et étude des plantes transgéniques

A. Transformation des agrobactéries

Le plasmide pGreen0029 contenant la construction p35S::*AhPDF1.1*::t35S est introduit dans la souche GV3101::pMP90 d'*Agrobacterium tumefaciens* par électroporation. Les bactéries transformées sont sélectionnées sur milieu LB additionné de rifampicine (50 mg.l⁻¹), gentamycine (50 mg.l⁻¹) et kanamycine (100 mg.l⁻¹).

B. Transformation des plantes

Les plantes d'*A. thaliana* écotype Col-0, destinées à la transformation, ont été cultivées en terreau pendant 1 mois jusqu'à l'obtention de hampes florales de 20 cm de hauteur. Ces plantes ont ensuite été transformées par la méthode d'infiltration des hampes florales ou «*floral dip*» (Clough and Bent, 1998). Les hampes florales sont trempées dans une culture d'*A. tumefaciens* contenant 0,05% de Silwett L-77 et 0,8% (p/v) de saccharose. Les plantes sont ensuite placées pendant 24 heures dans le noir et recouvertes d'un sachet plastique pour maintenir une hygrométrie élevée. Après 24 heures, le sachet plastique est ôté et les plantes sont remises en culture dans les conditions normales.

C. Obtention de lignées homozygotes mono-insertionnelles

Après récolte, les graines de la génération T0 sont sélectionnées *in vitro* sur un milieu MS/2 additionné de kanamycine (100 mg.l⁻¹). Les plantules qui résistent à l'antibiotique sont transférées sur terreau afin d'être autofécondées pour obtenir la génération T1. Un test de χ^2 mené sur la génération T1 permet de sélectionner les lignées mono-insertionnelles qui sont amenées à la génération T2. Les lots de graines montrant 100% de résistance sur kanamycine sont issus de plantes homozygotes et conservés pour les études phénotypiques.

D. Pesée de la matière sèche

Les parties aériennes des plantes, après récolte, sont placées dans une étuve à 80°C pendant 3 jours, puis pesées individuellement ou en lots à la balance de précision.

Chapitre 7

Dosage des métaux

A. Dosage du zinc dans les plantes par le Zincon®

Le zincon® (acide 2-hydroxy-5-sulphonyl azobenzylidène hydrazinobenzoïque, Sigma) réagit avec le zinc en formant un complexe bleu dont l'absorption peut être mesurée au spectrophotomètre. La technique a été adaptée de Macnair et Smirnoff (1999). Un échantillon de 40 mg de matériel végétal est prélevé et broyé dans 500 µl d'acide sulfosalicylique à 2%. Après 12 heures d'incubation à température ambiante, le mélange est rapidement centrifugé pour éliminer les restes de tissus. Vingt microlitres de surnageant sont prélevés et ajoutés à 780 µl de tampon (6,2 g.l⁻¹ d'acide borique, 7,5 g.l⁻¹ de KCl, pH 9,6) et à 200 µl de solution de zincon® (120 mg.l⁻¹, Sigma). La densité optique à 606 nm est lue après une minute d'incubation. Une gamme étalon est établie à partir de solutions de ZnSO₄ de concentrations connues (0 à 4 mM).

B. Dosage des métaux dans les plantes par spectrophotométrie de flamme

Après séchage pendant 3 jours à 80°C, les échantillons (50 mg de matière sèche au maximum) sont minéralisés avec 1 ml d'HNO₃ 69% pendant 1 heure à 250°C. Les échantillons sont ensuite dilués 10 fois avec de l'eau ultra-pure (Millipore). Le zinc et le nickel présents dans les échantillons minéralisés sont dosés à l'aide d'un spectromètre d'absorption atomique (SpectrAA220).

C. Dosage du zinc dans la levure par ICP-MS

Pour le dosage par ICP-MS, 1 ml de minéralisat de levure (décrit précédemment) est mélangé à 8,9 ml d'eau ultra-pure et à 0,1 ml d'indium (contrôle interne). Les éléments présents dans ce mélange sont dosés par ICP-MS (VG PlasmaQuad, Université Montpellier II).

Chapitre 8

Analyse de l'expression des défensines

A. Analyse de l'accumulation des transcrits de défensines

A.1. Expérience de Northern blot

Les ARN ont été extraits à l'aide de Trizol[®]. Dix μg d'ARN totaux sont dénaturés à l'aide de formamide (50%) et déposés en gel d'agarose 1%, MOPS-Formaldéhyde 1,2%. Après électrophorèse, ils sont transférés par capillarité sur une membrane (Hybond N+, Amersham) en présence de 20X SSC durant une nuit. Les ARN sont fixés sur la membrane par incubation de celle-ci à 80°C pendant 1 heure. Les ARN sont colorés par incubation de la membrane avec une solution de bleu de méthylène 0,02%, NaOAC 0,3 M pH 5,5 pendant 3 min. La décoloration se fait par incubation dans une solution SSC 0,2X, SDS 1% pendant 15 min.

La membrane est préhybridée dans du tampon de préhybridation (50% Formamide ; 5X SSC ; 5X Denhardt's ; 0,5% SDS ; ADN de sperme de saumon dénaturé 500 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), pendant 1 h à 42°C. Le tampon de préhybridation est ensuite remplacé par du tampon d'hybridation (50% Formamide ; 5X SSC ; 1X Denhardt's ; 0,5% SDS ; ADN de sperme de saumon dénaturé 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$). La sonde est préparée à l'aide du système « Ready-To-Go DNA Labelling Beads » (Amersham) et marquée au [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP. Elle est ensuite dénaturée 10 min à 95°C, puis ajoutée au milieu d'hybridation. Après une nuit d'hybridation à 42°C, la membrane est lavée deux fois à température ambiante dans une solution de 1X SSC, 0,1% SDS pendant 15 min, puis deux fois à 42°C dans une solution de 0,1X SSC, 0,1% SDS. Deux lavages supplémentaires de 10 min sont effectués dans du 1X SSC, 0,1% SDS à 42°C. La membrane est alors appliquée contre un écran de PhosphorImager (Molecular

Dynamics) pendant une nuit. Les signaux sont détectés à l'aide d'un PhosphorImager (BAS) et analysés à l'aide du logiciel ImageQuant (Molecular Dynamics).

A.2. RT-PCR

Le premier brin d'ADNc est synthétisé à partir de 1 µg d'ARN totaux (préalablement traités à la DNase - RQ1 DNase, Promega) en présence de l'amorce oligo(dT)₁₂₋₁₈ et de la transcriptase inverse (Superscript II RNase-H reverse transcriptase, Invitrogen). La réaction est incubée pendant 1 heure à 42°C. Les amorces sont choisies de façon à amplifier spécifiquement un des 4 ADNc *AhPDF1*. La position de ces amorces ainsi que leurs séquences sont données en Annexes. Ces amorces ont été validées par PCR en utilisant de l'ADN génomique d'*A. halleri* comme matrice. Les réactions de PCR sont réalisées dans un volume de 50 µl, en présence de 0,5 mM dNTP, 5 mM MgCl₂, 0,3 µM d'amorces et 0,5 U de Taq polymérase (Invitrogen). Le choix du nombre de cycles varie en fonction du niveau d'expression, et est déterminé de façon à ne pas être à saturation. Le niveau d'expression de l'actine est utilisé comme standard interne (Cf. séquences des amorces en Annexes). Les produits d'amplification sont visualisés après migration en gel d'électrophorèse à 2% d'agarose.

B. Immunodétection des défensines

Les compositions des solutions utilisées pour les analyses de protéines sont données dans le tableau II.1.

B.1. Extraction et dosage des protéines

Deux volumes de tampon d'extraction sont ajoutés à un volume de matériel végétal auparavant broyé dans l'azote liquide. Le mélange est ensuite homogénéisé à l'ultrathurax (T25basic, IKA Labortechnik) pendant 1 min à vitesse maximale, puis

incubé 1 heure à 4°C. Après une centrifugation à 13.000 g pendant 15 min à 4°C, le culot est repris dans du tampon Laemmli 1X (Laemmli, 1970). Les protéines totales sont dosées selon la méthode décrite par Bradford (Bradford, 1976).

B.2. Expérience de western blot

Les expériences de western blot ont été réalisées grâce à l'utilisation d'un sérum dirigé contre une défensine de radis (RsAFP2), fourni par le laboratoire du Pr. Cammue (Leuven, Belgique).

Les protéines sont séparées par électrophorèse SDS-PAGE. Un gel Tris-tricine de SDS-polyacrylamide 10-18% est choisi de façon à visualiser les protéines de faible poids moléculaire. Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane nitrocellulose de 0,2 µm (Sartorius) grâce à un transfert électrique semi-sec (Owl), en suivant les instructions du fournisseur. La membrane est ensuite séchée à l'air afin d'augmenter la fixation des petites protéines, puis fixée par un traitement glutaraldéhyde (12,5%). Le blocage de la membrane est réalisé pendant une heure à température ambiante dans du tampon PBS-Tween additionné de 5% de lait en poudre. La membrane est ensuite lavée 3 fois pendant 10 minutes dans du tampon PBS-Tween. La membrane est incubée pendant 1 h à température ambiante avec le premier anticorps : de l'anti-sérum anti-RsAFP2 de lapin dilué au 1:800^e dans du tampon PBS-Tween. Après 3 lavages de 10 minutes dans du tampon PBS-Tween, la membrane est incubée pendant 1 h à température ambiante avec le deuxième anticorps : anticorps anti-lapin couplé à la peroxydase (Sigma) dilué au 1/5000^{ème} dans du tampon PBS-Tween. Après 3 lavages de 15 minutes dans du tampon PBS-Tween, la membrane est révélée par

Solutions	Compositions
Tampon d'extraction	9,6 mM NaH ₂ PO ₄ ; 15,2 mM Na ₂ HPO ₄ ; 100 mM KCl; 150 mM NaCl ; pH 7
Tampon PBS-Tween	140 mM NaCl ; 2,7 mM KCl ; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4 ; 0,1% (v/v) Tween20
Tampon de fixation*	1,59 g.l ⁻¹ Na ₂ CO ₃ ; 2,93 g.l ⁻¹ NaHCO ₃ ; pH 9,6
Tampon de blocage*	Tampon PBS ; 3% (p/v) gélatine (Sigma)
Tampon de dilution*	10% (v/v) tampon de blocage ; 0,05% (v/v) Tween20
Tampon du substrat*	1,95 g.l ⁻¹ Na ₂ CO ₃ ; 2,93 g.l ⁻¹ NaHCO ₃ ; 0,1 g.l ⁻¹ MgCl ₂ .6H ₂ O ; pH 9,6

Tableau II.1. Compositions des solutions utilisées pour les analyses de protéines.
Les astérisques indiquent les solutions utilisées spécifiquement dans les test ELISA.

l'incubation dans le substrat de la peroxydase (3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochlorure en tablettes, Sigma).

B.3. Empreintes sur tissus

Les feuilles sont pressées sur une membrane de nitrocellulose qui est ensuite traitée de la même manière qu'un western blot.

B.4. Tests ELISA

Les tests ELISA ont été réalisés dans le laboratoire du Pr Cammue, Université Catholique de Leuven, Belgique. La technique employée est un test immunologique de type compétitif, grâce à l'utilisation de la protéine Rs-AFP2 purifiée et du sérum de lapin obtenu par immunisation avec la protéine RsAFP2 (Terras *et al.*, 1992). Les compositions des solutions utilisées sont données dans le tableau II.1. Les tests sont réalisés à partir de parties aériennes de plantes lyophilisées.

Pour chaque échantillon, 50 mg (environ) de matériel végétal lyophilisé sont mis en présence de 600 µl de tampon d'extraction et de 5-6 billes de verre pour faciliter le broyage. Le matériel est broyé par deux passages d'une minute chacun dans un vibrobroyeur. Après centrifugation (10 min, 13.000 g), le surnageant contenant les protéines solubles dans le tampon d'extraction est récupéré. Les tests ELISA sont réalisés en microplaque de 96 puits (Greiner). Toutes les incubations sont réalisées pendant 2 heures chacune à 37°C, et en conditions saturantes d'humidité. La protéine RsAFP2 purifiée est diluée dans le tampon de fixation (100 ng.ml⁻¹), puis 100 µl sont déposés par puits. Après incubation, la plaque est lavée 1 fois au PBS-Tween. Les sites aspécifiques de la plaque sont bloqués par incubation de la plaque en présence de 200 µl de tampon de blocage par puits. Pour chaque extrait ainsi que pour le standard RsAFP2, une série de 6 dilutions (dans le tampon de dilution) est effectuée afin de se placer dans une gamme de concentrations protéiques ne présentant pas de déviation lors du test ELISA. Pour l'incubation avec l'anticorps primaire, 50 µl de chaque dilution d'extrait

ou de protéine purifiée RsAFP2 et 50 μl de sérum anti-RsAFP2 (1:500, dilué dans le tampon de dilution) sont déposés dans chaque puits. Après incubation, la plaque est lavée 3 fois au PBS-Tween. L'anticorps secondaire (Sigma) est dilué (1:1000, tampon de dilution) puis 100 μl sont déposés par puits. Après incubation, la plaque est lavée 3 fois au PBS-Tween. Pour la révélation de l'activité enzymatique, 100 μl de 4-nitrophényl phosphate (1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) dilué dans le tampon du substrat sont déposés par puits. La DO de la plaque est lue à 405 nm. Chaque test est réalisé deux fois de façon indépendante sur chaque extrait.

B.5. Immunolocalisation

Des feuilles et des fleurs d'*A. halleri* ont été récoltées à partir de plantes âgées de 8 semaines et cultivées en hydroponie. Les tissus sont fixés par un traitement au paraformaldéhyde (4%) dans du tampon PBS sous vide léger pendant 1 heure, puis rincées dans du tampon PBS pendant 1 heure. Ces tissus fixés sont ensuite pris dans des blocks d'agarose-PBS (3,5% agarose). Ces blocks sont coupés en lamelles de 50 μm d'épaisseur en moyenne, grâce à un vibratome (Microm HM650V), en immersion dans du tampon PBS. Les coupes de tissus, débarrassées de l'agarose, sont délicatement récupérées à l'aide d'un pinceau puis déposées dans des cupules (100 μl) afin de subir les traitements immunologiques comme suit, dans des conditions d'hygrométrie maximale. Les coupes sont incubées pendant 1 h 30 dans une solution de PBS contenant 1% de BSA, afin de bloquer les sites aspécifiques. L'incubation avec le sérum anti-RsAFP2 de lapin (dilution 1:500) est réalisée pendant 1 nuit à 4°C puis est suivie de quatre lavages de 15 minutes chacun dans du PBS-Tween. L'incubation avec le second anticorps anti-lapin couplé au marqueur fluorescent Alexa 488 (Molecular Probe, dilution 1:1000) est réalisée à l'obscurité, pendant 1 heure à température ambiante. Trois lavages (de 15 minutes chacun) dans du PBS-Tween sont effectués, toujours à l'obscurité afin de ne pas atténuer la fluorescence du marqueur. Le montage des coupes entre lame et lamelle et l'observation au microscope confocal (Zeiss LSM 510 meta, CRBM, Montpellier) sont réalisées dans la journée. Après excitation au laser (488 nm) les images analysées proviennent de deux canaux, le premier canal permettant de

collecter la fluorescence du fluorochrome (Alexa 488) couplé à l'anticorps secondaire (canal 1 : BP 505-530 nm), le second permettant de collecter l'émission de la chlorophylle (canal 2, BP : 545-560 nm).

Chapitre 9

Outils d'analyse bioinformatique

Les séquences obtenues (Génome Express, Grenoble) à partir des plasmides isolés ont été comparées aux séquences des banques de données en utilisant le logiciel BLAST (Altschul *et al.*, 1990). L'alignement a été réalisé grâce aux programmes MULTALIN (Corpet, 1988) CLUSTALW et BOXSHADE (Thompson *et al.*, 1994). L'arbre phylogénique a été réalisé à partir des alignements obtenus grâce au programme CLUSTALX 1.82, en utilisant la méthode de Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987). L'arbre a été dessiné en utilisant le logiciel « Unrooted software » (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/unrooted.html>).

Troisième Partie

Résultats

Avant-propos

Le premier chapitre de résultats développe les conditions du criblage ainsi que la caractérisation du phénotype des levures exprimant ces défensines.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu déterminer la fonction du gène dans la plante. Des plantes transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* surexprimant un de ces ADNc ont été obtenues. Ces plantes montrent une tolérance accrue vis-à-vis du zinc. L'analyse de ces plantes fait l'objet du second chapitre.

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'expression des gènes de défensines chez *A. halleri*, au niveau transcriptionnel et également protéique, qui sera abordée dans le troisième chapitre.

Un manuscrit pour publication et qui présente les principaux résultats du travail de thèse est présenté en Annexes.

Chapitre 1

Recherche d'ADNc d'*Arabidopsis halleri* conférant une tolérance au zinc à la levure

Préambule

Arabidopsis halleri est une espèce tolérante et hyperaccumulatrice de zinc. Sa tolérance au zinc s'exprime au niveau cellulaire. En effet, la viabilité des protoplastes de feuilles de cette espèce n'est pas affectée par des concentrations de zinc qui sont létales pour des protoplastes d'*Arabidopsis lyrata*, espèce proche mais non tolérante au zinc (Marquès *et al.*, 2004). Ces résultats indiquent qu'au moins certains des déterminants de la tolérance au zinc s'expriment au niveau cellulaire, et ce, dans les parties aériennes. Ceci rend possible une approche en système unicellulaire, et la levure *S. cerevisiae* a été choisie afin de réaliser une banque d'expression des ADNc issus de feuilles d'*A. halleri*. Les levures ainsi transformées ont été sélectionnées pour leur capacité à croître sur un milieu contenant une concentration toxique en zinc. Ce chapitre détaille les conditions de criblage et la caractérisation des séquences d'ADNc ainsi obtenues.

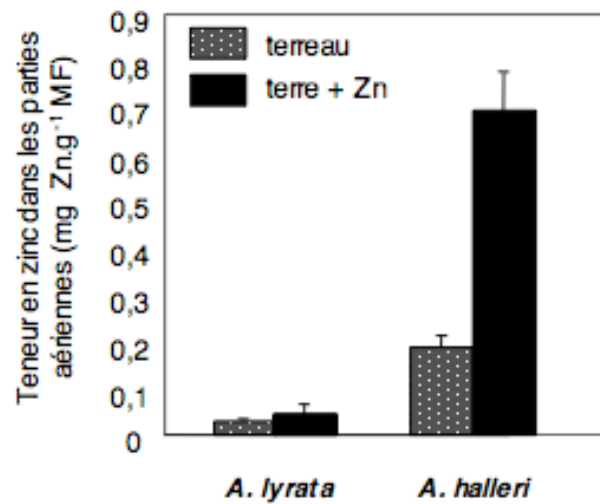


Figure III.1. Dosage de la teneur en zinc dans les parties aériennes d'*A. lyrata* et *A. halleri* cultivées sur terreau ou sur terre contaminée en zinc.

Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 3 mois puis repotées en terreau ou en terre naturellement contaminée en zinc (terre + Zn, 5000 ppm Zn). Après une semaine, les teneurs en zinc des parties aériennes sont déterminées grâce à un dosage spectrophotométrique utilisant le zincon. Ces teneurs sont exprimées en mg de zinc par g de matière fraîche (MF). Les valeurs représentent la moyenne et les écart-types de 3 dosages réalisés chacun sur une plante.

A. Étapes préliminaires au criblage sur zinc de la banque d'expression d'*A. halleri*

A.1. Choix du matériel de départ pour la construction de la banque d'ADNc d'*A. halleri*

Pour la construction de la banque d'ADNc, nous disposions de plantes d'*A. halleri* qui avaient été prélevées directement sur le site d'origine de cette population (site d'Auby, 5.000 ppm de zinc, Bert *et al.*, 2000), puis cultivées sur terreau pendant trois mois. Comme nous souhaitions assurer la représentativité dans la banque d'ADNc de gènes dont l'expression serait éventuellement induite par la présence de zinc, nous avons rempoté trois plants d'*A. halleri* sur la terre fortement contaminée en zinc provenant du site d'origine des plants. Après huit jours de culture sur terre contaminée en zinc, la teneur en zinc des parties aériennes a été analysée. Les résultats montrent que les parties aériennes de plants d'*A. halleri* cultivés sur terre toxique ont accumulé 3,7 fois plus de zinc ($0,69 \pm 0,08$ mg Zn.g⁻¹ MF) que celle des plants témoins rempotés sur terreau ($0,19 \pm 0,02$ mg Zn.g⁻¹ MF) (Figure III.1). À titre de comparaison, des plantes d'*A. lyrata*, espèce proche mais non hyperaccumulatrice de zinc, ont été cultivées dans les mêmes conditions. On n'observe pas de différence d'accumulation similaire chez *A. lyrata* ($0,03 \pm 0,01$ mg Zn.g⁻¹ MF sur terreau, contre $0,04 \pm 0,02$ mg Zn.g⁻¹ MF sur terre contaminée en zinc).

Les parties aériennes des 3 plants d'*A. halleri* cultivés sur terre contaminée en zinc ont été choisies comme matériel de départ pour la construction de la banque d'ADNc d'*A. halleri*.

A.2. Construction de la banque d'ADNc d'*A. halleri*

Les parties aériennes des trois plantes d'*A. halleri* transplantées sur terre contaminée en zinc ont servi à l'extraction d'ARN messagers. Les ADNc provenant de

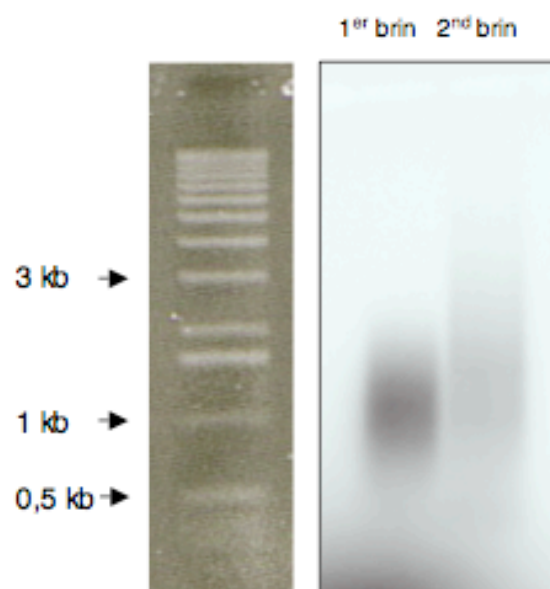


Figure III.2. Estimation de la taille des premiers et seconds brins d'ADNc synthétisés lors de la construction de la banque de feuilles d'*A. halleri*.

Pour chaque brin un aliquot de 5 μ l marqué au [α^{32} P] dATP est déposé sur un gel d'agarose 1%. La radioactivité est détectée grâce à un Phosphorimager (Molecular Dynamics). Les tailles du marqueur d'ADN sont indiquées.

la transcription inverse de ces ARNm ont été clonés dans le vecteur pYX212 (Cf. Figure II.1). Ce vecteur est qualifié de vecteur navette car il possède des origines de réplication dans la levure *S. cerevisiae* (2μ) et dans *E. coli* (*ori coli*). Il permet également l'expression dans la levure. Les ADNc sont clonés de façon orientée au niveau du site multiple de clonage, sous le contrôle du promoteur de la triose-phosphate isomérase de levure (promoteur fort et constitutif). Enfin, ce vecteur possède le gène *URA3* qui permet la sélection des transformants sur un milieu sans uracile.

L'estimation de la taille des ADNc a été réalisée par incorporation de [αP^{32}] dATP au cours de la construction de la banque. Après migration puis exposition, nous observons que la distribution des ADNc se fait suivant une gamme allant de 0,3 à 4 kb. La taille moyenne des ADNc est estimée à 1,2 kb (Figure III.2).

La banque d'*A. halleri* a été transformée pour amplification dans *E. coli* ; 350.000 transformants individuels ont ainsi été obtenus. Cette banque d'ADNc a ensuite été utilisée pour la transformation de la levure *S. cerevisiae*. La souche BY4741his⁺ de *S. cerevisiae* a été choisie pour son autotrophie pour l'histidine, afin d'éviter l'ajout d'histidine, acide aminé chélateur de zinc, dans le milieu. Les levures ont également été transformées par le plasmide pYX212 sans insert afin de servir de contrôle.

A.3. Test de sensibilité au zinc de la souche de levure

Avant de commencer le criblage des levures transformées par la banque d'ADNc sur milieu enrichi en zinc, nous avons déterminé la sensibilité de la souche BY4741his⁺ vis-à-vis du zinc. Dans ce but, le test de croissance en gouttes a été réalisé. Ce test consiste à cultiver les levures en milieu liquide jusqu'à l'obtention d'une même densité optique ($DO_{600nm}=1$), puis à déposer des gouttes de 10 μ l provenant de dilutions successives de la culture liquide sur un milieu de culture solide. La croissance des colonies issues de ces gouttes de culture est estimée visuellement. Ce test rapide permet

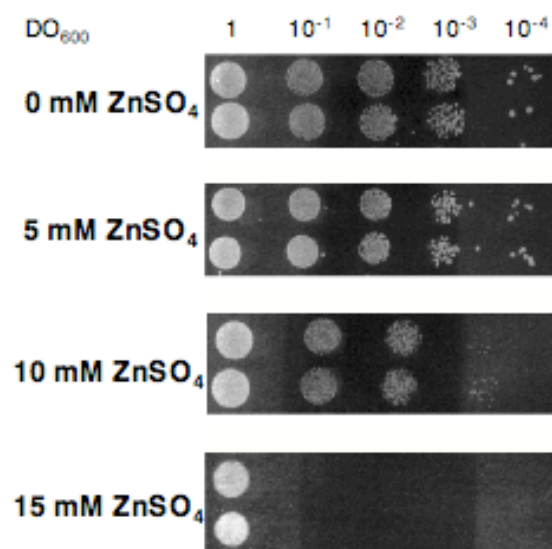


Figure III.3. Phénotype de résistance au zinc de la souche de levure BY4741his+ transformée par le plasmide pYX212.

Dix microlitres de dilutions en série (d'un facteur 10) effectuées à partir d'une culture liquide de DO_{600nm} égale à 1 sont déposés sur un milieu minimum sélectif (sans uracile) contenant différentes concentrations de zinc. L'expérience est répétée avec des levures préparées à partir de deux cultures liquides indépendantes. La croissance est montrée après 72 heures de culture à 30°C.

de simuler sur une même boîte de Pétri la croissance de plusieurs étalements, de la taille d'une goutte, de cultures de levure de différentes densités optiques.

La croissance de la souche de levure BY4741his⁺ transformée par le plasmide pYX212 sans insert a ainsi été testée. Les gouttes de cultures de levures sont déposées sur un milieu minimum solide contenant différentes concentrations en zinc (0, 5, 10, 15 mM ZnSO₄) (Figure III.3). L'ajout de 5 mM de zinc dans le milieu n'est pas suffisant pour affecter la croissance des levures, quelle que soit la dilution observée. Sur 10 mM de zinc, la croissance des levures est ralentie seulement pour les deux dernières dilutions. Enfin, pour 15 mM de zinc, la croissance des levures, après 72 heures, est limitée dès la deuxième dilution de la culture de départ. Notons que cette concentration est inhibitrice pour la croissance d'étalement de culture de levures de DO inférieure ou égale à 0,1 après 72 heures. Cependant cette concentration de zinc n'empêche pas l'apparition, pour des temps de culture plus longs, de colonies isolées supposées mutantes.

Nous avons choisi la concentration de 15 mM de zinc pour le criblage de la banque. Cette concentration assure la viabilité des levures, mais est suffisamment toxique pour limiter leur croissance. Le criblage de la banque est donc fondé sur la cinétique d'apparition des levures transformées.

B. Identification des ADNc conférant à la levure une tolérance au zinc

B.1. Criblage primaire de la banque d'expression d'*A. halleri*

Le criblage est effectué sur les levures transformées par la banque d'ADNc d'*A. halleri*. Ces levures transformées sont étalées sur un milieu sélectif (sans uracile) contenant une concentration toxique de zinc (15 mM ZnSO₄). Le principe du criblage repose sur la vitesse d'apparition des colonies. Seules les levures transformées présentant une tolérance au zinc forment des colonies à croissance rapide. Quatre séries

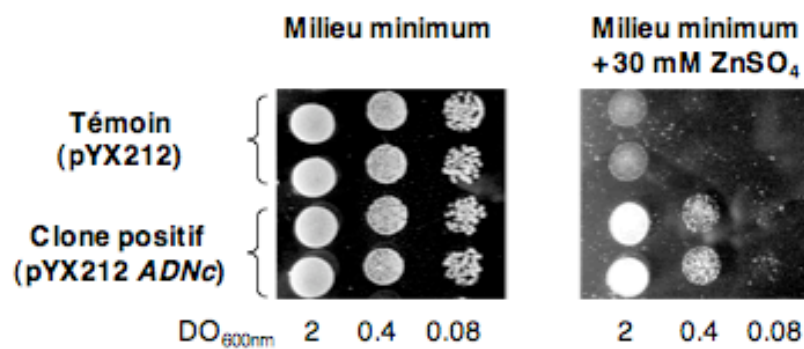


Figure III.4. Confirmation du phénotype de tolérance au zinc de levures transformées par un ADNc issu du criblage sur zinc de la banque d'*A. halleri*.

Dix microlitres de dilutions en série (d'un facteur 5) effectuées à partir d'une culture liquide de DO_{600nm} égale à 2 sont déposés sur un milieu minimum sélectif (sans uracile) additionné ou non de 30 mM $ZnSO_4$. L'expérience est répétée avec deux colonies de levure. La croissance est montrée après 2 jours (milieu minimum) ou 4 jours (+ 30 mM $ZnSO_4$) de culture à 30°C.

de criblage ont été réalisées et ont permis de tester 237.000 transformants de levure parmi lesquels 108 clones présentant une tolérance au zinc ont été retenus.

Pour chaque colonie sélectionnée, l'ADN plasmidique a été extrait puis introduit par électroporation dans une souche d'*E. coli* pour amplification. Les colonies bactériennes ainsi transformées par le plasmide d'intérêt ont été analysées par PCR en utilisant des amorces spécifiques du vecteur pYX212, situées de part et d'autre du site de clonage (Cf. Figure II.1), de sorte qu'on amplifie l'insert correspondant à l'ADNc. L'analyse en gel d'agarose de ces produits PCR a révélé que, sur les 108 colonies analysées, 25% ne possédaient pas d'insert. Pour les colonies restantes, la taille des inserts se situait entre 100 pb et 1 kb. Nous n'avons retenu, pour ce criblage, que des colonies contenant un ADNc de longueur supérieure à 200 pb. L'ADN plasmidique de ces 45 colonies a été isolé et réintroduit dans la levure.

B.2. Confirmation des clones positifs

Afin de confirmer que le phénotype de tolérance au zinc observé était bien lié à la présence du plasmide, nous avons effectué une deuxième transformation indépendante de la souche de levure par chacun des 45 plasmides candidats précédemment isolés. Des tests de croissance en gouttes ont été réalisés sur milieu sélectif et toxique en zinc. La concentration de 30 mM de zinc, supérieure à celle de 15 mM utilisée pour le criblage, a été choisie afin d'augmenter la stringence du phénotypage lors des tests de confirmation.

Un exemple est donné en figure III.4 : au niveau de la première dilution, les levures transformées par le plasmide contenant un ADNc issu de la banque forment des colonies alors que les levures témoins, transformées par le plasmide pYX212 sans insert, ne sont pas viables.

Dix des 45 clones testés ont montré une capacité de croissance sur un milieu minimum additionné de zinc (30 mM ZnSO₄) à une DO_{600nm} de 0,4 (Figure III.4) alors que les autres clones avaient un comportement identique à celui des levures témoins. Ce

Plasmide contenant l'ADNc	Nombre d'occurrences lors du criblage	Taille de l'ADNc (pb)	Taille de la protéine déduite (aa)	pI	Homologie dans les bases de données	Nom donné au gène chez <i>A. halleri</i>	Accession provisoire (Genbank)
pYX212-1	5	431	80	10,3	AtPDF1.2a	AhPDF1.1	AY961376
pYX212-2	2	432	80	9,8	AtPDF1.2a	AhPDF1.2	AY961377
pYX212-3	1	421	80	9,7	AtPDF1.2a	AhPDF1.3	AY961378
pYX212-4	1	431	80	10,2	AtPDF1.1	AhPDF1.4	AY961379
pYX212-5	1	496	124	nd	AtPDF1.4	AhPDFL	nd

Tableau III.1. Caractéristiques des ADNc isolés suite au criblage sur zinc de la banque d'ADNc d'*A. halleri* dans la levure et des protéines déduites de ces ADNc.

Les valeurs de point isoélectriques (pI) ont été calculées grâce au site ExpAsy. (nd: non déterminé). Les homologies ont été déterminées grâce au programme Blast.

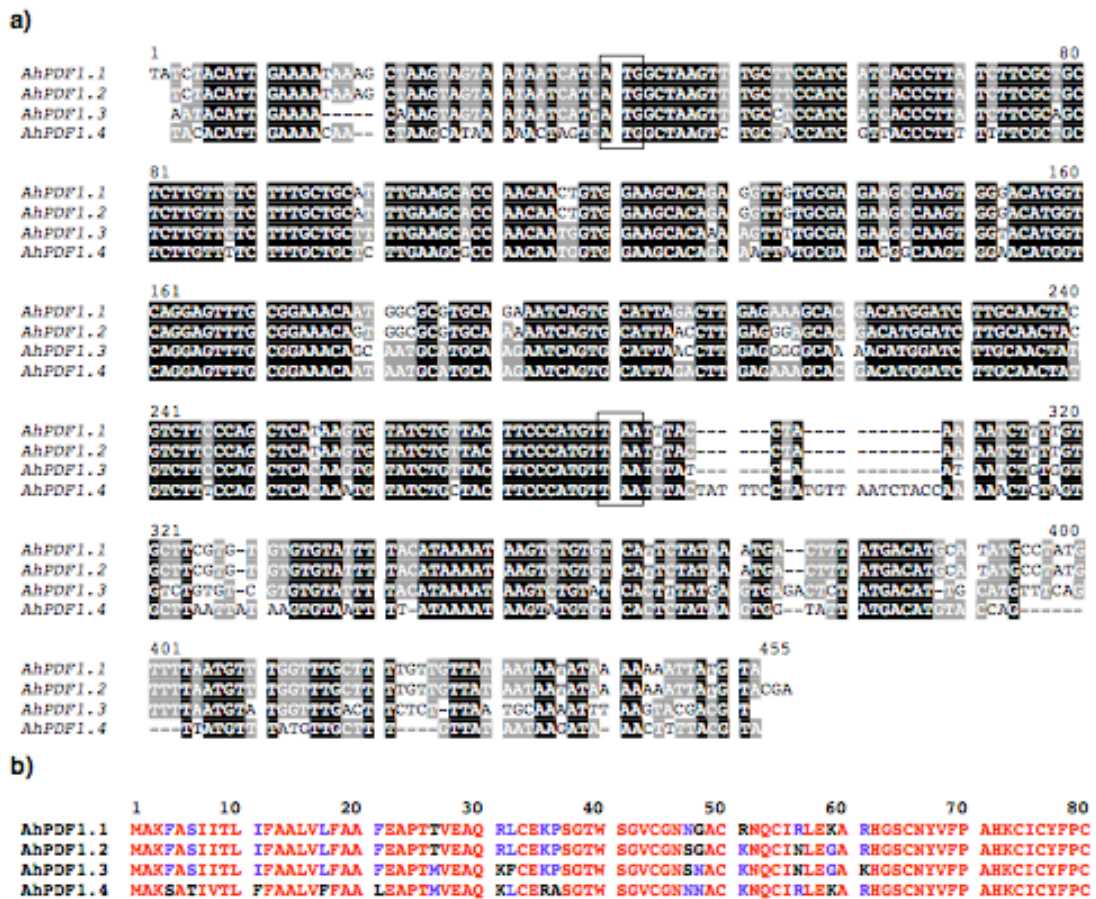


Figure III.5. Alignement des séquences nucléotidiques et protéiques des 4 ADNc de défensines d'*A. halleri* isolés lors du criblage de la banque d'ADNc d'*A. halleri*.

a) Alignement des séquences nucléotidiques réalisé grâce au logiciel ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) puis visualisé à l'aide du logiciel BOXSHADE. Les nucléotides sont surlignés : en noir lorsque toutes les séquences sont identiques, en gris lorsqu'au moins 75% des séquences le sont. Le codon d'initiation de la traduction (ATG) et le codon Stop (TAA) sont encadrés.

b) Alignement des séquences protéiques réalisé grâce au logiciel MULTALIN (Corpet, 1988).

fort pourcentage (80%) de clones considérés comme « faux positifs » confirme que la re-transformation dans la levure est une étape indispensable au criblage dans la levure.

B.3. Les ADNc isolés sont très fortement homologues entre eux

Les plasmides portés par les 10 clones présentant une tolérance au zinc ont été purifiés. Les inserts clonés dans ces plasmides ont alors été séquencés. Les données du séquençage ont permis d'établir que ces 10 clones correspondent seulement à 5 ADNc différents (Tableau III.1). Ces 5 ADNc sont de faible taille (421 à 496 pb en pleine longueur), ils codent des protéines basiques (pI de 9,7 à 10,3) de petite taille (80 à 124 acides aminés) (Tableau III.1).

Quatre ADNc ont une séquence codante de 243 pb (Figure III.5a), codant chacun une protéine de 80 acides aminés (Tableau III.1, Figure III.5b). Les 4 séquences peptidiques déduites présentent entre elles de forts taux d'identité (de 84 à 95%, Figure III.7c). Elles ont été comparées aux séquences disponibles dans les bases de données en utilisant le programme BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Les 4 protéines codées par les 4 ADNc présentent un fort taux d'identité avec des protéines appelées défensines de plantes de la famille PDF1 d'*A. thaliana* (de 80 à 95%, Tableau III.1, Thomma *et al.*, 2002). Par analogie, les 4 ADNc d'*A. halleri* ont été nommés *AhPDF1.1*, *AhPDF1.2*, *AhPDF1.3* et *AhPDF1.4*. Parmi ces 4 ADNc, certains ont été isolés plusieurs fois de façon indépendante au cours du criblage : cinq fois pour *AhPDF1.1* et deux fois pour *AhPDF1.2* (Tableau III.1).

Le cinquième ADNc code une protéine de 124 acides aminés. La comparaison avec les bases de données montre que cette séquence protéique présente également une homologie avec des défensines d'*A. thaliana* (Tableau III.1). Cependant lorsque la séquence en acides aminés est comparée avec celles des 4 autres protéines d'*A. halleri*, il apparaît qu'elle possède une extension N-terminale atypique (Figure III.6). Chez *A. thaliana*, on trouve également deux défensines, formant la famille 3, qui présentent une

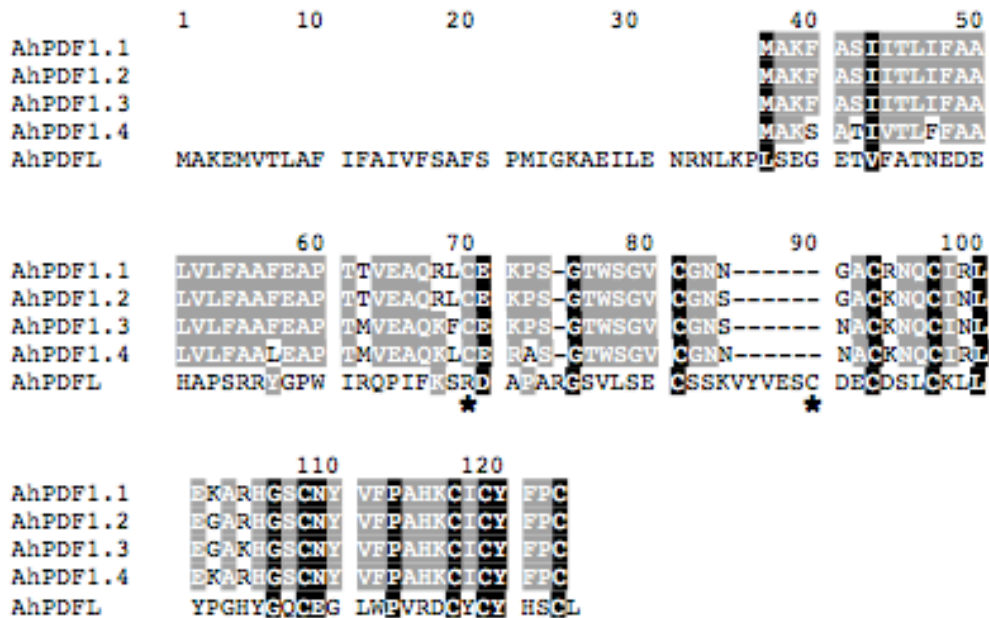


Figure III.6. Alignement des séquences protéiques déduites des 5 ADNc de défensines d'*A. halleri* isolés lors du criblage de la banque d'ADNc d'*A. halleri*.

L'alignement a été réalisé grâce au logiciel MULTALIN (Corpet, 1988). Les acides aminés sont surignés en gris ou en noir lorsqu'au moins 60 ou 100%, respectivement, des séquences présentent une similarité. Les astérisques indiquent l'emplacement des résidus cystéines qui diffèrent entre les séquences.

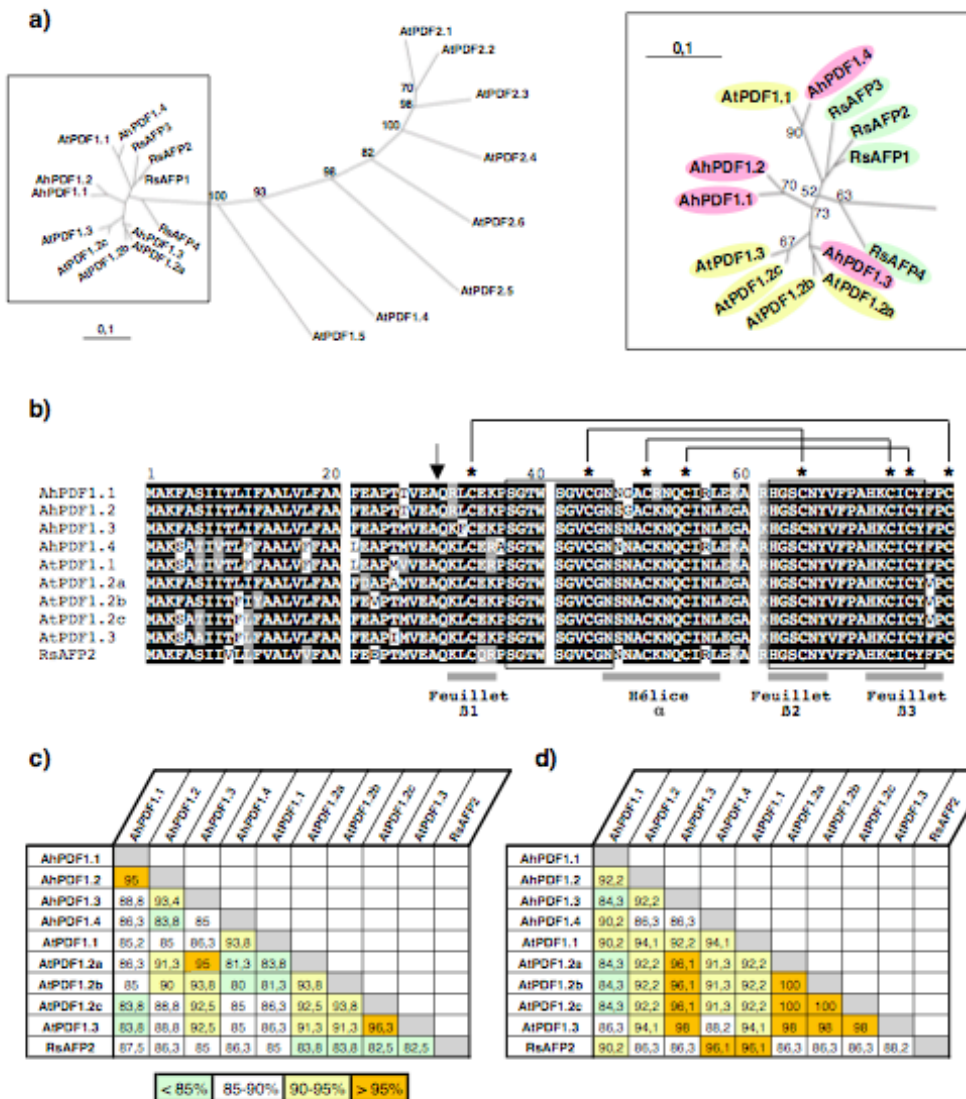


Figure III.7. Séquences protéiques de défenses de plantes (PDF).

a) Relations phylogénétiques entre les différentes PDF. L'arbre de distance a été calculé par la méthode de Neighbor Joining, et visualisé avec le logiciel Unrooted. Un agrandissement d'une partie de l'arbre montrant la position des PDF d'*A. halleri* est proposé dans l'encadré.

b) Alignement des séquences protéiques de PDF. Les séquences sont déduites des séquences d'ADNc isolés d'*A. halleri*, d'ADN génomique d'*A. thaliana*, ou obtenues après purification et séquençage des protéines chez *R. sativus*. L'alignement a été réalisé grâce au logiciel ClustaW et visualisé avec BOXSHADE (Thompson *et al.*, 1994). Les acides aminés sont surlignés lorsqu'au moins 60% des séquences présentent une identité (fond noir) ou une similarité (fond gris). La flèche indique le site de clivage potentiel entre la partie mature du peptide et la séquence signal putative située en N-terminal, déterminé d'après les données structurales obtenues pour RsAFP1 (Fant *et al.*, 1998). Les encadrés soulignent des portions conservées entre toutes les protéines présentées. La position conservée des cystéines est marquée par des astérisques (*). Les ponts disulfures entre ces cystéines sont représentés par des barres noires. La structure secondaire déterminée pour RsAFP1 est donnée sous l'alignement. Les accessions sont données en annexe.

c) et d) Dans les tableaux sont reportés les pourcentages d'identités des séquences des protéines entières (tableau c) ou matures (tableau d) présentées en b.

extension N-terminale. Cependant la séquence de leur extension diffère de celle de la défensine d'*A. halleri*. L'ADNc correspondant à cette défensine d'*A. halleri* a été nommé *AhPDFL*, pour « *PDF-like* ».

B.4. Quatre ADNc isolés codent des défensines de plante de type 1

Les 5 protéines déduites des ADNc isolés lors du criblage présentent des homologies de séquences avec des défensines de plantes (PDF). Les relations phylogéniques ont été calculées à partir des séquences protéiques des défensines d'*A. thaliana* des familles 1 et 2, et des défensines de *Raphanus sativus* et d'*A. halleri* (Figure III.7a). L'analyse de l'arbre révèle que la majorité des membres de la famille 1 sont très proches entre eux (AtPDF1.1 à AtPDF1.3, RsAFP1 à RsAFP4) et forment un « noyau » de la famille 1 alors que les deux autres sont moins regroupés (AtPDF1.4 et AtPDF1.5). Il apparaît également que les protéines d'*A. halleri* (AhPDF1.1 à AhPDF1.4) sont plus proches du noyau de la famille 1 d'*A. thaliana* que des autres PDF. Les 4 défensines de *R. sativus* appartiennent également au noyau de la famille 1 d'*A. thaliana*, 3 d'entre elles étant très proches entre elles. D'après ces résultats, il apparaît clairement que les 4 protéines AhPDF1.1 à AhPDF1.4 d'*A. halleri* appartiennent à une même famille non seulement orthologue de la famille 1 des PDF d'*A. thaliana*, mais plus précisément orthologue au « noyau » de cette famille. L'alignement des défensines du « noyau » de la famille 1 d'*A. thaliana* et des protéines AhPDF1.1 à 4 d'*A. halleri* (Figure III.7b) confirme les très forts taux d'homologie entre ces protéines (Figure III.7c).

L'analyse des séquences des protéines AhPDF1.1 à 4 d'*A. halleri* révèle la présence d'un site potentiel de clivage, qui séparerait un peptide signal (29 acides aminés) d'une partie mature (51 acides aminés). Ceci est cohérent avec les données concernant les défensines de radis (Terras *et al.*, 1995; Fant *et al.*, 1998), chez lesquelles le peptide signal est clivé pour donner la protéine mature

Les protéines AhPDF1.1 à 4 présentent un arrangement des résidus cystéines identique à celui des AtPDF (Figure III.7b). En revanche, la position des cystéines n'est pas identique pour la protéine AhPDFL dans laquelle seulement 7 cystéines sur 8 sont à des positions conservées (Figure III.6).

De façon remarquable, aucune autre séquence conférant une tolérance au zinc dans la levure n'a été obtenue à partir du criblage de 237.000 transformants de levure. Parmi les 5 ADNc isolés, 4 présentent entre eux une très forte homologie et appartiennent à une même famille de PDF. Nous nous sommes focalisés sur ces 4 ADNc pour la suite du travail.

C. Phénotype des levures transformées par des ADNc de défensines sur zinc

C.1. Comparaison des phénotypes de tolérance sur zinc conférés par les 5 ADNc de défensines d'*A. halleri*

Afin de déterminer s'il existe des différences dans le niveau de tolérance au zinc des levures transformées par les plasmides contenant un des 5 ADNc de défensines, de nouveaux tests de croissance ont été réalisés. La figure III.8 présente les résultats du test de croissance sur zinc. Les gouttes déposées sur le milieu minimum montrent l'homogénéité de croissance. En présence de 30 mM de zinc ajoutés dans le milieu, la croissance des levures témoins est arrêtée, tandis que celle des levures transformées par les défensines est ralentie, et ce jusqu'à la première (*AhPDF1.3* et *AhPDF1.4* Figure III.8a ; *AhPDFL*, Figure III.8b) ou deuxième dilution (*AhPDF1.1* et *AhPDF1.2* Figure III.8a). Les levures transformées par les plasmides contenant un des 5 ADNc de défensines présentent donc un phénotype clair de tolérance au zinc. De plus, il semble que les levures transformées par les plasmides contenant l'ADNc *AhPDF1.1* ou *AhPDF1.2* présentent une tolérance légèrement supérieure à celles les levures transformées par les plasmides contenant l'ADNc *AhPDF1.3* ou *AhPDF1.4*.

Les tests de croissance sur zinc nécessitent la présence de fortes concentrations en sulfate de zinc dans le milieu. Nous avons donc voulu nous assurer que le phénotype

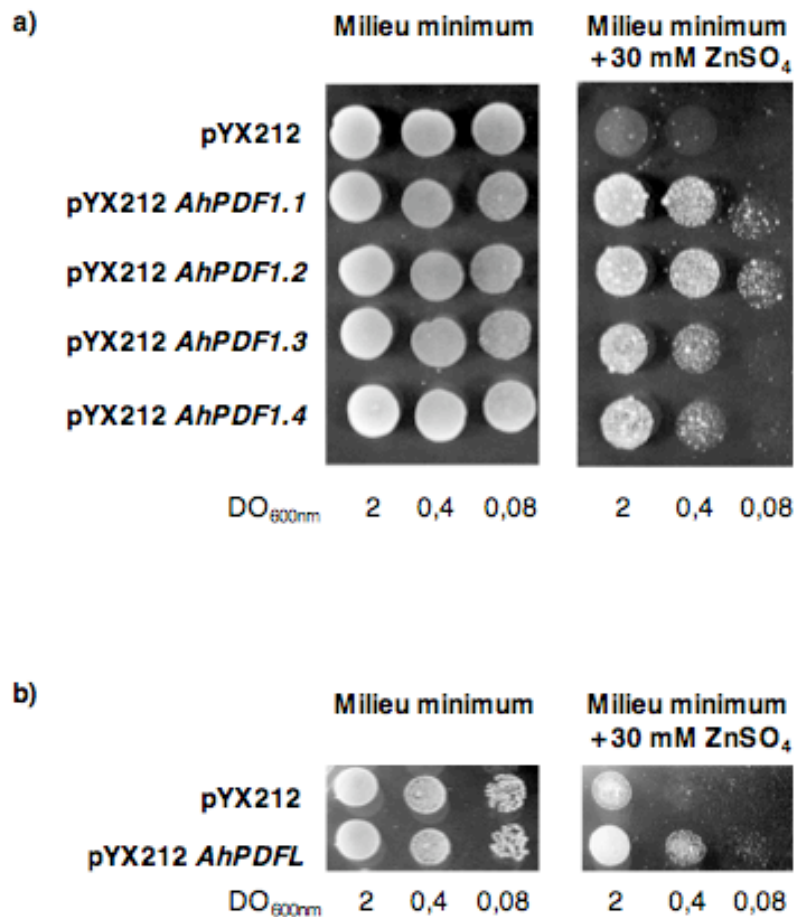


Figure III.8. Phénotype de tolérance au zinc des levures transformées par les ADNc *AhPDF1.1*, *AhPDF1.2*, *AhPDF1.3*, *AhPDF1.4* ou *AhPDFL*.

Les levures ont été transformées par le plasmide pYX212 sans insert (pYX212) ou le plasmide pYX212 contenant l'ADNc *AhPDF1.1*, *AhPDF1.2*, *AhPDF1.3*, *AhPDF1.4* (a) ou *AhPDFL* (b). Les souches transformées sont cultivées en milieu liquide sélectif, puis sont diluées afin d'obtenir les densités optiques indiquées. Dix microlitres de chaque dilution sont alors déposés sur un milieu solide sélectif, additionné ou non de zinc (30 mM ZnSO₄). La croissance des levures est estimée après 2 jours (milieu minimum) ou 8 jours (+ 30 mM ZnSO₄) d'incubation à 30°C.

observé était bien lié à la présence de zinc, et non à la présence de sulfate ou à une forte contrainte osmotique. Les tests de croissance présentés en figure III.8 ont donc été reproduits sur un milieu contenant du nitrate de zinc. Les mêmes résultats quant à la tolérance au zinc ont été obtenus (non présenté). Ces tests ont également été entrepris sur des milieux enrichis en fortes concentrations de sulfate de magnésium ou de calcium. Sur de tels milieux, les levures transformées par le plasmide pYX212 *AhPDF1.1* ne présentent pas de différentiel de croissance avec les levures témoins (non présenté). Ces deux tests supplémentaires suggèrent que le phénotype de tolérance observé est bien lié au zinc et non à son contre-ion anionique.

C.2. Une défensine d'*A. thaliana* confère une tolérance au zinc chez *S. cerevisiae*

Étant donnée la proximité de séquences protéiques déduites entre les défensines d'*A. halleri* et celles d'*A. thaliana*, nous avons voulu savoir si la tolérance au zinc dans la levure était un caractère spécifique aux cinq défensines isolées d'*A. halleri*, ou bien si ce caractère pouvait être étendu à d'autres défensines, dont celles d'*A. thaliana* par exemple. Nous avons donc cloné l'ADNc codant la protéine AtPDF1.2c dans le plasmide pYX212. Les levures ainsi transformées ont été testées pour leur tolérance vis-à-vis du zinc. La figure III.9 présente ces résultats. Il apparaît que les levures transformées par le plasmide pYX212::*AtPDF1.2c* présentent un phénotype de tolérance identique à celui des levures transformées par le plasmide pYX21::*AhPDF1.1*. Par conséquent, il semble que le phénotype de tolérance au zinc dans la levure ne soit pas un caractère spécifique aux défensines isolées chez *A. halleri*, mais soit un caractère commun à plusieurs défensines issues de différentes espèces, que ces espèces soient tolérantes au zinc ou non.

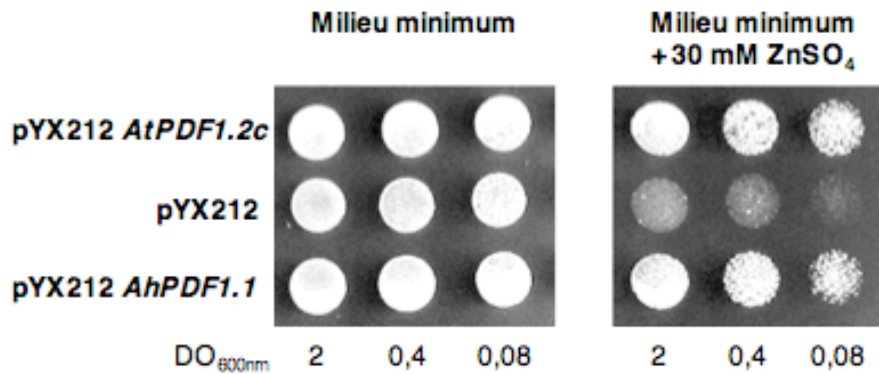


Figure III.9. Phénotype de tolérance au zinc des levures transformées par un ADNc d'*A. halleri* (*AhPDF1.1*) ou d'*A. thaliana* (*AtPDF1.2c*).

Les levures ont été transformées par le plasmide pYX212 sans insert (pYX212) ou le plasmide pYX212 contenant l'ADNc *AhPDF1.1* ou *AtPDF1.2c*. Les souches transformées sont cultivées en milieu liquide sélectif jusqu'à atteindre une densité optique de 2, puis des dilutions successives d'un facteur 5 sont effectuées. Dix microlitres de chaque dilution sont alors déposés sur un milieu solide sélectif, additionné ou non de zinc (30 mM $ZnSO_4$). La croissance des levures est estimée après 2 jours (milieu minimum) ou 8 jours (+ 30 mM $ZnSO_4$) d'incubation à 30°C.

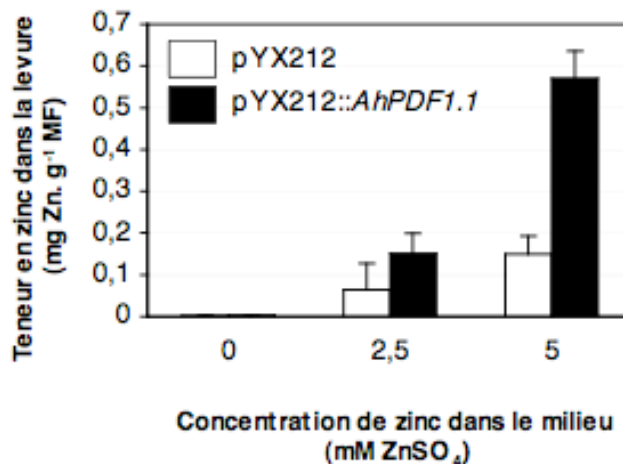


Figure III.10. Dosage du zinc dans la levure transformée par l'ADNc *AhPDF1.1*.

Les levures transformées par le plasmide vide pYX212 ou le plasmide pYX212::*AhPDF1.1* ont été cultivées en milieu sélectif liquide en présence de 0 ; 2,5 ou 5 mM de zinc, jusqu'à une densité optique (600 nm) égale à 1. Les culots de culture de levure ont été lavés (50 mM EDTA, puis H_2O) puis pesés et minéralisés. La concentration de zinc des extraits est dosée par ICP-MS. Les résultats sont exprimés en mg Zn par gramme de matière fraîche (MF). Les valeurs représentent la moyenne et l'écart-type pour 3 extraits.

D. Vers la compréhension du mode d'action des PDF dans la tolérance au zinc dans la levure

D.1. Analyse du contenu cellulaire en métaux des levures transformées par l'ADNc *AhPDF1.1*

Afin d'avancer dans la compréhension des mécanismes de tolérance au zinc des levures exprimant les défensines d'*A. halleri*, nous avons dosé la quantité de zinc accumulée dans ces levures, par rapport aux levures témoins. Les levures transformées par le plasmide vide pYX212 ou le plasmide pYX212::*AhPDF1.1* ont été cultivées en milieu sélectif liquide en présence de 0 ; 2,5 ou 5 mM de zinc, jusqu'à une DO_{600nm} égale à 1. Les culots de levure ont été lavés en présence d'EDTA (50 mM) pour libérer le zinc de la paroi. Après minéralisation, la teneur en zinc des culots de levure est analysée par ICP-MS (Figure III.10). Sur 0 et 2,5 mM de zinc, la teneur en zinc des levures pYX212::*AhPDF1.1* ne diffère pas de celle des levures témoins. En revanche, sur 5 mM de zinc, les levures pYX212::*AhPDF1.1* accumulent 3,8 fois plus de zinc que les levures témoins ($0,57 \pm 0,07$ mg Zn.g⁻¹ MF contre $0,15 \pm 0,04$ mg Zn.g⁻¹ MF).

Des dosages réalisés sur sphéroplastes indiquent la même tendance. Ceci suggère que le zinc excédentaire n'est pas lié à la paroi.

D.2. La présence du peptide signal des PDF est une composante majeure de la tolérance au zinc chez *S. cerevisiae*

Nous nous sommes interrogés sur la localisation de la protéine AhPDF1.1 dans la levure. L'analyse de la séquence protéique (§ B.4) a révélé la présence d'un peptide signal putatif (en N-terminal) qui pourrait assurer l'excrétion de la protéine mature *in planta*. Qu'en est-il de la reconnaissance de ce peptide signal dans la levure ?

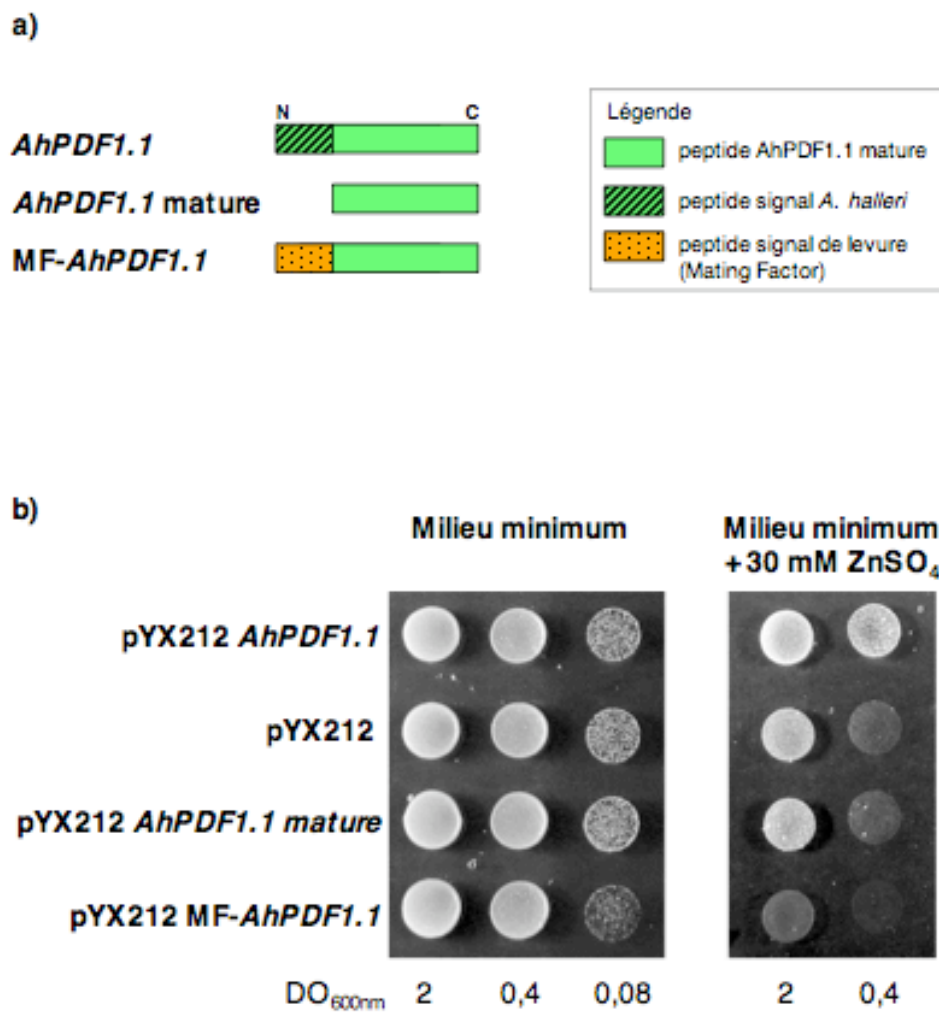


Figure III.11. Phénotype de tolérance au zinc des levures transformées par l'ADNc *AhPDF1.1*, *AhPDF1.1 mature*, ou MF-*AhPDF1.1* d'*A. halleri*.

Les levures ont été transformées par le plasmide pYX212 sans insert (pYX212) ou le plasmide pYX212 contenant l'ADNc *AhPDF1.1*, *AhPDF1.1 mature*, ou MF-*AhPDF1.1*.

a) Représentation schématique des peptides *AhPDF1.1*, *AhPDF1.1 mature* et MF-*AhPDF1.1* (Cf. Matériel et méthodes).

b) Les souches transformées sont cultivées en milieu liquide sélectif jusqu'à atteindre une densité optique de 2, puis des dilutions successives d'un facteur 5 sont effectuées. Dix microlitres de chaque dilution sont alors déposés sur un milieu solide sélectif, additionné ou non de zinc (30 mM ZnSO₄). La croissance des levures est estimée après 2 jours (milieu minimum) ou 8 jours (+ 30 mM ZnSO₄) d'incubation à 30°C.

Deux constructions ont été réalisées, en utilisant l'ADNc *AhPDF1.1* comme matrice (Cf. Matériel et méthodes), afin d'étudier le rôle de la localisation des défensines dans le phénotype de tolérance au zinc.

Dans un premier temps, une localisation cytoplasmique est envisagée. La première construction permet en effet l'expression dans la levure de la partie mature de la protéine, sans peptide signal. Cette construction est appelée « *AhPDF1.1*-mature » (Figure III.11a).

Dans un second temps, la séquence d'un peptide signal endogène de la levure est clonée à la place de celle du peptide signal de la protéine d'*A. halleri*. La séquence de ce peptide signal de levure provient du gène Mating Factor (MF) α de levure (Achstetter *et al.*, 1992). Ce peptide signal, après traduction, permet l'excrétion de la protéine dans le milieu extérieur, puis est clivé afin de libérer la protéine Mating Factor α mature. Cette construction est appelée « MF-*AhPDF1.1* » (Figure III.11a).

La figure III.11b représente un test de croissance des levures transformées par ces constructions, clonées dans le plasmide pYX212. Il apparaît que les levures transformées par le plasmide pYX212 *AhPDF1.1* mature ne présentent pas de phénotype de tolérance au zinc, et se comportent vis-à-vis du zinc de la même façon que les levures témoins c'est-à-dire transformées par le plasmide pYX212 sans insert. Les levures transformées par le plasmide pYX212 MF-*AhPDF1.1* ne présentent pas non plus de phénotype de tolérance au zinc. De plus ces levures ont une croissance légèrement affectée, et ce même sans présence de zinc en conditions normales de croissance.

Les tests de croissance des levures exprimant *AhPDF1.1* mature montrent que le peptide signal joue un rôle dans le phénotype de tolérance au zinc. Cependant ces tests ne nous permettent pas de déterminer si ce peptide signal intervient en permettant une localisation particulière et nécessaire au phénotype, ou si ce peptide joue un rôle en tant que tel, par sa séquence peptidique.

Les tests de croissance des levures transformées par la construction MF-*AhPDF1.1* n'ont pas permis de retrouver le phénotype de tolérance au zinc observé dans

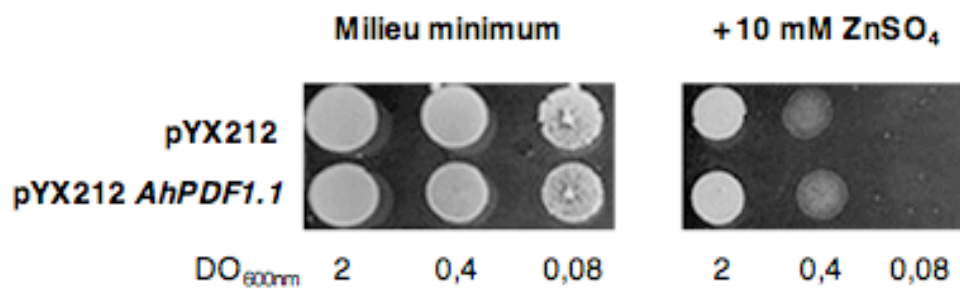


Figure III.12. Phénotype de tolérance au zinc des levures mutantes $\Delta zrc1$ transformées par un ADNc d'*A. halleri* (*AhPDF1.1*).

Les levures mutantes $\Delta zrc1$ ont été transformées par le plasmide pYX212 sans insert (pYX212) ou le plasmide pYX212 contenant l'ADNc *AhPDF1.1*. Les souches transformées sont cultivées en milieu liquide sélectif jusqu'à atteindre une densité optique de 2, puis des dilutions successives d'un facteur 5 sont effectuées. Dix microlitres de chaque dilution sont alors déposés sur un milieu solide sélectif, additionné ou non de zinc (10 mM ZnSO₄). La croissance des levures est estimée après 2 jours (milieu minimum) ou 8 jours (+ 10 mM ZnSO₄) d'incubation à 30°C.

les levures exprimant AhPDF1.1. de façon surprenante ces levures présentent un double phénotype : (i) elles ont une croissance ralentie sur milieu minimum ; (ii) cette inhibition de croissance est accentuée en présence de zinc. Elles sont ainsi plus sensibles au zinc que les levures témoins. Il reste à déterminer si la sensibilité au zinc est due à la présence du peptide signal de levure en lui-même ou à l'adressage de la protéine mature qu'il permet.

D.3. La transformation de la levure mutante $\Delta zrc1$ par *AhPDF1.1* n'a pas d'effet sur la sensibilité de la souche vis-à-vis du zinc

Le criblage de la banque d'ADNc a été réalisé dans une souche de levure sauvage. La transformation par les plasmides contenant un ADNc de défensine d'*A. halleri* conduit donc à une tolérance accrue de la souche vis-à-vis du zinc.

Nous avons transformé la souche BY4741 $\Delta zrc1$ par le plasmide pYX212 *AhPDF1.1*. La souche BY4741 $\Delta zrc1$ est mutée dans le transporteur d'influx tonoplastique de zinc ZRC1 (Kamizono *et al.*, 1989). Cette souche n'est plus capable d'assurer le stockage du zinc depuis le cytoplasme vers la vacuole, elle est ainsi plus sensible au zinc. Son phénotype de sensibilité au zinc peut être observé sur de plus faibles concentrations en zinc que la souche sauvage (10 mM ZnSO₄). Les levures transformées par le plasmide pYX212 sans insert ou par le plasmide pYX212 *AhPDF1.1* ont été testées pour leur croissance en présence de différentes concentrations de zinc (0, 2,5 ; 5 ; 7,5 ; 10 ; 12,5 mM ZnSO₄). Les résultats de ce phénotypage sur zinc sont présentés pour 0 et 10 mM de zinc (Figure III.12). Sur un milieu sans zinc ajouté, les levures pYX212::*AhPDF1.1* présentent une croissance identique à celle des levures témoins. Sur une concentration en zinc inhibant la croissance des levures témoins (10 mM ZnSO₄), la croissance des levures pYX212::*AhPDF1.1* ne diffère pas de celle des levures témoins. Il apparaît donc que la transformation par l'ADNc *AhPDF1.1* ne

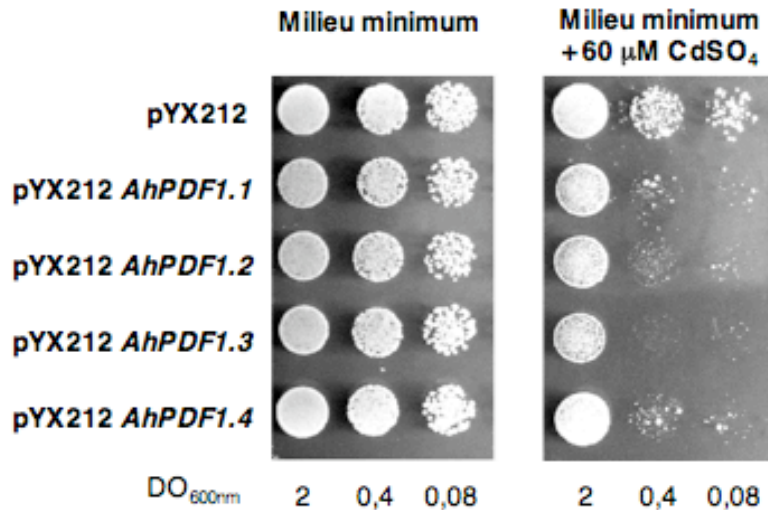


Figure III.13. Phénotype de sensibilité au cadmium des levures transformées par les ADNc *AhPDF1.1*, *AhPDF1.2*, *AhPDF1.3* ou *AhPDF1.4*.

Les levures ont été transformées par le plasmide pYX212 sans insert (pYX212) ou le plasmide pYX212 contenant l'ADNc *AhPDF1.1*, *AhPDF1.2*, *AhPDF1.3* ou *AhPDF1.4*. Les souches transformées sont cultivées en milieu liquide sélectif, puis sont diluées afin d'obtenir les densités optiques indiquées. Dix microlitres de chaque dilution sont alors déposés sur un milieu solide sélectif, additionné ou non de cadmium (60 μM CdSO₄). La croissance des levures est estimée après 2 jours (milieu minimum) ou 8 jours (+ 60 μM CdSO₄) d'incubation à 30°C.

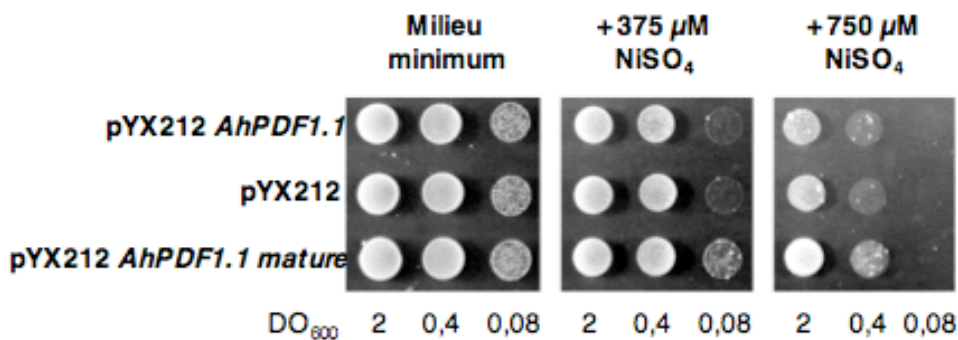


Figure III.14. Test de croissance des levures transformées par l'ADNc *AhPDF1.1*, *AhPDF1.1 mature*, ou MF-*AhPDF1.1* sur des fortes concentrations de nickel.

Les levures ont été transformées par le plasmide pYX212 sans insert (pYX212) ou le plasmide pYX212 contenant l'ADNc *AhPDF1.1*, ou *AhPDF1.1 mature*. Les souches transformées sont cultivées en milieu liquide sélectif jusqu'à atteindre une densité optique de 2, puis des dilutions successives d'un facteur 5 sont effectuées. Dix microlitres de chaque dilution sont alors déposés sur un milieu solide sélectif, additionné ou non de nickel (375 ou 750 μM NiSO₄). La croissance des levures est estimée après 2 jours (milieu minimum) ou 8 jours (+ 375 ou 750 μM NiSO₄) d'incubation à 30°C.

modifie pas la sensibilité vis-à-vis du zinc de la levure mutante $\Delta zrc1$. La transformation par le plasmide pYX212 *AhPDF1.1* n'a pas d'effet positif sur la tolérance au zinc de la levure mutée dans le transporteur tonoplastique de zinc ZRC1.

E. Les défensines confèrent spécifiquement une tolérance au zinc chez *S. cerevisiae*

La tolérance des levures transformées par des ADNc de défensines peut-elle être étendue à d'autres métaux que le zinc ? Pour répondre à cette question, le phénotype des levures transformées par le plasmide pYX212::*AhPDF1.1* a été testé sur d'autres métaux que le zinc. Quatre métaux ont été choisis : cobalt, cuivre, cadmium et nickel. Les résultats diffèrent suivant le métal considéré. Sur des concentrations toxiques de cobalt et de cuivre (respectivement autour de 2 mM et 100 μ M) aucun phénotype n'est observé.

Sur des concentrations toxiques de cadmium, nous observons un phénotype de sensibilité (Figure III.13).

Sur des concentrations toxiques de nickel, les levures transformées par le plasmide pYX212 *AhPDF1.1* ne présentent pas de phénotype en comparaison avec les levures témoins (Figure III.14). Cependant, les levures transformées par le plasmide pYX212 *AhPDF1.1* mature montrent une tolérance très légèrement accrue en présence d'une concentration toxique en nickel (Figure III.14).

Ces résultats suggèrent que la tolérance vis-à-vis du zinc précédemment observée n'est pas retrouvée pour d'autres cations métalliques.

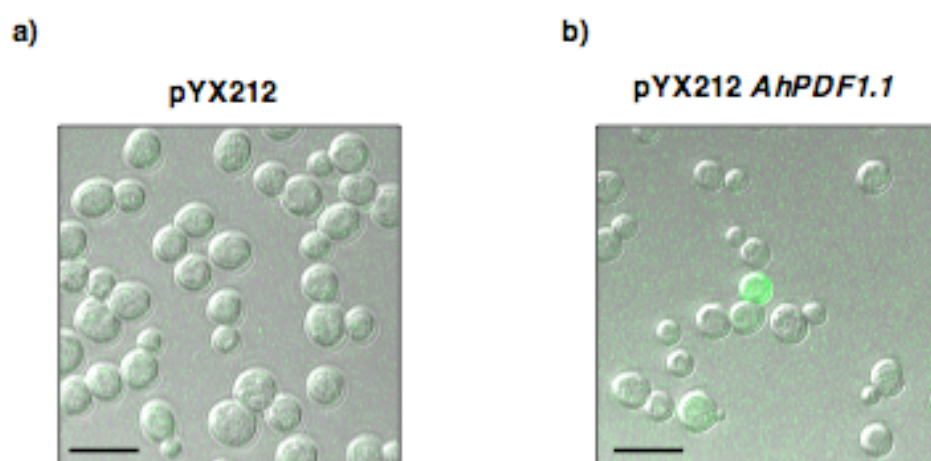


Figure III.15. Immunolocalisation de la défensine AhPDF1.1 dans les levures transformées par le plasmide pYX212 *AhPDF1.1*.

Les levures transformées par le plasmide pYX212 (a) ou le plasmide pYX212::*AhPDF1.1* (b) sont incubées avec le sérum anti-RsAFP2 puis, après lavages, avec un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (Alexa 488). L'observation est réalisée au microscope confocal. La barre représente environ 10 μm .

F. Immunolocalisation des défensines d'*A. halleri* dans la levure

Nous avons tenté des expériences d'immunolocalisation dans la levure. Pour ces expériences, les levures sont préalablement fixées, mais les membranes ne sont pas rendues perméables. Nous émettons l'hypothèse selon laquelle les anticorps ne traverseront pas la membrane plasmique. L'anticorps secondaire étant couplé à un fluorochrome (Alexa 488), les levures sont observées au microscope confocal (Figure III.15). Des témoins réalisés sans anticorps primaire nous assurent que l'anticorps secondaire ne reconnaît pas d'antigène dans la levure (non présenté). Le sérum anti-RsAFP2 est ensuite testé sur les levures transformées par le plasmide pYX212 sans insert, afin de vérifier la spécificité de la reconnaissance dans ces conditions. Ces levures présentent une coloration faible, diffuse et uniforme, assimilée à un bruit de fond (Figure III.15a). En revanche, lorsqu'on observe les levures transformées par le plasmide pYX212 *AhPDF1.1*, certaines sont fortement marquées par l'anticorps secondaire (Figure III.15b). Ce résultat suggère que ce marquage indique de façon spécifique la présence de la protéine AhPDF1.1. De plus, les anticorps ne traversant pas ces membranes non perméabilisées, il est probable que les protéines AhPDF1.1 détectées par l'anticorps soient situées à l'extérieur (sur la membrane et/ou sur la paroi) de la levure. Cependant, d'autres expériences doivent être envisagées afin de confirmer ce résultat : immunolocalisation dans des levures transformées par le plasmide pYX212 *AhPDF1.1* mature, utilisation d'un promoteur inductible (à la place du promoteur constitutif du pYX212) afin de corrélérer éventuellement l'induction du promoteur et la détection du marquage dans les levures transformées par le plasmide pYX212 *AhPDF1.1*.

Conclusion du premier chapitre des résultats

A. Les PDF sont les seuls candidats isolés à l'issue du criblage sur zinc d'une banque d'ADNc d'*A. halleri* exprimée dans la levure

A.1. La taille des ADNc de la banque n'est pas en cause dans les résultats du criblage sur zinc

De façon inattendue, le criblage d'une banque d'ADNc d'*A. halleri* dans la levure en conditions de toxicité en zinc nous a conduit à isoler 5 ADNc qui codent tous des PDF. Ces ADNc sont de faible taille (inférieure à 500 pb) ce qui pose la question de la qualité de la banque d'ADNc utilisée. En effet, la première étape dans la construction d'une banque d'ADNc est cruciale : elle repose sur la transcription inverse des ARNm. Or, lors de cette réaction, la progression de la polymérase, dont l'activité débute à partir de la région 3' poly-adenylée du messenger, peut être arrêtée par la structure spatiale du messenger. Ce phénomène aboutit à l'obtention d'ADNc de faible taille, et souvent incomplets. Pour éviter ces écueils, une attention particulière a été portée, lors de la construction de notre banque d'ADNc, à la dénaturation des messagers. La figure III.2 montre que les ADNc utilisés pour le clonage de la banque ont des tailles variant de 0,3 à 4 kb, la moyenne se situant autour de 1,2 kb, ce qui assure une bonne représentativité de l'ensemble des ADNc, y compris des plus grands (transporteurs par exemple).

A.2. De la difficulté du criblage sur un métal essentiel

Le zinc joue un rôle majeur dans la cellule, dans la régulation génique notamment, en particulier parce qu'il intervient dans la structure des facteurs de transcription en doigt de zinc. De ce fait, la concentration en zinc dans la cellule doit être finement régulée.

La levure *S. cerevisiae* possède deux transporteurs, respectivement à haute et basse affinité, permettant l'entrée de zinc dans la cellule : ZRT1 (Zhao and Eide, 1996b) et ZRT2 (Zhao and Eide, 1996a) (Figure III.16). De plus elle dispose d'un système de stockage/déstockage du zinc dans la vacuole grâce à des transporteurs d'influx (ZRC1, Kamizono *et al.*, 1989; MacDiarmid *et al.*, 2002 ; COT1, Conklin *et al.*, 1994) et un transporteur d'efflux vers le cytoplasme (ZRT3, MacDiarmid *et al.*, 2000). La concentration en zinc est ressentie par l'intermédiaire de ZAP1 notamment, facteur de transcription qui régule à lui seul l'expression de 46 gènes (Lyons *et al.*, 2000). En situation de déficit en zinc, l'expression des gènes *ZRT1*, *ZRT2* et *ZRT3* est induite par l'intermédiaire du facteur de transcription ZAP1 assurant ainsi l'influx de zinc vers le cytoplasme. Paradoxalement, lors d'un déficit en zinc, la levure met également en place des transporteurs vacuolaires de zinc (ZRC1) qui éviteront un choc dû à l'entrée massive de zinc dans le cytoplasme par le biais de transporteurs cytoplasmiques (MacDiarmid *et al.*, 2003. En réponse à un excès de zinc dans le milieu extérieur, le transporteur à haute affinité ZRT1 est ubiquitinylé avant de subir une endocytose puis d'être dégradé dans la vacuole (Gitan *et al.*, 1998, Gitan and Eide, 2000).

Le zinc étant un métal essentiel, on voit ici que la levure dispose d'un système complexe de régulation assurant son homéostasie. Ceci peut expliquer la difficulté rencontrée dans la recherche d'un phénotype clair de tolérance au zinc. En effet, des études similaires de criblage dans la levure sur une toxicité en nickel ou en cadmium (Vacchina *et al.*, 2003, Bernard *et al.*, 2004), réalisées à partir d'une banque d'ADNc de *Thlaspi caerulescens*, n'ont pas engendré de telles difficultés (Pianelli, K et Bernard, C, communications personnelles). Il apparaît que le criblage dans la levure est plus stringent lorsqu'on utilise un métal plus toxique et non essentiel.

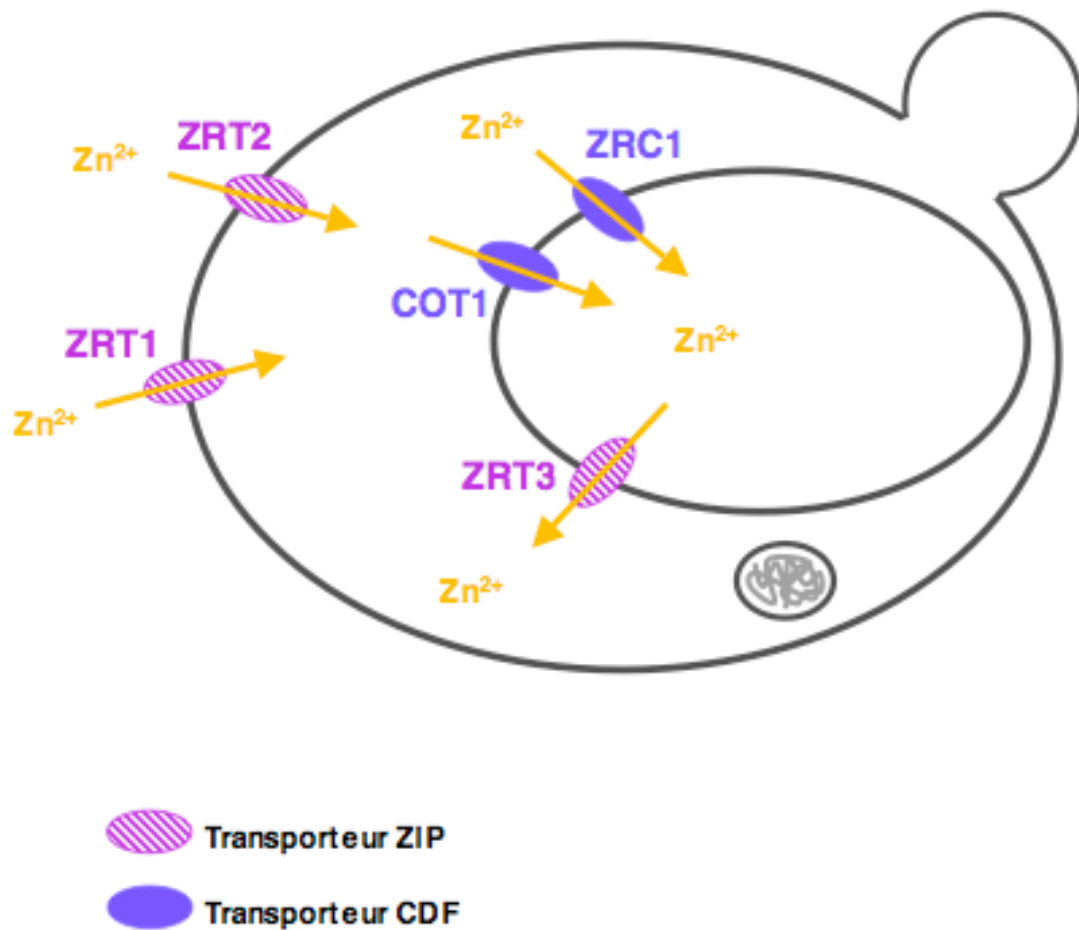


Figure III.16. Mécanismes impliqués dans l'homéostasie du zinc dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Ce schéma illustre la localisation des transporteurs plasmalemmiques de zinc à haute et basse affinité (ZRT1 et ZRT2), et des transporteurs vacuolaires de zinc (ZRC1, ZRT3 et COT1). Schéma établi d'après MacDiarmid *et al.*, 2000.

A.3. Les résultats du criblage sont liés au choix de la souche de levure de départ

Le criblage d'une banque d'expression en levure permet d'accéder directement, dans la levure, à un phénotype lié à l'expression d'un gène. Cette technique, cependant, n'a été généralement utilisée, dans la recherche de tolérance métallique, qu'avec des souches de levures mutées et ainsi rendues plus sensibles au métal en question. Le criblage repose ainsi sur une complémentation et il permet donc le plus souvent d'isoler le gène de plante orthologue au gène muté dans la levure (Minet *et al.*, 1992). Ainsi, une banque d'ADNc d'*A. halleri* exprimée dans le double mutant $\Delta zrc1\Delta cot1$ de *S. cerevisiae* a conduit à isoler un transporteur de zinc de la famille CDF (AhMTP1, Dräger *et al.*, 2004). Ce transporteur AhMTP1 est localisé au niveau du tonoplaste dans ces mutants de levure, complétant donc la fonction de stockage vacuolaire du zinc normalement assurée par ZRC1 et COT1.

Nous avons choisi d'exprimer la banque d'ADNc d'*A. halleri* dans une souche de levure non mutée, afin de ne pas orienter *a priori* le crible par le choix d'un mutant. Ce choix nous permettait d'isoler des candidats qui, éventuellement, ne seraient pas directement impliqués dans le transport de zinc. Nous nous attendions à cloner, entre autres, des ADNc codant des chélateurs de métaux comme les métallothionéines ou des enzymes impliquées dans la synthèse de tels chélateurs comme la nicotianamine synthase. Au laboratoire, le criblage d'une banque d'expression de *Thlaspi caerulescens* sur zinc a permis d'isoler un ADNc codant une métallothionéine (Pianelli et Czernic, communication personnelle), mais la même banque criblée sur cadmium n'a pas permis d'isoler ce clone. Il n'est pas exclu que les mécanismes de tolérance diffèrent selon les métaux mais également selon les espèces végétales considérées (Pollard *et al.*, 2002).

La levure *S. cerevisiae* ne possède pas de défensines (<http://www.yeastgenome.org>). Le criblage de la banque d'ADNc d'*A. halleri* dans une souche sauvage de levure a donc effectivement permis l'apport d'une nouvelle fonction dans la levure en lui permettant, grâce aux PDF, d'acquérir une tolérance accrue vis-à-vis du zinc.

B. Les défensines pourraient jouer un rôle indirect dans la tolérance au zinc de la levure

B.1. La transformation de levures sauvages par des PDF a un effet positif, stable et spécifique sur leur tolérance au zinc

Dans ce premier chapitre, nous avons établi une corrélation entre la transformation de la levure *S. cerevisiae* par une séquence nucléotidique de défensine de plante de type 1 et le comportement des levures vis-à-vis des métaux. Le phénotype conféré dans la levure par les PDF dépend du métal considéré : tolérance sur zinc, sensibilité sur cadmium, absence de phénotype sur les autres métaux testés (Cf. Tableau III.2). Notons que le phénotype de tolérance métallique n'a été observé, avec la séquence complète de l'ADNc *AhPDF1.1*, que pour le zinc.

B.2. La séquence des PDF n'explique pas le rôle qu'elles jouent dans la tolérance au zinc dans la levure

Les défensines sont riches en cystéines (8 cystéines pour 51 acides aminés si l'on considère la partie mature). Or les cystéines sont des résidus connus pour chélater les ions Zn^{2+} (O'Dell, 1992). On les trouve par exemple dans les structures en doigt de zinc présentes dans de nombreux facteurs de transcription (Berg, 1990), mais également chez les métallothionéines, où elles sont organisées selon des motifs CXC et CC (Cobbett and Goldsbrough, 2002). Cependant, des études de la structure tridimensionnelle de RsAFP1 ont montré que ces 8 cystéines formaient des ponts disulfures intramoléculaires (Fant *et al.*, 1998).

Souche de levure	ADNc ou construction	Phénotype		
		Zn	Cd	Ni
BY4741his+	<i>AhPDF1.1</i> à 1.4, <i>AhPDFL</i>	++	—	0
	<i>AhPDF1.1</i> mature	0	0	+
	<i>AhPDF1.1MF</i>	—	nd	nd
	<i>AtPDF1.2</i>	++	nd	nd
BY4741 Δ <i>zrc1</i>	<i>AhPDF1.1</i>	0	nd	nd

Tableau III.2. Tableau récapitulatif des phénotypes de tolérance ou sensibilité métallique conférés par les différents ADNc ou constructions de PDF dans la levure *S. cerevisiae*.

Ce tableau reprend les données du chapitre I des Résultats quant au phénotype sur zinc (Zn), cadmium (Cd) ou nickel (Ni) des levures transformées par différents ADNc ou constructions de *PDF*. Les phénotypes de tolérance (++ ou +, suivant l'intensité du phénotype) ou de sensibilité (-) sont indiqués, ainsi que l'absence de phénotype (0). Les cas non analysés sont notés nd (non déterminé).

Des expériences d'expression de défensines dans la levure ont été réalisées précédemment (Alves *et al.*, 1994). Elles ont montré que les défensines RsAFP2 produites chez *S. cerevisiae* possédaient une activité antifongique, indiquant que les ponts disulfures étaient correctement formés. Or, si les cystéines des défensines d'*A. halleri* exprimées dans la levure sont impliquées dans des ponts disulfures, elles ne sont pas disponibles pour la chélation des ions Zn^{2+} .

Cependant, nous avons vu dans l'introduction bibliographique que le zinc n'était pas présent dans le cytoplasme sous forme de cation libre, mais au contraire systématiquement pris en charge par des métallochaperonnes. Celles-ci possèdent une forte affinité pour leur ligand métallique, bien qu'elles soient chargées de le céder aux multiples métalloprotéines cibles. Les principes de biochimie inorganique qui sous-tendent ces interactions sont complexes et mal connus (Finney and O'Halloran, 2003), et nous ne pouvons pas exclure sans preuve expérimentale l'hypothèse d'une chélation du zinc par les défensines. On ne peut pas toutefois à ce stade, écarter l'hypothèse qu'une partie des protéines hétérologues formées dans la levure soient mal structurées et puissent chélater le zinc. Des analyses de la spéciation du zinc dans la levure apporteraient des informations essentielles. De plus, la production de défensine en système hétérologue pourrait permettre de mener des expériences de fixation du métal sur la protéine purifiée, afin de valider ou invalider cette hypothèse.

L'observation du phénotype des levures transformées par les défensines d'*A. halleri* sur cadmium apporte néanmoins un argument supplémentaire contre l'hypothèse de chélation des métaux par les PDF. En effet, *A. halleri* est une espèce tolérante au zinc mais également au cadmium (Bert, 2000), cette tolérance s'exprimant au niveau cellulaire (Marquès *et al.*, 2004). Cependant, les défensines isolées chez *A. halleri* ne confèrent pas une tolérance mais au contraire une sensibilité au cadmium dans la levure *S. cerevisiae*. Or, les cystéines peuvent chélater les ions Cd^{2+} , comme c'est le cas pour les métallothionéines animales (Palmiter, 1998) et pour les phytochélatines (Cobbett and Goldsbrough, 2002). Selon l'hypothèse de chélation du métal par les 8 cystéines que contiennent les défensines, on envisagerait donc un phénotype de tolérance des levures vis-à-vis du cadmium. Ce résultat inattendu montre que le rôle joué par les défensines dans la physiologie des métaux pourrait être plus complexe qu'une simple chélation des métaux.

B.3. La localisation subcellulaire est primordiale pour la fonction des PDF dans la tolérance au zinc

Lorsque le peptide signal endogène des PDF a été remplacé par un peptide signal de levure (« MF »), un phénotype étonnant a été observé : les levures ainsi transformées ont une croissance ralentie et sont devenues plus sensibles au zinc que les levures témoins. Sur milieu minimum, nous avons restauré la croissance de ces levures par ajout de calcium (5 mM CaSO₄, données non présentées). Or des données bibliographiques montrent que l'activité antifongique des défensines peut être inhibée par de fortes concentrations (de l'ordre du mM) en cation divalent, tel que le calcium (Terras *et al.*, 1993). Bien que d'une part certaines défensines de Brassicacées n'aient pas d'effet sur la levure *S. cerevisiae* à des concentrations allant jusqu'à 500 µg.ml⁻¹ (Terras *et al.*, 1993), et que d'autre part des défensines de radis aient été auparavant exprimées dans la levure avec succès (Alves *et al.*, 1994), nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse selon laquelle AhPDF1.1 aurait une activité antifongique contre la levure, ralentissant ainsi la croissance des levures l'exprimant. Cette activité ne serait permise, dans notre cas, que lorsque la défensine est adressée grâce au peptide signal endogène de levure (« MF »). Il semble donc que le peptide signal de levure, qui assure un transport à travers la membrane plasmique et donc une localisation extracellulaire, ne procure pas la même localisation que le peptide signal originel provenant d'*A. halleri*.

De plus il semble qu'une localisation particulière d'AhPDF1.1 soit requise en fonction du métal, afin d'assurer sa fonction. Ainsi la traduction de la protéine avec son peptide signal semble nécessaire à la tolérance au zinc, alors que la traduction de la protéine sous sa forme mature est nécessaire à la tolérance au nickel et n'a pas d'effet vis-à-vis du zinc.

Bien que nous ayons montré que la présence du peptide signal est essentielle au phénotype de tolérance observé dans la levure, nous n'avons pas déterminé si ce peptide signal intervenait en permettant une localisation particulière et nécessaire au phénotype, ou si ce peptide jouait un rôle en tant que tel, par sa séquence peptidique. Néanmoins, l'analyse de la séquence du peptide signal nous révèle l'absence de résidus histidine et cystéine. Il est donc peu probable que ce peptide puisse intervenir en tant que chélateur de zinc. L'analyse du phénotype de levure exprimant ce peptide signal seul répondrait à cette question. Enfin, nous pouvons également envisager que la présence du peptide

signal endogène influe sur les repliements de la protéine mature, voire sur l'oligomérisation potentielle des PDF.

Par immunolocalisation, nous avons détecté la présence de PDF au niveau pariétal dans la levure. Des résultats préliminaires de western blot indiquent qu'une partie des PDF serait présente dans le milieu extérieur. Des expériences de fusion d'AhPDF1.1 avec la GFP pourraient permettre de préciser la distribution des PDF dans la levure.

B.4. Les PDF pourraient modifier les flux ioniques dans la levure, améliorant la tolérance au zinc

Paradoxalement, les levures transformées par l'ADNc *AhPDF1.1* ont un contenu cellulaire en zinc plus élevé que les levures témoins. Des expériences menées sur des sphéropastes de levures confirment que cette suraccumulation du zinc est en partie intracellulaire (non présenté), suggérant que le zinc suraccumulé pourrait être stocké dans la vacuole. Cette hypothèse est confortée par le fait que les défensines ne permettent pas de restaurer la croissance du mutant de levure $\Delta zrc1$, plus sensible au zinc. La fonctionnalité de ZRC1, assurant le stockage vacuolaire du zinc, apparaît donc nécessaire au rôle des PDF dans la tolérance au zinc. L'utilisation d'autres souches de levures mutantes affectées dans le stockage du zinc devrait permettre d'approfondir nos connaissances concernant le mode d'action des PDF.

Les PDF, de structure secondaire $\beta\alpha\beta\beta$, adoptent une conformation spatiale de type « CS $\alpha\beta$ » dans laquelle une hélice α est stabilisée grâce aux ponts disulfures qui la relie à un feuillet β . Or on distingue 2 autres groupes de protéines possédant la même structure tridimensionnelle : (i) les toxines de scorpion à courte chaîne (36-39 acides aminés, 3 ponts disulfures), (ii) les toxines de scorpion à longue chaîne (60-70 acides aminés, 4 ponts disulfures). Ces toxines sont des modulateurs de l'activité des canaux K^+ Ca^{2+} -dépendants ou Na^+ , respectivement (Froy and Gurevitz, 1998). Cette surprenante similarité de structure pose la question d'une similarité de fonction. Or le mode d'action antifongique des PDF, largement étudié, met également en jeu des modifications de flux ioniques : influx de Ca^{2+} , efflux de K^+ à travers la membrane de

l'hyphe (Thevissen *et al.*, 1996; Thevissen *et al.*, 1999). Ces modifications apparaissent comme des conséquences de l'interaction entre les défensines et certains phospholipides membranaires (Thevissen *et al.*, 2003a; Thevissen *et al.*, 2004), sans que le mécanisme précis soit connu. Récemment, Spelbrink *et al.*, (2004) ont montré que des défensines de *Medicago* pouvaient bloquer des canaux calciques de mammifères *in vitro*. Ces travaux récents renforcent l'hypothèse d'une possible interaction entre PDF et canaux ioniques.

Ces arguments suggèrent que le rôle des défensines dans la tolérance aux métaux pourrait impliquer des modifications de flux ioniques, par modulation de l'activité de canaux ou éventuellement de transporteurs ioniques présents sur les membranes, par exemple.

B.5. Perspectives pour la compréhension du rôle des PDF dans la tolérance au zinc dans la levure.

Le niveau d'expression des différentes défensines dans la levure devra être analysé afin de déterminer, relativement à leur niveau respectif d'expression, quelle défensine confère la plus forte tolérance au zinc dans la levure. De façon plus générale, la compréhension des mécanismes de tolérance au zinc liés à l'expression des défensines dans la levure nécessiterait la mise en place d'expériences supplémentaires. L'influence de paramètres extérieurs (pH, effet d'autres cations, statut redox) sur la tolérance au zinc observée ainsi que la localisation précise des défensines dans la levure pourraient aider à cette compréhension. De plus, l'utilisation de souches de levures mutées dans des gènes impliqués dans l'homéostasie du zinc pourrait apporter des informations sur les éventuels partenaires nécessaires au rôle des défensines dans la tolérance au zinc.

C. De la nécessité de valider les résultats par une approche menée *in planta*

Le même phénotype de tolérance au zinc a été observé dans la levure après transformation par un ADNc codant une défensine d'*A. halleri*, espèce tolérante au zinc,

ou d'*A. thaliana*, une proche parente non tolérante au zinc. Nous constatons ainsi qu'il n'y a pas de corrélation entre la tolérance au zinc de l'espèce et le phénotype de tolérance au zinc conféré par l'expression de défensines de cette espèce dans la levure. Il semble donc qu'il ne faille pas chercher des explications quant à la tolérance au zinc d'*A. halleri* dans la séquence de ces défensines, mais plutôt dans des régulations de l'expression des gènes de défensines. Dans le second chapitre des résultats, la dérégulation de l'expression d'une défensine est abordée grâce à la transgénèse par le biais de la surproduction de la défensine AhPDF1.1 d'*A. halleri* chez *A. thaliana*.

Dans ce premier chapitre, l'approche d'expression hétérologue dans la levure nous a permis d'accéder directement à une fonction potentielle des défensines dans la tolérance aux métaux. Malgré les possibilités expérimentales qu'offre ce système, nous n'avons pas souhaité poursuivre notre travail dans cette direction. En effet, au début de cette étude, aucun lien n'avait été établi dans la littérature entre les défensines de plantes et l'homéostasie des métaux au sens large chez les plantes. Il nous a donc paru nécessaire et plus pertinent de valider dans la plante les résultats obtenus dans la levure. Ainsi l'approche en système hétérologue unicellulaire n'a été envisagée qu'en tant qu'étape préliminaire à l'étude *in planta*.

Chapitre 2

Caractérisation du rôle d'une défensine d'*A. halleri* dans la tolérance aux métaux *in planta*

Préambule

L'approche menée en système hétérologue dans la levure a permis de suggérer un rôle fonctionnel des défensines de type 1 d'*A. halleri* dans la tolérance au zinc au niveau cellulaire. Par le biais de la transformation génétique, nous avons cherché à déterminer l'implication des défensines dans la réponse aux métaux *in planta*. À notre connaissance, il n'existe pas à ce jour de technique de transformation pour *A. halleri*. Une approche d'extinction des gènes de défensines chez *A. halleri* n'a donc pas été menée. Nous avons choisi d'utiliser *A. thaliana*, espèce proche d'*A. halleri* mais facilement transformable. *Arabidopsis thaliana* n'est pas tolérante au zinc. Nous avons choisi d'étudier l'effet de la surexpression d'une défensine d'*A. halleri* chez cette espèce sur sa tolérance au zinc.

Les 4 défensines de type 1 chez *A. halleri* ont des séquences peptidiques très proches ; de plus le phénotype de tolérance au zinc qu'elles confèrent à la levure ne présentent pas de différence majeure. Nous avons donc sélectionné une de ces défensines de type 1 afin de la surproduire dans les plantes transgéniques. L'ADNc *AhPDF1.1* a été isolé plusieurs fois de façon indépendante lors du criblage dans la levure. Cette redondance suggère que, parmi les 4 gènes de défensines isolés, *AhPDF1.1* pourrait être celui qui est le plus fortement exprimé dans les feuilles d'*A.*

Nom de la lignée	Nombre de plantes analysées	Nombre de plantes sensibles	Plantes sensibles à la kanamycine (%)	Valeurs du khi-deux	Valeurs de p (%)
1	273	71	26,0	0,15	74
2	105	25	23,8	0,08	81
3	267	71	26,6	0,36	60
4	267	65	24,3	0,06	83
5	249	22	8,8	34,7	0
6	163	43	26,4	0,17	72
7	133	33	24,8	0,003	97
8	135	33	24,4	0,02	90

Tableau III.3. Analyse de ségrégation du caractère de résistance à la kanamycine pour les lignées transgéniques transformées par le vecteur pGreen0029 contenant *AhPDF1.1*.

Les plantes ont été cultivées *in vitro* pendant 8 jours sur un milieu MS/2 contenant de la kanamycine ($100 \mu\text{g.ml}^{-1}$).

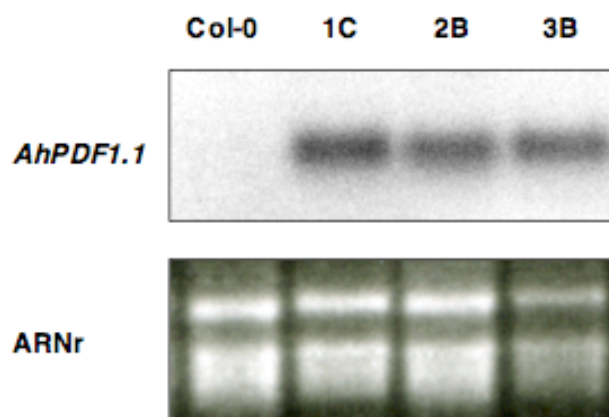


Figure III.17. Détection des messagers hybridant avec la sonde *AhPDF1.1* chez *A. thaliana* Col-0 et chez 3 lignées transgéniques 35S::*AhPDF1.1*.

Les plantes transgéniques de 3 lignées (1C, 2B, 3B) et les plantes témoins non transformées (Col-0) ont été cultivées *in vitro* sur milieu MS/2 pendant 3 semaines. Les ARN des feuilles ont été analysés par northern blot, en utilisant l'ADNc *AhPDF1.1* en pleine longueur comme sonde. La coloration au bromure d'éthidium des ARNr permet la quantification des ARN totaux chargés sur le gel.

halleri cultivées en présence de zinc. Cet ADNc a donc été choisi pour la surexpression *in planta*.

Ce chapitre détaille l'obtention des lignées transgéniques, le comportement de ces lignées vis-à-vis du zinc mais également vis-à-vis d'autres métaux.

A. Caractérisation des lignées transgéniques 35S::AhPDF1.1 d'*A. thaliana*

A.1. Obtention des lignées transgéniques 35S::AhPDF1.1

Des plants d'*A. thaliana* ont été transformés par des ADN-T comprenant la séquence codante *AhPDF1.1* sous le contrôle du promoteur 35S, via *Agrobacterium tumefaciens*. Huit transformants indépendants résistants à la kanamycine ont été obtenus. La ségrégation du caractère de résistance à la kanamycine a été analysée sur la génération T1. Sur les huit lignées, sept présentent une ségrégation du caractère de résistance à la kanamycine proche de la ségrégation théorique due à un locus unique d'insertion de l'ADN-T dans le génome (3/4 ; 1/4). Le test du khi-deux confirme que ces 7 lignées ne comportent qu'un locus d'insertion de l'ADN-T ($p > 0,6$) (Tableau III.3).

Parmi les sept lignées mono-locus, trois ont été amenées à l'état homozygote en génération T2. Les plantes homozygotes de la génération T2 et des générations suivantes sont nommées 1C, 2B, 3B. Les quatre autres lignées, qui ont été obtenues dans un second temps, sont en cours d'analyse et ne sont pas présentées dans ce travail.

Avant de procéder au phénotypage de ces plantes transgéniques, nous avons vérifié qu'elles exprimaient le transgène *AhPDF1.1*, et ce, au niveau du messager et de la protéine.

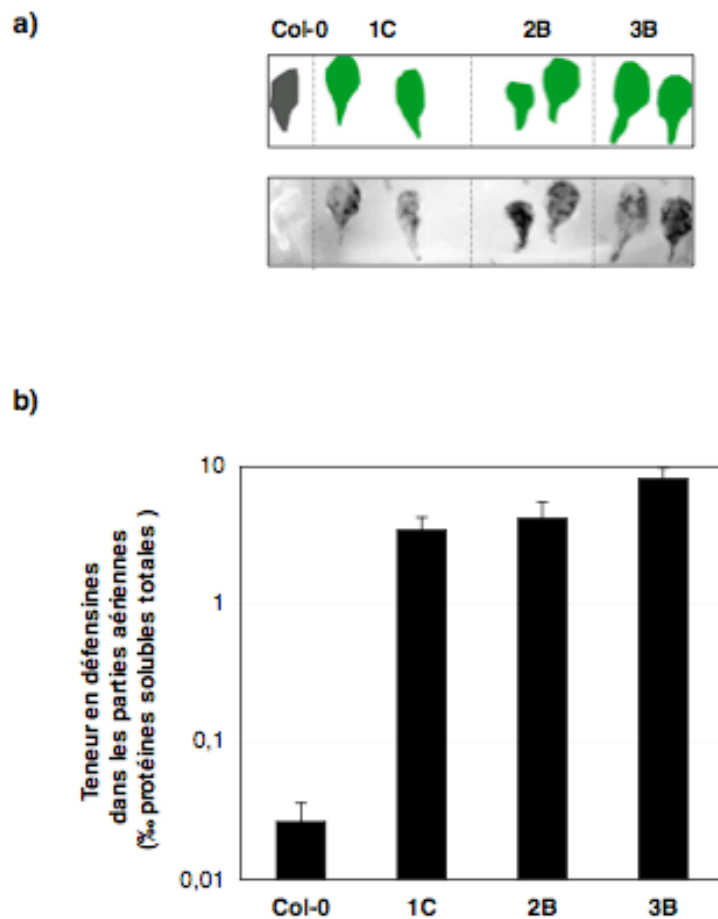


Figure III.18. Immunodétection de défensines dans les parties aériennes des lignées transgéniques 35S::*AhPDF1.1* ou de plantes témoins.

a) Immunodétection réalisée à partir d'une empreinte de feuilles de plantes transgéniques 35S::*AhPDF1.1* (lignées 1C, 2B et 3B) et de plantes témoins (Col-0)

b) Analyse par test ELISA compétitif de l'accumulation des défensines dans les lignées transgéniques 35S::*AhPDF1.1* (1C, 2B et 3B) et dans les plantes non-transformées (Col-0). Les plantes ont été cultivées en hydroponie pendant 4 semaines. L'extrait protéique des parties aériennes a été utilisé dans des tests ELISA de type compétitif, en utilisant le sérum anti-RsAFP2. La teneur en défensines est donnée par le rapport entre la quantité de défensines détectée et la quantité totale de protéines solubles dans l'extrait, dosée par la méthode de Bradford. Les barres représentent les écart-types ($n \geq 3$).

A.2. Analyse de l'expression du transgène *AhPDF1.1* dans les lignées transgéniques 35S::*AhPDF1.1*

Des analyses de northern blot ont été réalisées pour détecter l'accumulation des transcrits *AhPDF1.1* dans les 3 lignées transgéniques 1C, 2B et 3B. L'ADNc *AhPDF1.1* en pleine longueur a été utilisé comme sonde. Aucun signal n'est détecté dans les plantes témoins non transformées (Col-0) (Figure III.17). Dans les plantes transgéniques, le signal détecté est intense suggérant une forte accumulation des messagers *AhPDF1.1* (Figure III.17). On ne décèle pas de différence d'accumulation des messagers en fonction des lignées testées.

Les plantes des 3 lignées transgéniques 35S::*AhPDF1.1* expriment le transgène *AhPDF1.1*. Qu'en est-il de l'accumulation de la protéine ?

A.3. Analyse de l'accumulation des protéines *AhPDF1.1* dans 3 lignées transgéniques 35S::*AhPDF1.1*

La défensine *AhPDF1.1* d'*A. halleri* présente une forte identité (89% pour la protéine entière, 92% pour la partie mature) avec la défensine RsAFP2 de radis. Nous avons donc utilisé un sérum anti-RsAFP2 pour analyser l'accumulation de défensines dans les lignées transgéniques.

Nous avons d'abord vérifié que ce sérum nous permettait de détecter la protéine *AhPDF1.1*. Pour cela, nous avons réalisé un test d'empreinte sur tissu. Des feuilles de plantes transgéniques (lignées 1C, 2B, 3B) et de plante témoin (Col-0) ont été pressées sur une membrane de nylon. Cette membrane a été incubée avec le sérum anti-RsAFP2, puis avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. Une fois révélée, cette empreinte a montré que le sérum permettait de détecter un signal fort chez les plantes transgéniques et très faible chez la plante témoin (Figure III.18a). Il semble donc que le sérum anti-RsAFP2 permette la détection de la protéine *AhPDF1.1*. Ceci a été vérifié par des expériences de western blot sur des extraits protéiques d'*A. halleri*, les résultats seront présentés dans le troisième chapitre des résultats.

En utilisant la protéine Rs-AFP2 purifiée, nous avons pu mener des tests ELISA de type compétitif. La teneur en défensines dans les parties aériennes des lignées transgéniques 35S::*AhPDF1.1* ainsi que celle des plantes témoins non transformées a été déterminée. Cette teneur est exprimée par le rapport de la quantité de défensines détectée sur la quantité de protéines totales solubles dans le tampon d'extraction (Figure III.18b). Les plantes témoins non transformées (Col-0) accumulent 0,03‰ ($\pm 0,01$) de défensines dans leurs parties aériennes, alors que les trois lignées transgéniques testées (1C, 2B, 3B) accumulent respectivement 3,45‰ ($\pm 0,83$) ; 4,19‰ ($\pm 1,32$) et 8,17‰ ($\pm 1,63$) de défensines. La teneur en défensines dans les parties aériennes est ainsi environ 150 (lignées 1C, 2B) ou 300 (lignée 3B) fois plus élevée chez les plantes transgéniques que les plantes témoins.

Les plantes transgéniques 35S::*AhPDF1.1* des 3 lignées analysées montrent donc une forte accumulation de défensines.

B. Phénotype des plantes transgéniques 35S::*AhPDF1.1* vis-à-vis du zinc

Arabidopsis thaliana est une espèce non tolérante au zinc. Nous avons voulu déterminer si la production d'une défensine d'*A. halleri* dans les lignées transgéniques d'*A. thaliana* pouvait influencer sur la tolérance de ces plantes vis-à-vis du zinc. Afin de contrôler la quantité de zinc dans le milieu et de pouvoir analyser un grand nombre de plantes en conditions reproductibles, les plantes ont été cultivées *in vitro*, dans une chambre de culture. Les graines ont été mises à germer directement sur des milieux enrichis en zinc. Le phénotype de ces plantes a été analysé selon trois critères : (i) la masse sèche des parties aériennes, (ii) la survie des plantes, (iii) le contenu en zinc dans les parties aériennes.

B.1. Biomasse des plantes transgéniques 35S::AhPDF1.1 de la lignée 1C sur une gamme de concentrations de zinc

Les graines de plantes transgéniques 35S::AhPDF1.1 (lignée 1C) et de plantes témoins ont été mises à germer *in vitro* sur du milieu MS/2 additionné de différentes concentrations de zinc : 0, 200, 400, 500, 600, ou 700 μM . Les plantes transgéniques se développent de façon identique aux plantes témoins (Col-0) sur milieu MS/2 sans zinc ajouté (Figure III.19a). Aucune différence de croissance n'est détectée sur 200 μM . En revanche, lorsqu'elles sont cultivées sur 400 μM , les plantes transgéniques présentent une meilleure tolérance au zinc que les plantes témoins. Cette différence de comportement s'accroît sur 500 μM , les plantes transgéniques étant chlorophylliennes, alors que les plantes témoins sont chlorotiques et cessent leur croissance (Figure III.19a). Sur 600 et 700 μM de zinc, les plantes transgéniques présentent des chloroses et leur croissance est affectée. Cependant les plantes transgéniques parviennent à développer les 2 premières feuilles alors que les plantes témoins ne dépassent pas le stade cotylédonaire.

Pour quantifier ces observations phénotypiques, la masse sèche des parties aériennes a été mesurée pour les plantes de la lignée 1C et les plantes témoins cultivées sur la même gamme de concentrations de zinc (0 à 700 μM) (Figure III.19b). Les matières sèches ont été mesurées pour des lots de 12 plantes, avec un minimum de 5 mesures par traitement, puis les valeurs ont été ramenées à la masse d'une plante. Sur milieu MS/2 sans zinc ajouté, la matière sèche par plante ne diffère pas entre les plantes transgéniques ($1,39 \text{ mg.plante}^{-1} \pm 0,31$) et les plantes témoins ($1,51 \text{ mg.plante}^{-1} \pm 0,18$). Sur des concentrations de zinc inférieures à 200 et 400 μM , on n'observe pas de différence de matière sèche entre les plantes transgéniques et les plantes témoins. Au contraire, pour des concentrations de 500 et 700 μM de zinc ajouté, nous observons une

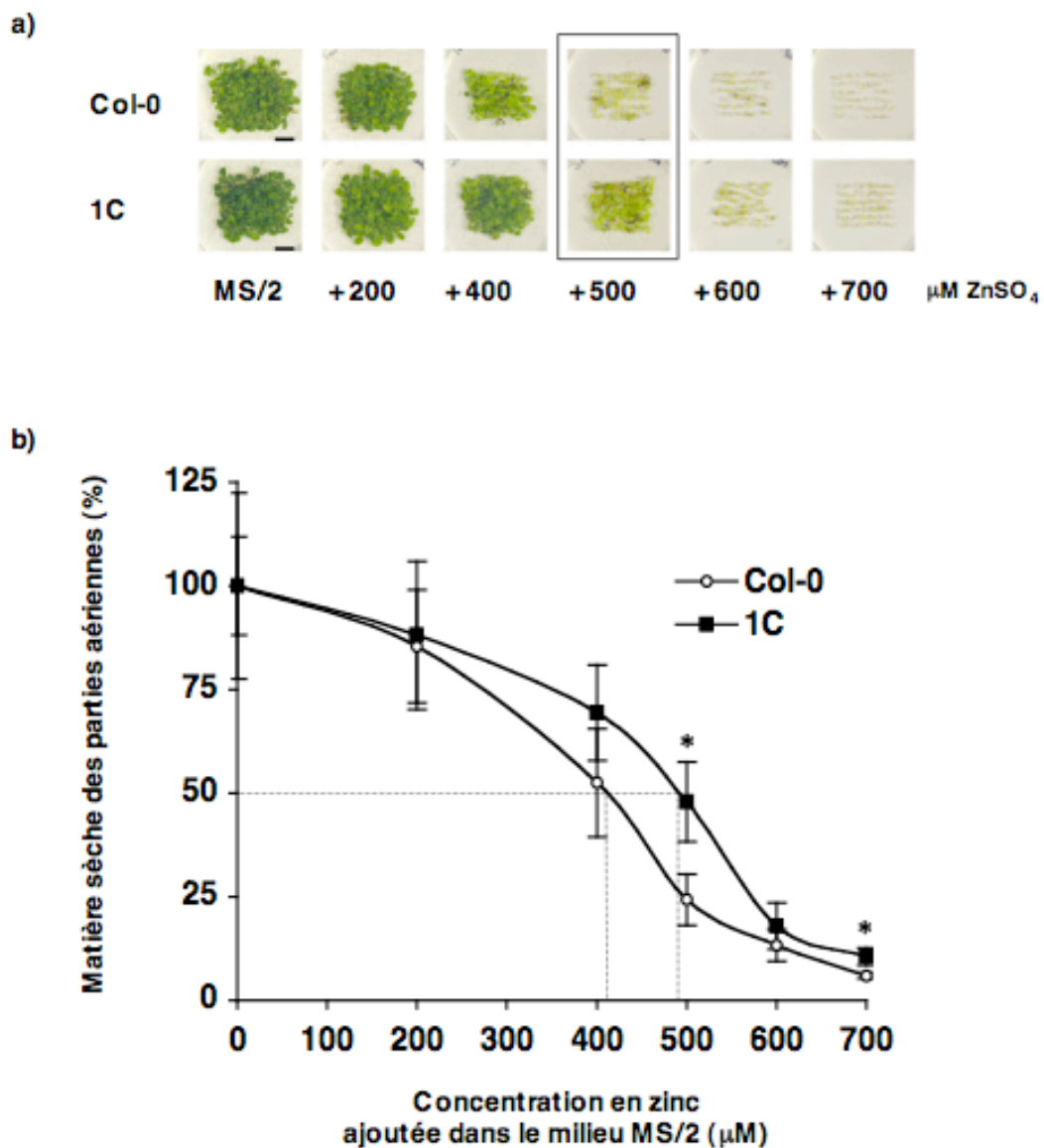


Figure III.19. Phénotype de tolérance au zinc des plantes transgéniques 35S::*AhPDF1.1* de la lignée 1C.

Les plantes ont été cultivées *in vitro* sur un milieu MS/2, additionné de différentes concentrations de zinc comme indiqué. Les parties aériennes ont été récoltées 16 jours après germination.

a) Phénotype des plantes transgéniques (1C) et témoins (Col-0), photographiées avant la récolte. L'échelle est donnée par les barres de 1 cm. L'encadré indique la concentration optimale de phénotypage (500 μM).

b) Matière sèche des parties aériennes, déterminée pour des lots de 12 plantes. La moyenne représente au minimum 5 mesures. Les résultats sont donnés en pourcentage de la matière sèche sur le milieu MS/2. Les astérisques (*) indiquent une différence statistique avec $p < 0,01$ (test de Student).

différence statistique (test de Student, $p < 0,01$) de masse sèche entre les plantes transgéniques de la lignée 1C et les plantes témoins. La masse sèche des plantes de la lignée 1C ($0,67 \text{ mg.plante}^{-1} \pm 0,13$) est environ 2 fois supérieure à celle des plantes témoins ($0,37 \text{ mg.plante}^{-1} \pm 0,09$) sur $500 \mu\text{M}$ de zinc, et 1,8 fois supérieure sur $700 \mu\text{M}$ de zinc ($0,15 \text{ mg.plante}^{-1} \pm 0,03$ pour les plantes de la lignée 1C, $0,09 \text{ mg.plante}^{-1} \pm 0,01$ pour les plantes témoins). Néanmoins sur $600 \mu\text{M}$, les résultats ne sont pas statistiquement interprétables. Les valeurs de matières sèches ont été rapportées à la valeur de matière sèche obtenue pour les plantes cultivées sur MS/2, et exprimées en pourcentage (Figure III.19b). Ceci permet de définir, par extrapolation, la valeur de concentration de zinc sur laquelle la masse sèche des plantes est égale à 50% de la masse sèche sur milieu MS/2 sans zinc ajouté. Cette valeur est environ de $410 \mu\text{M}$ de zinc pour les plantes témoins (Col-0) et de $490 \mu\text{M}$ de zinc pour les plantes transgéniques (lignée 1C) (Figure III.19b).

Il apparaît donc que les plantes transgéniques de la lignée 1C tolèrent mieux l'effet toxique de fortes concentrations de zinc que les plantes non transformées. De plus, l'étude du comportement des plantes de la lignée 1C nous a permis de définir la concentration de $500 \mu\text{M}$ de zinc comme la concentration la mieux adaptée, dans nos conditions de culture, afin de mettre en évidence le phénotype des plantes transgéniques vis-à-vis du zinc.

L'ensemble de ces données montre clairement une corrélation entre la surexpression d'une défensine d'*A. halleri* chez *A. thaliana* et la tolérance des plantes au zinc.

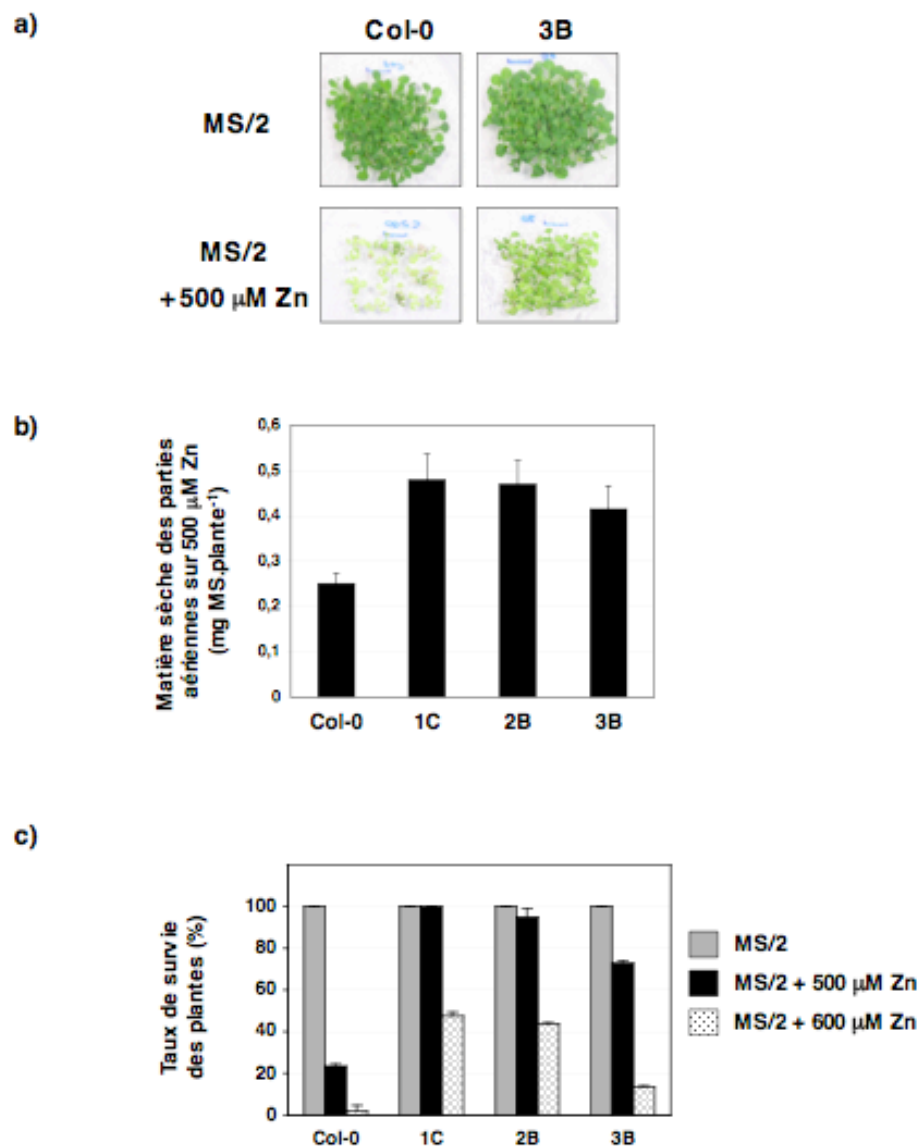


Figure III.20. Phénotype de tolérance au zinc des plantes transgéniques 35S::AhPDF1.1.

Les plantes de 3 lignées transgéniques (1C, 2B, 3B) et les plantes témoins (Col-0) ont été cultivées *in vitro* sur un milieu MS/2 complété ou non par des concentrations toxiques de zinc (500 ou 600 µM).

a) Phénotype des plantes de la lignée 3B en comparaison avec Col-0. L'échelle est donnée par les barres de 1 cm.

b) Matière sèche des parties aériennes de plantes cultivées sur MS/2 + 500 µM de zinc, 16 jours après germination. Les pesées sont effectuées pour des lots de 30 plantes, les écart-types représentent les mesures pour 2 lots.

c) Le taux de survie des plantes est estimé par le pourcentage de plantes ayant développé des feuilles chlorophylliennes par rapport au nombre total de plantes ayant germé. Chaque comptage porte sur un minimum de 20 plantes. Les barres représentent les écart-types (n=2).

B.2. Biomasse des plantes transgéniques 35S::AhPDF1.1 de 3 lignées cultivées sur des milieux enrichis en zinc

Pour compléter l'étude présentée ci-dessus sur la lignée 1C, les plantes des lignées 1C, 2B et 3B ont donc été cultivées sur du milieu MS/2 additionné ou non de 500 μM de zinc. Un phénotype de tolérance au zinc identique à celui des plantes de la lignée 1C est observé pour les plantes de la lignée 3B (Figure III.20a) et 2B (non présenté). Les matières sèches ont été mesurées pour des lots de 30 plantes, avec 2 mesures par point, puis les valeurs ont été ramenées à une masse par plante. Sur milieu MS/2 sans zinc ajouté, la matière sèche par plante ne diffère pas statistiquement entre les plantes transgéniques (en mg.plante^{-1} : lignée 1C : $1,62 \pm 0,37$; lignée 2B : $1,52 \pm 0,01$; lignée 3B : $1,97 \pm 0,05$) et les plantes témoins ($2,06 \text{ mg.plante}^{-1} \pm 0,42$). En revanche la matière sèche des parties aériennes est de 1,7 (lignée 3B) à 1,9 (lignées 1C et 2B) plus élevée chez les plantes transgéniques que chez les plantes témoins lorsque le traitement de 500 μM de zinc est appliqué (Figure III.20b). Ces résultats sont cohérents avec ceux décrits précédemment pour la lignée 1C. Ils nous amènent à conclure que les plantes des 3 lignées transgéniques 35S::AhPDF1.1 présentent une meilleure tolérance que les plantes témoins face à une concentration toxique en zinc (500 μM).

B.3. Effet de fortes concentrations de zinc sur les premiers stades de développement des plantes transgéniques 35S::AhPDF1.1

Nous avons observé précédemment que, sur de fortes concentrations de zinc, les plantes transgéniques des lignées 1C, 2B et 3B parvenaient à développer leurs 2 premières feuilles alors que les plantes témoins ne dépassaient pas le stade cotylédonaire.

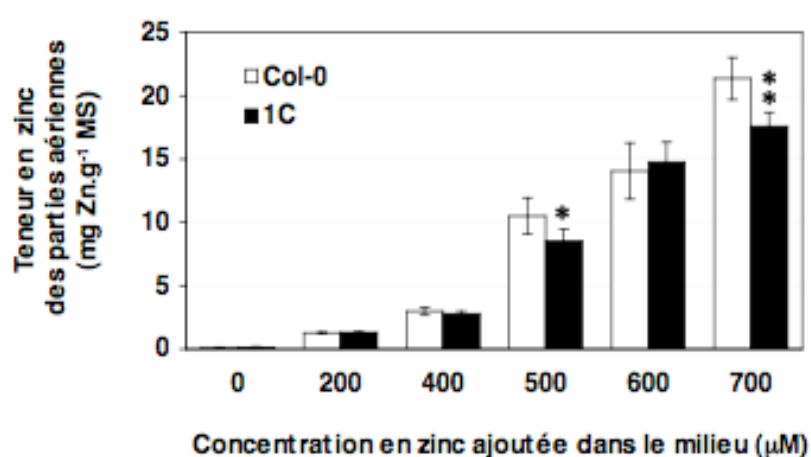


Figure III.21. Analyse du contenu en zinc des parties aériennes de plantes transgéniques 35S::AhPDF1.1 de la lignée 1C en fonction de la concentration en zinc du milieu.

Les plantes ont été cultivées *in vitro* sur un milieu MS/2, additionné de différentes concentrations de zinc comme indiqué. Les parties aériennes ont été récoltées 16 jours après germination. Le contenu en zinc des parties aériennes est déterminé par dosage au spectrophotomètre de flamme, après minéralisation. La moyenne représente au minimum 5 mesures effectués sur des lots de 12 plantes. Les astérisques (*ou**) indiquent une différence statistique avec respectivement $p < 0,05$ ou $p < 0,01$ (test de Student).

Afin de quantifier ce phénotype, nous avons déterminé, pour deux concentrations de zinc (500 et 600 μM), le pourcentage de plantes ayant développé des feuilles chlorophylliennes pour chacune des 3 lignées (1C, 2B, 3B) ainsi que pour les plantes témoins (Col-0). Le graphique de la figure III.20c montre que 100% des plantes se développent sur un milieu MS/2 sans zinc ajouté. En revanche, seulement 23% des plantes témoins ayant germé sur 500 μM de zinc poursuivent leur développement 16 jours après germination. Ce pourcentage est respectivement de 100, 95, et 73% pour les lignées transgéniques 1C, 2B et 3B. Sur 600 μM de zinc, seulement 2% des plantes témoins se développent contre 14 (lignée 3B) à 48% (lignée 1C) des plantes transgéniques. Le pourcentage de plantes ayant développé des feuilles est donc 3 à 4 fois plus élevé pour les lignées transgéniques que pour les plantes témoins sur 500 μM de zinc, et de 7 à 25 fois plus élevé sur 600 μM de zinc.

Il semble donc que les premiers stades de développement des plantules, après la germination, soient moins fortement affectés par la présence de zinc (500 ou 600 μM) chez les plantes transgéniques 35S::*AhPDF1.1* des 3 lignées analysées que chez les plantes témoins non transformées.

B.4. Analyse du contenu en zinc des plantes transgéniques 35S::*AhPDF1.1* de la lignée 1C

Les plantes transgéniques 35S::*AhPDF1.1* présentent une tolérance vis-à-vis de fortes concentrations en zinc par rapport à des plantes non transformées. Nous avons voulu déterminer si cette tolérance était liée à une différence d'accumulation de zinc dans les parties aériennes.

Le contenu en zinc des parties aériennes a été analysé, après minéralisation, par dosage au spectrophotomètre de flamme (Figure III.21). Pour toutes les plantes

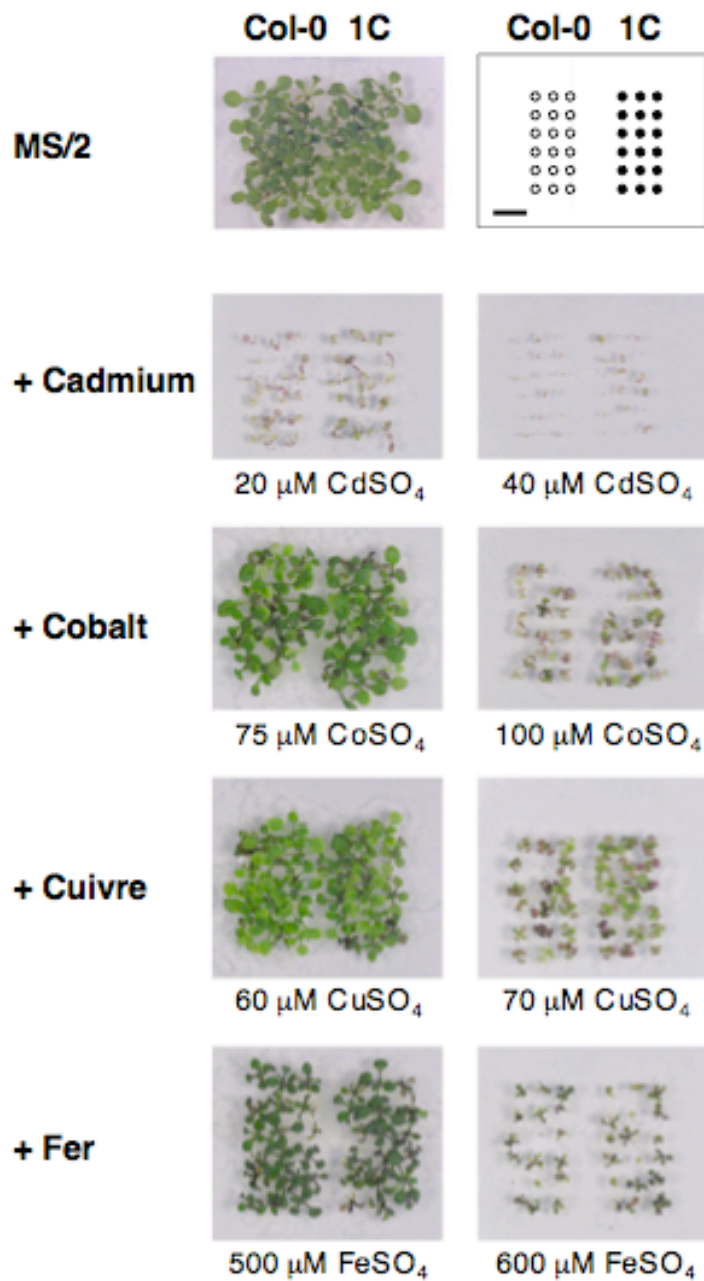


Figure III.22. Phénotype des plantes transgéniques 35S::AhPDF1.1 de la lignée 1C cultivées *in vitro* sur des milieux enrichis en différents métaux lourds.

Les plantes transgéniques (lignée 1C) et témoins (Col-0) ont été cultivées *in vitro* sur un milieu MS/2 additionné de différentes concentrations en cadmium, cobalt, cuivre ou fer comme indiqué. Les photographies illustrent la croissance des plantes 16 jours après germination. Le schéma indique le plan suivi pour le semis des graines, la barre donne l'échelle (1 cm).

analysées, l'accumulation de zinc dans les parties aériennes augmente avec la concentration en zinc dans le milieu. Cependant, sur 500 et 700 μM de zinc, on observe une accumulation statistiquement moins forte (test de Student, $p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement) chez les plantes transgéniques de la lignée 1C que chez les plantes contrôles.

C. La tolérance des plantes produisant AhPDF1.1 se limite-t-elle au zinc ?

Le phénotype des plantes transgéniques a été étudié sur différents métaux : cadmium, cobalt, cuivre, fer et nickel. Des expériences préliminaires ont été nécessaires afin de déterminer les concentrations adéquates pour illustrer le phénotype des plantes transgéniques de la lignée 1C. Ces concentrations doivent, pour chacun des métaux, permettre la germination des plantules, tout en inhibant le développement des plantes. Deux concentrations ont été choisies pour chaque métal, comme l'illustre la figure III.22 : 20 et 40 μM pour le cadmium), 75 et 100 μM pour le cobalt, 60 et 70 μM pour le cuivre, 500 et 600 μM pour le fer.

Le cadmium présente la plus forte toxicité : dès 20 μM la croissance des plantes a été très fortement affectée, les plantules, chlorotiques et anthocyanées, n'ont pas dépassé pas le stade cotylédonaire. Sur 40 μM de cadmium, seules quelques plantules sont parvenues à germer. On n'observe pas de différence quantifiable de comportement entre les plantes transgéniques de la lignée 1C et les plantes témoins (Figure III.22).

Sur 100 μM de cobalt et 70 μM de cuivre, les plantules anthocyanées, n'ont pas dépassé pas le stade des 2 premières feuilles. Les photographies des plantes sur les concentrations de 75 μM de cobalt et 60 μM de cuivre sont montrées dans le but d'illustrer l'étroitesse de la fenêtre de concentration de métal nécessaire au phénotypage (Figure III.22). À ces concentrations légèrement plus faibles, les plantes se développent

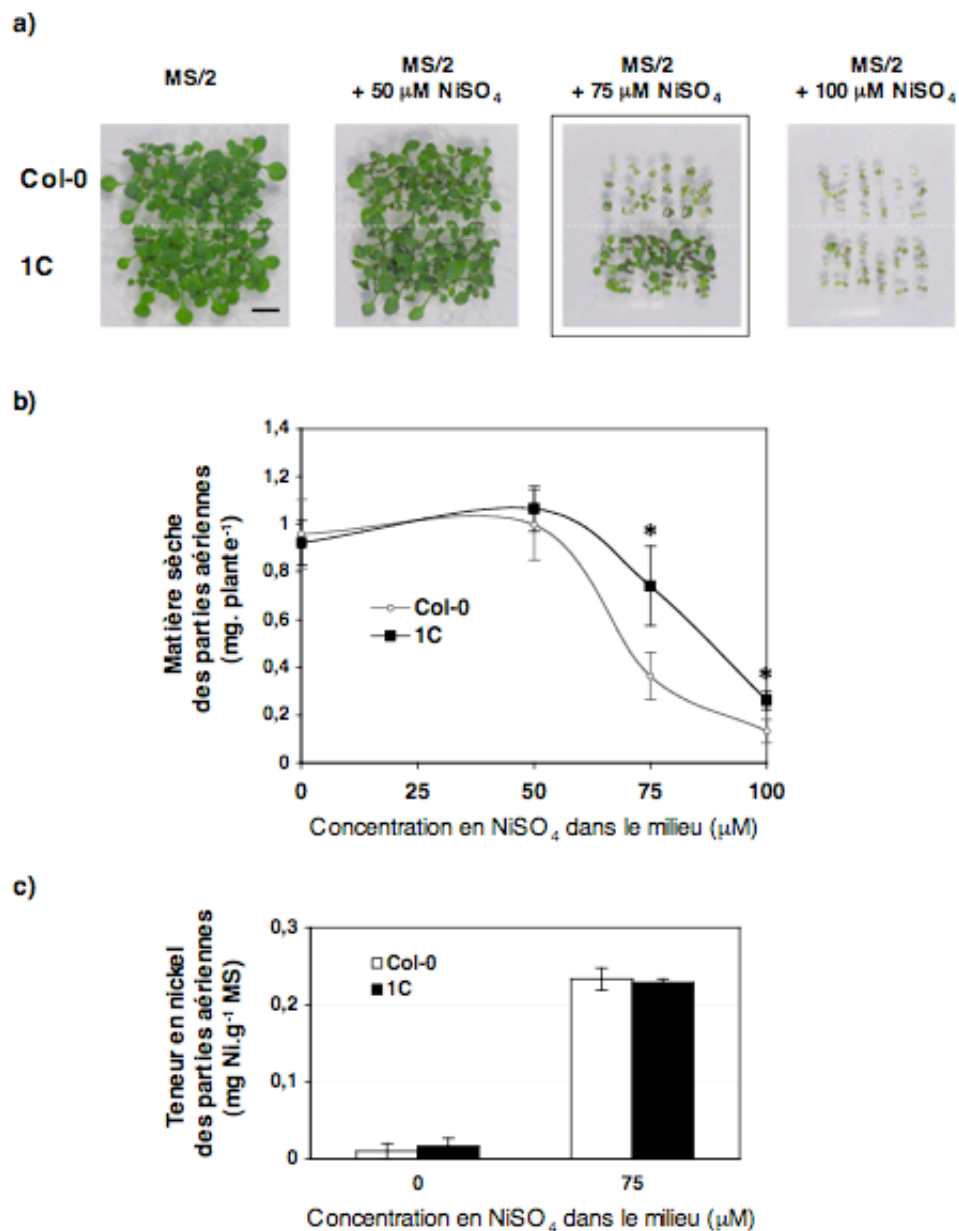


Figure III.23. Phénotype de tolérance au nickel des plantes transgéniques 35S::AhPDF1.1 de la lignée 1C.

Les plantes ont été cultivées *in vitro* sur un milieu MS/2, additionné de différentes concentrations de nickel comme indiqué.

a) Phénotype des plantes transgéniques (1C) et témoins (Col-0), 16 jours après germination. L'échelle est donnée par la barre de 1 cm. L'encadré illustre la concentration optimale pour visualiser le phénotype.

b) Matière sèche (MS) des parties aériennes récoltées 16 jours après germination, déterminée pour des lots de 3 plantes. Les résultats sont donnés en mg de MS par plante. Les barres représentent les écart-types ($n \geq 3$). Le symbole (*) indique une différence statistique avec $p < 0,02$ (test de Student).

c) Contenu en nickel des parties aériennes après minéralisation. Chaque mesure est réalisée sur un lot de 3 plantes. Les valeurs représentent la moyenne et l'écart-type de quatre mesures.

et sont chlorophylliennes. Les plantes transgéniques de la lignée 1C et les plantes témoins ont montré le même développement sur des concentrations toxiques de cobalt et de cuivre.

Les concentrations utilisées pour observer la croissance des plantes en présence de fer sont proches de celles décrites précédemment pour le zinc. Dans ce cas également la fenêtre possible est étroite : sur 500 μM de fer, la croissance des plantules a été retardée mais non stoppée, la couleur des plantules suggère une forte teneur en chlorophylle, liée à la toxicité du fer. Sur 600 μM de fer, les plantules n'ont pas dépassé le stade des 2 premières feuilles. La croissance des plantes transgéniques de la lignée 1C est identique à celle des plantes témoins (Figure III.22).

En conclusion, la croissance des plantes transgéniques de la lignée 1C est affectée de la même façon que celle des plantes témoins sur des concentrations de cadmium (20 ou 40 μM), de cobalt (75 ou 100 μM), de cuivre (60 ou 70 μM), de fer (500 ou 600 μM). Les plantes transgéniques de la lignée 1C ne présentent donc pas de phénotype de tolérance ni de sensibilité par rapport aux métaux testés : cadmium, cobalt, cuivre et fer.

En revanche il apparaît que les plantes transgéniques de la lignée 1C sont plus tolérantes au nickel que les plantes contrôles, ce phénotype étant particulièrement visible sur 75 μM de nickel (Figure III.23a). Les matières sèches des plantes cultivées sur une gamme de concentrations de nickel ont été mesurées. À partir de 75 μM de nickel, la croissance des plantes contrôles est très affectée, la matière sèche ne représentant plus que 35% de la matière sèche sur milieu sans nickel ajouté. La croissance des plantes transgéniques, en revanche, n'est globalement pas affectée si l'on regarde la matière sèche par plante (Figure III.23b). Le contenu en nickel des parties aériennes ne diffère pas entre les plantes transgéniques et les plantes témoins (Figure III.23c).

En conclusion, les plantes transgéniques de la lignée 1C présentent une tolérance à de fortes concentrations de zinc (500 μM) mais également de nickel (75 μM).

Conclusion du second chapitre des résultats

A. La surexpression des défensines d'*A. halleri* chez *A. thaliana* confère une tolérance au zinc

Par transgénèse, nous avons obtenu des lignées d'*A. thaliana* qui surproduisent la défensine AhPDF1.1 d'*A. halleri*. La transformation de ces plantes n'a pas affecté leur croissance en conditions « normales » de culture, que ce soit en terreau, en hydroponie ou *in vitro*. Ces plantes ont été testées pour leur tolérance vis-à-vis de différents métaux lourds. Lorsqu'elles sont cultivées *in vitro* en présence d'une concentration en zinc de 500 μM , ces plantes transgéniques montrent clairement un phénotype de tolérance accru au zinc, en comparaison avec les plantes témoins non transformées. Cette tolérance a pu être quantifiée par la masse de matière sèche (2 fois supérieure pour les plantes transgéniques) et la viabilité des plantules. En revanche, aucun différentiel de croissance n'a pu être mis en évidence entre les plantes transgéniques et les plantes témoins lorsqu'elles sont cultivées en présence de faibles concentrations de zinc, que ce soit en système *in vitro* ou en hydroponie. Sur des concentrations en zinc supérieures à 600 μM , toutes les plantes, transgéniques ou non, sont fortement affectées. Le phénotype de tolérance est donc délicat à mettre en évidence, mais il a été clairement établi pour les lignées 1C, 2B et 3B. Notons cependant que l'analyse fine n'a été menée que sur une lignée et que cette analyse devra donc être complétée sur les autres lignées, y compris sur celles qui ont été obtenues plus tardivement.

Sur de faibles concentrations de zinc (inférieures à 400 μM en culture *in vitro*), les mécanismes de l'homéostasie du zinc, qui sont naturellement en place chez *A. thaliana*, lui permettent de faire face à la toxicité due au zinc. Les plantes peuvent croître et poursuivre leur cycle de développement jusqu'à la floraison, bien que leur biomasse soit diminuée. Dans ces conditions de culture, la surexpression, par transgénèse, de la défensine AhPDF1.1 n'améliore pas les conséquences de la toxicité du zinc de façon phénotypique et quantifiable. En revanche, sur des milieux où la

concentration en zinc met en danger la survie d'*A. thaliana*, la surexpression de la défensine AhPDF1.1 améliore clairement la croissance des plantes lors des premiers stades de développement, et permet à la plante de poursuivre plus avant son cycle de développement. Par conséquent, on peut distinguer deux niveaux de stress dus à la présence de zinc dans le milieu de culture : un niveau toléré par la plante *A. thaliana* et qualifié de sub-létal, et un niveau létal. Ces deux niveaux de stress doivent mettre en jeu des processus différents à l'échelle moléculaire. Il semble ainsi qu'il existe un seuil de toxicité du zinc à partir duquel la défensine AhPDF1.1 pourrait jouer un rôle dans la tolérance. Néanmoins, pour des concentrations de zinc très toxiques toutes les plantes sont affectées, la fenêtre de concentration de zinc pour laquelle les PDF améliorent la tolérance des plantes au zinc est donc étroite.

Ces résultats nous permettent néanmoins d'établir une corrélation originale entre la surexpression d'une défensine de plante chez une espèce sensible au zinc et l'acquisition d'un niveau de tolérance accru au zinc, et suggèrent que la défensine AhPDF1.1 joue un rôle dans la tolérance au zinc *in planta*.

B. Les plantes transgéniques 35S::AhPDF1.1 accumulent moins de zinc que les plantes témoins

En culture *in vitro*, les plantes transgéniques 35S::AhPDF1.1 accumulent significativement moins de zinc dans leurs parties aériennes que les plantes témoins. Des résultats obtenus sur des plantes cultivées en hydroponie indiquent également une accumulation réduite de zinc dans les racines et dans les parties aériennes pour certaines lignées (non montré). Ceci pourrait résulter d'une réduction de l'absorption racinaire de zinc ou de la translocation du zinc des racines vers les parties aériennes. La tolérance au zinc observée dans les lignées transgéniques serait alors la conséquence d'un processus d'exclusion du zinc et ne serait donc pas liée à une hyperaccumulation. Notons que les caractères de tolérance au zinc et d'hyperaccumulation de zinc sont indépendants chez *A. halleri* (Macnair *et al.*, 1999), il est donc concevable que l'expression d'un transgène dans la plante conduise à un phénotype de tolérance sans phénotype d'hyperaccumulation. Néanmoins, ces résultats diffèrent de ceux obtenus en levure. En

effet, les levures exprimant AhPDF1.1 suraccumulent le zinc. Ces résultats soulignent le fait que les mécanismes mis en place à l'échelle unicellulaire ne peuvent pas être transposés de façon systématique à l'échelle de l'organisme.

Ce phénotype d'accumulation réduite de zinc implique un rôle des PDF au niveau notamment des racines. En effet, l'expression du transgène sous le contrôle du promoteur 35S ne permet pas de cibler l'expression dans un organe particulier. Les PDF sont en effet exprimées au niveau des racines dans les plantes transgéniques (non montré). Or les ADNc de défensines ont été isolés à partir d'une banque d'ADNc d'*A. halleri* provenant de parties aériennes, suggérant que, chez *A. halleri*, les défensines jouent un rôle dans les parties aériennes. Le chapitre suivant des résultats confirmera l'importance des défensines dans les parties aériennes d'*A. halleri*. L'utilisation d'un promoteur spécifique des parties aériennes pourrait s'avérer intéressante pour déterminer si l'on retrouve un tel phénotype « d'excluser », ou si ce phénotype est une conséquence de l'utilisation du promoteur 35S.

Enfin, notons que, ces plantes transgéniques n'étant pas hyperaccumulatrices de zinc, elles ne sont pas de bons candidats pour la phytoremédiation.

C. La surexpression des défensines d'*A. halleri* chez *A. thaliana* confère également une tolérance au nickel

À notre connaissance, aucune donnée bibliographique ne permet à ce jour d'établir un phénotype de tolérance chez *A. halleri* vis-à-vis du nickel. Néanmoins, des protoplastes d'*A. halleri* présentent une tolérance significativement supérieure au nickel que ceux d'*A. lyrata* (Marquès *et al.*, 2004), espèce proche mais non tolérante aux métaux. De plus, lorsqu'elle est cultivée en hydroponie en présence de 10 μM de nickel, *A. halleri* est capable d'accumuler le métal dans ses parties aériennes (0,25 mg Ni.g⁻¹ MS) alors qu'on ne détecte pas d'accumulation foliaire de nickel chez *A. lyrata*, espèce non tolérante aux métaux (Marquès *et al.*, 2004). Cette translocation du métal vers les parties aériennes, si elle ne montre pas de tolérance chez *A. halleri*, suggère, avec la tolérance des protoplastes au nickel, qu'il pourrait exister des mécanismes de tolérance au nickel dans les parties aériennes chez *A. halleri*.

Chez des espèces hyperaccumulatrices de nickel, les mécanismes de moléculaires de la tolérance impliquent deux catégories de molécules : (1) les transporteurs qui assurent la détoxification du cytoplasme, (2) les chélateurs qui prennent en charge le nickel pour le rendre moins toxique. Les transporteurs de la famille CDF (Persans *et al.*, 2001) assurent le stockage du nickel principalement dans la vacuole (Krämer *et al.*, 2000; Küpper *et al.*, 2001). La chélation est assurée par des acides organiques ou aminés comme l'histidine chez *Alyssum lesbiacum* (Krämer *et al.*, 1996), et par la nicotianamine lors du transport dans le xylème chez *T. caerulescens* (Vacchina *et al.*, 2003).

Chez *A. thaliana*, la surexpression de la nicotianamine synthase permet l'augmentation de la teneur en nicotianamine (jusqu'à 100 fois), et conduit à l'accumulation de nickel dans les parties aériennes (jusqu'à 70% de nickel en plus, par rapport aux plantes non transformées, Pianelli, 2004). Au contraire, lorsqu'elles sont cultivées sur un milieu contenant du nickel, les plantes 35S::*AhPDF1.1*, bien que tolérantes au nickel, n'accumulent pas plus de nickel dans leurs parties aériennes que les plantes témoins. Ces arguments permettent de conclure que le rôle joué par les défensines dans la tolérance au nickel pourrait impliquer un mécanisme différent de celui de la chélation, ouvrant de nouvelles perspectives quant à l'étude de la tolérance au nickel chez les plantes.

D. Les plantes transgéniques 35S::*AhPDF1.1* accumulent de fortes quantités de défensines

Plusieurs données bibliographiques rapportent la surproduction de défensines chez les plantes en vue d'augmenter la résistance antifongique (Terras *et al.*, 1995; Gao *et al.*, 2000; Francois *et al.*, 2002). Cependant, le niveau d'expression du transgène est en général assez faible, de l'ordre de 0,003% (p/p par rapport aux protéines totales) par exemple pour la surproduction de RsAFP2 chez *A. thaliana*. Ce niveau a pu être augmenté par co-expression d'une autre défensine (DmAMP1), pour atteindre 0,3% (Francois *et al.*, 2002). Nous avons obtenu par transgénèse un fort niveau d'expression d'une défensine d'*A. halleri* chez *A. thaliana* puisque le niveau global d'accumulation

des défensines dans les parties aériennes est jusqu'à 300 fois supérieur (0,8%) chez les plantes transgéniques par rapport aux plantes témoins. Cette suraccumulation pourrait éventuellement être liée à la stabilité de la protéine AhPDF1.1. Ces plantes transgéniques sont donc une ressource privilégiée, non seulement pour l'étude du rôle des défensines dans le métabolisme des métaux, mais également pour la compréhension des réponses de défense dans la lutte contre les champignons phytopathogènes. Ainsi l'étude du phénotype de ces plantes face à une attaque fongique pourra permettre de valider l'intérêt agronomique d'une surproduction de défensines d'*A. halleri in planta*.

E. Les défensines jouent un rôle dans la tolérance au zinc *in planta* chez *A. halleri*

Deux hypothèses peuvent être avancées quant à la tolérance au zinc conférée par une défensine d'*A. halleri* chez *A. thaliana*.

La première hypothèse repose sur la chélation du zinc par les groupes thiols des résidus cystéines des défensines. Cette hypothèse, développée dans la conclusion du premier chapitre, est en contradiction avec les deux observations suivantes. Premièrement, les plantes transgéniques 35S::*AhPDF1.1* ne présentent pas de phénotype de tolérance vis-à-vis du cadmium ni du cuivre, deux métaux qui peuvent être potentiellement chélatés par les groupements thiols des cystéines, au même titre que le zinc. Deuxièmement, les plantes transgéniques 35S::*AhPDF1.1* qui accumulent jusqu'à 300 fois plus de défensines que les plantes témoins, n'accumulent pas plus de zinc, indiquant que les défensines ne créent pas de « puits » à zinc dans ces plantes. Or la surexpression de chélateurs de métaux dans les plantes peut conduire à une suraccumulation de métaux, comme c'est le cas des plantes surexprimant la nicotianamine synthase de *Thlaspi caerulescens* (Pianelli *et al.*, 2005).

Les plantes transgéniques ont des teneurs en zinc moins élevées dans leurs parties aériennes et racinaires, suggérant que l'homéostasie du zinc est perturbée dans ces plantes. En s'appuyant sur les données concernant le mode d'action antifongique des défensines qui passe par la perturbation de flux ioniques dans l'hyphe mycélienne, nous pouvons proposer que l'action de cette défensine pourrait passer par le biais de

modifications de l'accumulation des ions. Pour tester cette hypothèse, des expériences d'électrophysiologie sur des ovocytes de Xénope produisant AhPDF1.1 pourraient être envisagées afin de rechercher des modifications de flux ioniques par rapport à des ovocytes non transformés. De plus, dans l'hypothèse d'une modulation de flux ioniques grâce aux PDF, l'interaction des PDF avec des partenaires protéiques est une possibilité. Dans le but d'identifier de tels partenaires éventuels, des expériences de double-hybride en levure ont été engagées au laboratoire, en utilisant AhPDF1.1 comme appât.

Chapitre 3

Etude de l'expression des défensines chez l'espèce tolérante et hyperaccumulatrice de zinc *Arabidopsis halleri*

Préambule

Les ADNc de défensines d'*A. halleri* ont été isolés à partir d'une banque d'ADNc de feuilles provenant de plants d'*A. halleri* cultivés en présence de zinc. L'expression des gènes correspondant à ces ADNc se limite-t-elle aux parties aériennes ou les messagers sont-ils également présents dans les racines ? L'accumulation des messagers est-elle influencée après un traitement des plantes par le zinc ? Qu'en est-il de l'accumulation des protéines AhPDF ?

A. Vers l'identification exhaustive des membres de la famille multigénique des défensines chez *A. halleri*

Lors du criblage de la banque d'ADNc dans la levure, nous avons identifié 4 ADNc correspondant à 4 gènes *PDF* chez *A. halleri*. Ces 4 gènes appartiennent à la sous-famille 1 des défensines. Or il existe 3 sous-familles de *PDF* chez *Arabidopsis*

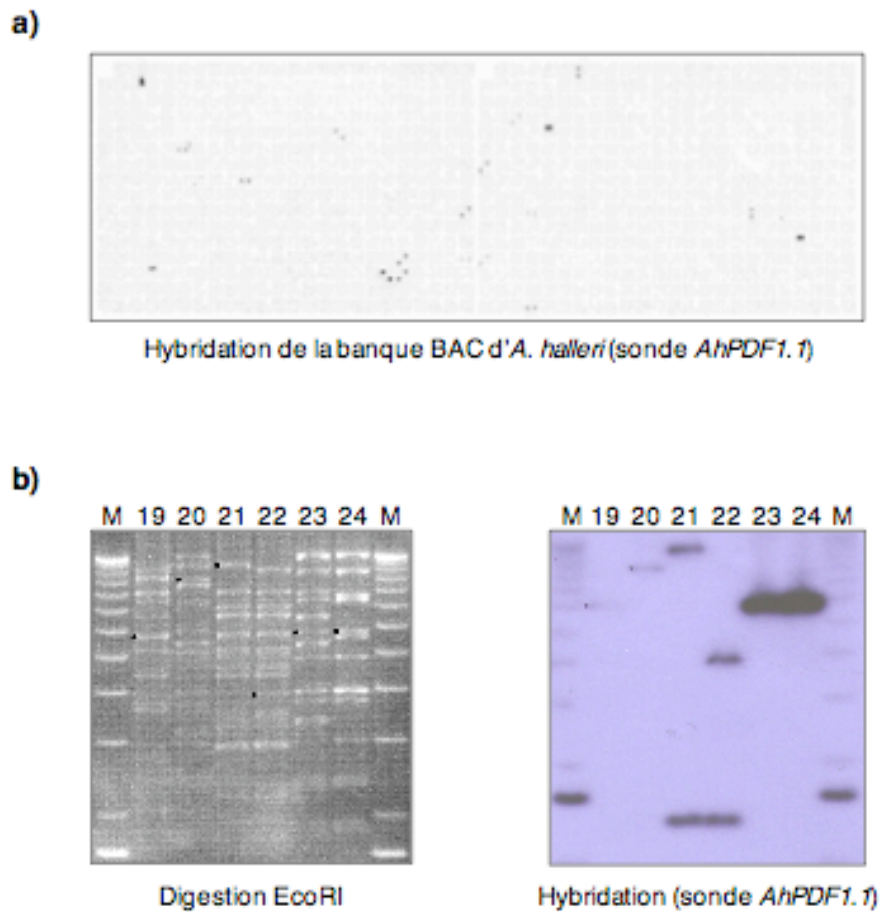


Figure III.24. Identification des clones BAC issus de la banque d'*A. halleri* hybridant avec la sonde *AhPDF1.1*.

a) Les filtres à haute densité de la banque BAC ont été hybridés avec la sonde *AhPDF1.1* (ADNc en pleine longueur). Vingt-quatre clones ont ainsi été identifiés.

b) Les ADN extraits des clones BAC identifiés en a) ont été digérés par EcoRI. Le gel (à gauche) présente les digestions des clones n°19 à 24. Le marqueur de taille est indiqué (M). L'autoradiographie correspondant au gel est obtenue par Southern blot avec la sonde *AhPDF1.1* (à droite).

thaliana (Thomma *et al.*, 2002). Existe-t-il de la même façon, chez *A. halleri*, d'autres gènes appartenant à cette famille 1 ou à d'autres familles ?

Afin d'estimer le nombre de gènes de défensines chez *A. halleri*, nous avons d'abord réalisé une expérience de Southern blot sur de l'ADN génomique, en utilisant l'ADNc *AhPDF1.1* comme sonde. Cette expérience de Southern blot (non présentée) a montré l'existence de 4 à 5 loci. Cependant, chez *A. thaliana* les gènes *PDF* sont fréquemment placés en tandem à l'exemple de *AtPDF1.3-AtPDF1.2b* (At2g26010, At2g26020) et *AtPDF1.2a-AtPDF1.2c* (At5g44420, At5g44430); ou encore en « double tandem » comme *AtPDF2.2-AtPDF2.1-AtPDF2.3-AtPDF2.6* (At2g02100, At2g02120, At2g02130, At2g02140). Les copies successives ne sont parfois séparées que par quelques milliers de bases. Il est donc probable que chacun des 4 à 5 loci identifiés chez *A. halleri* puisse contenir plusieurs copies de gène de défensines organisés en tandem.

Une banque BAC d'*A. halleri* a été réalisée dans l'équipe (Loubet *et al.*, en préparation). Nous avons donc criblé cette banque avec la sonde *AhPDF1.1*, afin d'isoler les différents BAC hybridant avec la sonde. Les travaux préliminaires de cette étude sont présentés en figure III.24. Grâce à l'hybridation de la banque BAC avec la sonde *AhPDF1.1*, vingt-quatre clones BAC ont été identifiés (Figure III.24a). La redondance de la banque étant de 5 équivalent génomes, nous confirmons qu'il existe environ 5 ($24 \div 5$) loci de défensines chez *A. halleri*. Une expérience de Southern blot utilisant cette même sonde à partir de ces BAC montre que certains contiennent probablement plusieurs copies de gènes de défensines, d'après la différence de l'intensité du signal entre les différentes pistes (Figure III.24b).

Les BAC contenant des copies de gènes de défensines ayant été identifiés, le sous-clonage de fragments de ces BAC contenant ces copies est en cours. Cette approche nous permettra (i) d'identifier éventuellement d'autres membres de la sous-famille *AhPDF1* ou d'autres sous-familles chez *A. halleri*, (ii) d'avoir accès aux séquences promotrices de ces gènes, en particulier *AhPDF1.1*. L'identification des séquences promotrices permettra l'étude de la régulation des gènes de défensines en particulier dans la réponse aux métaux lourds.



Figure III.25. Accumulation des messagers hybridant avec la sonde *AhPDF1.1* dans les parties aériennes et les racines chez *A. halleri*.

Les plantes ont été cultivées en terreau pendant 3 mois puis repotées sur une terre contenant 5000 ppm de zinc pendant 1 semaine. Les ARN des parties aériennes (F) et des racines (R) sont analysés par northern blot, en utilisant l'ADNc *AhPDF1.1* comme sonde. La coloration au bleu de méthylène des ARNr permet la quantification des ARN totaux chargés sur le gel.

B. Localisation de l'expression des défensines chez *A. halleri*

B.1. Les messagers de défensines s'accumulent dans les parties aériennes chez *A. halleri*

L'expression des gènes de défensines a été analysée par northern blot dans les plants d'*A. halleri* ayant servi à l'extraction des ARN pour la construction de la banque d'ADNc. Ces plants d'*A. halleri*, cultivés en terreau pendant 3 mois, ont été rempotés sur terre contaminée en zinc puis les parties aériennes et les racines ont été récoltées après 1 semaine. La sonde utilisée pour le northern blot correspond à l'ADNc *AhPDF1.1* dans sa pleine longueur. La proximité des séquences nucléotidiques des ADNc de défensines isolées chez *A. halleri* ne permet pas de définir une sonde spécifique pour une analyse en northern blot. La sonde utilisée hybride au moins avec les ADNc *AhPDF1.1*, *AhPDF1.2*, *AhPDF1.3* et *AhPDF1.4*. Cette sonde a permis de détecter l'accumulation des messagers de défensines dans les parties aériennes (Figure III.25). Cependant, dans nos conditions d'hybridation, aucune accumulation des messagers n'est détectée dans les racines (Figure III.25).

D'après ces résultats, l'expression des gènes de défensines est majoritairement localisée dans les parties aériennes chez *A. halleri*. Nous avons donc restreint la suite de l'étude à l'expression des défensines dans les parties aériennes.

B.2. Détection des protéines PDF chez *A. halleri*

Un sérum dirigé contre une défensine de radis (RsAFP2) a été utilisé afin de détecter, par des analyses de western blot, la présence de défensines dans les parties aériennes chez *A. halleri*.

Des extraits protéiques ont été réalisés à partir de plantes d'*A. halleri* et *A. thaliana* âgées de 5 semaines et cultivées en terreau.

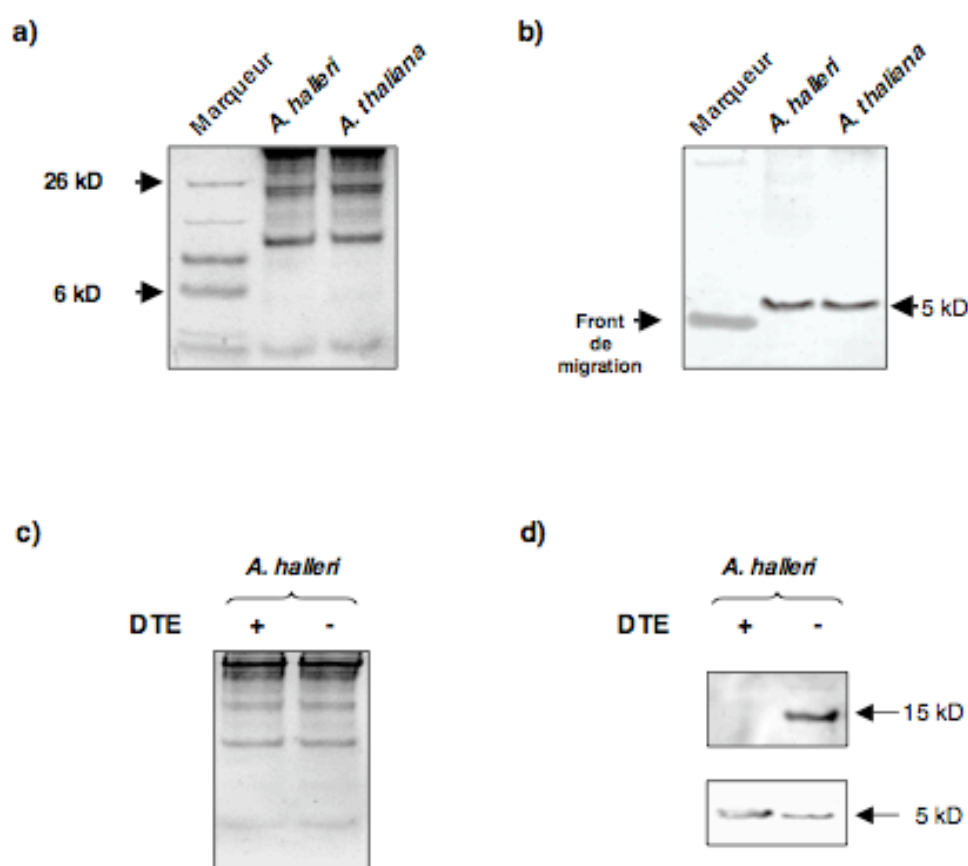


Figure III.26. Identification de différentes formes de défenses dans les parties aériennes d'*A. halleri* et *A. thaliana*.

Des plantes d'*A. halleri* et d'*A. thaliana* ont été cultivées en terreau pendant 5 semaines puis des extraits protéiques ont été réalisés à partir des parties aériennes en présence ou absence de DTE.

a) Électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Dix microgrammes de protéines totales sont déposés par piste. Les tailles du marqueur de poids moléculaire (Marqueur), sont données en kiloDaltons (kD).

b) Western-blot réalisé à partir du gel présenté en (a), en utilisant un sérum dirigé contre la défensine de radis RsAFP2. La flèche indique les bandes observées pour les deux extraits. Le front de migration est également indiqué.

c) Électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Dix microgrammes de protéines totales provenant d'extraits protéiques réalisés en présence ou absence de DTE sont déposés par piste.

d) Western-blot réalisé à partir du gel présenté en (c), en utilisant un sérum dirigé contre la défensine de radis RsAFP2. Pour des raisons techniques, la membrane est présentée en deux parties. Les flèches indiquent les bandes observées spécifiquement dans l'extrait -DTE (15 kD) ou communes aux deux extraits (5 kD).

La visualisation de protéines de petite taille n'est pas aisée, et plusieurs mises au point des conditions de détection ont dues être réalisées. Les protéines ont été séparées par électrophorèse SDS-PAGE en gel d'acrylamide (10/18%) dans un tampon Tris-tricine (Figure III.26a). Après transfert, les protéines ont été fixées sur la membrane par un traitement glutaraldéhyde (12,5%) qui améliore la fixation des petites protéines.

Un extrait protéique réalisé à partir de feuilles d'*A. thaliana* a été utilisé comme contrôle. Dans les deux extraits d'*A. thaliana* et *A. halleri*, le sérum anti-RsAFP2 a permis la détection d'une unique bande, très proche du front de migration, et dont la taille peut être estimée entre 3 et 5 kD (Figure 26b). En effet, l'estimation de la taille des petites protéines est délicate car elles peuvent ne pas être uniformément chargées en SDS. Néanmoins, ce poids moléculaire apparent est cohérent avec la masse moléculaire des protéines matures calculée d'après la séquence polypeptidique (5,71 ; 5,54 ; 5,57 ; 5,71 kD pour les protéines AhPDF1.1, AhPDF1.2, AhPDF1.3 et AhPDF1.4, respectivement).

Dans la littérature, la formation de multimères de défensines en l'absence d'agents réducteurs dans l'extrait protéique a été décrite pour des défensines extraites de différentes espèces de Brassicacées (Terras *et al.*, 1993). Nous avons préparé un extrait protéique à partir de feuilles d'*A. halleri*, sans ajout de DTE (Figure III.26c). L'analyse en western blot de cet extrait a montré la présence d'une bande supplémentaire, aux alentours de 15 kD, ainsi que d'une bande de très faible intensité aux alentours de 20 kD (Figure III.26d). La présence de ces formes protéiques spécifiques à l'extrait sans traitement réducteur suggère que les défensines d'*A. halleri* pourraient former des multimères d'au moins 3 ou 4 sous-unités, stabilisés par des ponts disulfures intermoléculaires. Cependant nous n'avons pas déterminé si cette oligomérisation est un effet de l'extraction ou si elle a une signification *in vivo*.

D'après les résultats décrits ci-dessus, les PDF détectées chez *A. halleri* correspondraient, selon leur taille, à la partie mature seule sans le peptide signal. En effet, le poids moléculaire de la protéine entière est d'environ 8 kD. De plus, les résultats obtenus par micro-séquençage puis par RMN de la protéine RsAFP1 purifiée (Terras *et al.*, 1992; Fant *et al.*, 1998) ont montré que la forme mature de la protéine ne

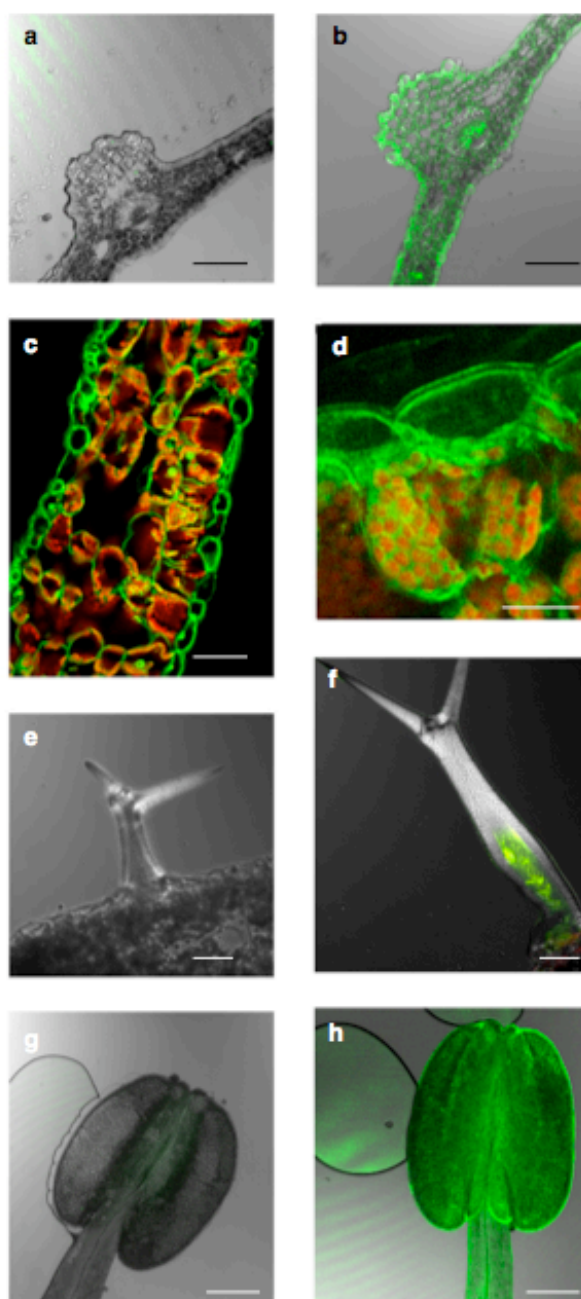


Figure III.27. Immunolocalisation réalisée sur des coupes de feuilles, des trichomes et anthères et d'*A. halleri*.

Des plantes d'*A. halleri* ont été cultivées en hydroponie pendant 8 semaines. Après fixation des tissus, des coupes de 50 μm ont été réalisées au vibratome, incubées avec un sérum anti-RsAFP2, puis avec un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (Alexa 488) et ensuite observées au microscope confocal. Les images ont été collectées séparément par deux canaux permettant de visualiser soit la fluorescence du fluorochrome (a,b,e,f,g,h) couplé à l'anticorps secondaire. Les images (a), (e) et (g) présentent des témoins pour lesquels l'incubation a été réalisée avec l'anticorps secondaire seul. (a,b) coupes de feuille avec la nervure principale ; (c,d) coupe de feuille et agrandissement de cellules épidermiques, la fluorescence est superposée avec l'émission de la chlorophylle ; (e,f) trichomes, (g,h) anthères. Les barres représentent 200 μm (a,b,g,h), 50 μm (c,e,f) ou 20 μm (d).

comprenait pas de peptide signal. Ce peptide signal prédit une localisation extracellulaire. Qu'en est-il de la localisation des défensines chez *A. halleri* ?

B.3. Immunolocalisation des défensines dans les parties aériennes chez *A. halleri*

Grâce à l'utilisation du sérum anti-RsAFP2, des expériences d'immunolocalisation ont été réalisées à partir de coupes de feuilles d'*A. halleri* (Figure III.27). Ces coupes ont subi deux traitements immunologiques : le premier avec un sérum anti-RsAFP2, le second avec un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. Lors de l'excitation du fluorochrome, un fort signal est détecté sur les coupes (Figure III.27b,c,d,f,h), par observation au microscope confocal. Ce signal est absent lorsque les coupes n'ont été traitées qu'avec l'anticorps secondaire (Figure III.27a,e,g), indiquant que le signal provient effectivement de la détection des anticorps anti-RsAFP2. Sur les coupes de feuilles d'*A. halleri*, le signal est détecté au niveau de l'épiderme mais également du mésophylle, et au niveau des tissus conducteurs (Figure III.27b). Plus précisément, la fluorescence est localisée au niveau pariétal et cuticulaire (Figure III.27c,d) mais également au niveau cytoplasmique (Figure III.27d). Aucune fluorescence liée au fluorochrome n'est observée dans les chloroplastes, ni dans la vacuole (Figure III.27d). Des coupes partielles de trichomes ont également pu être analysées. La fluorescence est détectée à l'intérieur de la majorité des trichomes (plus de 95% des cas, Figure III.27f). Enfin, au niveau des fleurs, la fluorescence est détectée de façon intense dans les anthères, sans qu'une localisation plus précise puisse être déterminée pour ces organes (Figure III.27h). Aucun signal n'a été détecté dans les pétales (non montré).

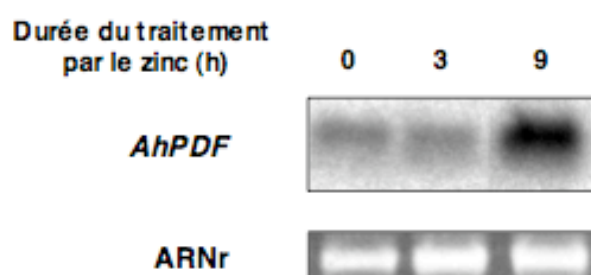


Figure III.28. Effet d'un traitement par le zinc sur l'accumulation de messagers de défenses dans les parties aériennes chez *A. halleri*.

Les plantes ont été cultivées en hydroponie pendant 2 mois sur un milieu contenant $10 \mu\text{M}$ ZnSO_4 , puis une concentration de 1 mM ZnSO_4 a été appliquée pendant 0, 3 ou 9 heures.

Les ARN extraits des parties aériennes sont analysés par northern blot, en utilisant l'ADNc *AhPDF1.1* comme sonde. La coloration au bromure d'éthidium des ARNr permet la quantification des ARN totaux chargés sur le gel.

Ces résultats suggèrent que, dans les parties aériennes d'*A. halleri*, les PDF sont présentes au niveau des feuilles, à la fois dans les parois et dans le cytoplasme des cellules du mésophylle, et au niveau des anthères.

C. L'expression des défensines chez *A. halleri* répond-elle à un traitement des plantes par le zinc ?

C.1. L'accumulation des ARNm de défensines est augmentée dans les parties aériennes après un traitement des plantes par le zinc

Afin de mesurer l'effet d'un traitement par le zinc sur l'accumulation des messagers de défensines, des plants d'*A. halleri* âgés de 2 mois cultivés en hydroponie sur un milieu contrôle (10 μ M ZnSO₄) ont été traités par 1 mM de zinc. La réponse de l'expression des gènes à un traitement abiotique pouvant être transitoire, les plantes ont été prélevées après des temps courts de traitement : 0, 3 ou 9 heures. Les parties aériennes de ces plantes ont été utilisées pour l'analyse des messagers de défensines par northern blot. La sonde utilisée correspond à l'ADNc *AhPDF1.1* dans sa pleine longueur. Dans les parties aériennes, l'accumulation des messagers de défensines est détectée chez *A. halleri* avant le début du traitement (Figure III.28). Cette accumulation de messagers n'est pas modifiée après 3 heures de traitement. Cependant, après 9 heures de traitement des plantes en hydroponie sur 1 mM de zinc, le niveau d'accumulation global des messagers de défensines augmente dans les parties aériennes (Figure III.28).

D'après ces résultats, les défensines sont exprimées de façon constitutive dans les parties aériennes chez *A. halleri* cependant leurs messagers sont accumulés après un traitement par le zinc, suggérant que l'expression de certains gènes *PDF* pourraient être induite par le zinc. Parmi les 4 gènes de défensines isolés chez *A. halleri*, certains ont-ils une expression qui présente, de cette façon, une réponse au zinc ?

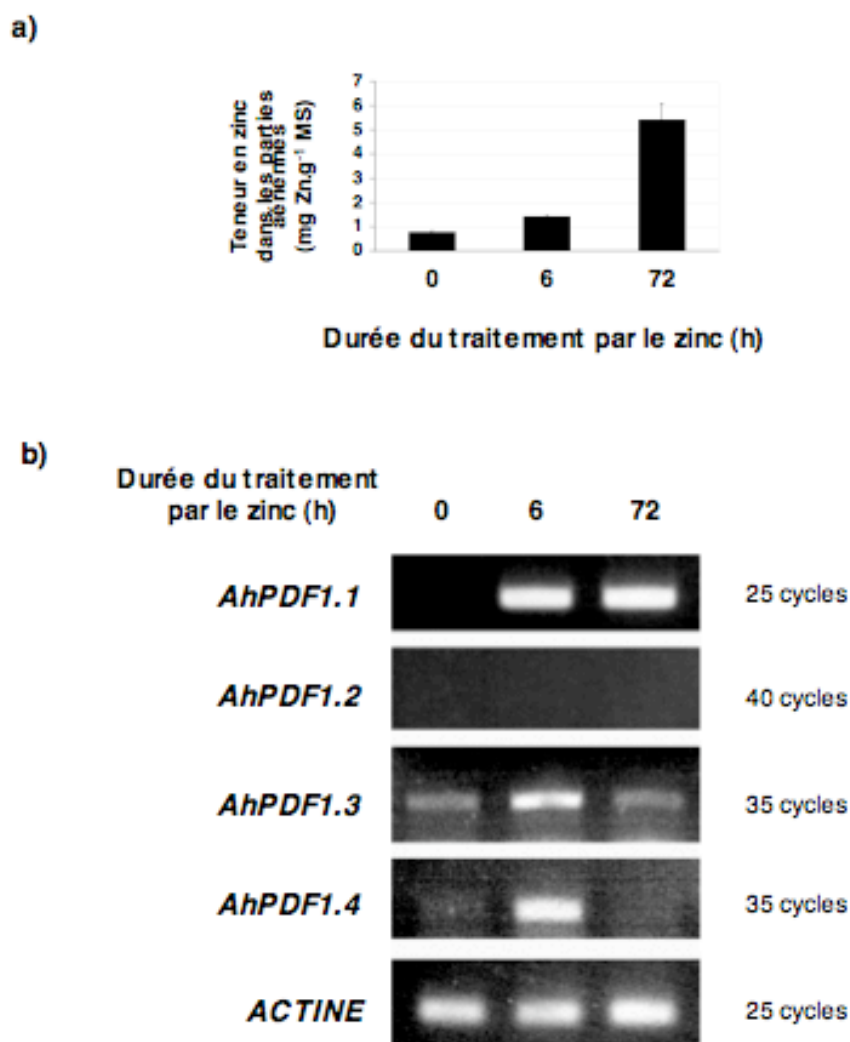


Figure III.29. Effet d'un traitement par le zinc sur la teneur en zinc et sur l'accumulation de messagers *AhPDF1.1*, *AhPDF1.2*, *AhPDF1.3* et *AhPDF1.4* dans les parties aériennes d'*A. halleri*.

Des plants d'*A. halleri* ont été cultivés en hydroponie pendant 8 semaines puis traités par 1 mM de ZnSO₄ pendant les temps indiqués (h : heures).

a) La quantité de zinc contenue dans les parties aériennes est mesurée grâce à un dosage spectrophotométrique utilisant le zincon. Les valeurs représentent la moyenne et l'écart-type des dosages de trois extraits.

b) Les ARN extraits des parties aériennes ont été analysés par RT-PCR, en utilisant une paire d'amorces spécifiques pour chacun des 4 gènes *AhPDF1* et pour l'actine qui sert de contrôle. Le nombre de cycles utilisés pour l'amplification est indiqué sur la droite.

C.2. Réponse de chacun des membres de la famille *PDF1* chez *A. halleri* suite à un traitement par le zinc

Pour déterminer le profil d'expression de chaque membre de la famille *PDF1* lors d'un traitement par le zinc, des analyses par RT-PCR ont été menées en utilisant des amorces spécifiques de chaque membre. Pour chaque couple d'amorces, l'amorce « sens » est choisie dans la partie codante alors que l'amorce « anti-sens » est choisie dans la région 3' UTR (Cf. Annexes). Ces amorces ont été validées par amplification sur de l'ADN génomique d'*A. halleri*.

Les plantes analysées ont été cultivées en hydroponie sur 10 μM de zinc pendant 5 semaines, puis traitées par 1 mM de zinc pendant 0, 6 et 72 heures. En parallèle, un dosage de zinc a été réalisé afin de vérifier que ces temps courts permettent néanmoins une accumulation de zinc dans les parties aériennes (Figure III.29a). La teneur en zinc (exprimée en ‰ soit en mg Zn.g^{-1} MS) est de 0,75‰ ($\pm 0,05$) sur le milieu contrôle (10 μM ZnSO_4) mais, sur le milieu contenant 1 mM de zinc, elle augmente pour atteindre 1,4‰ ($\pm 0,04$) après 6 heures de traitement, et 5,4‰ ($\pm 0,7$) après 72 heures de traitement. La teneur en zinc a donc été multipliée par un facteur 1,9 dès 6 heures de traitement et par un facteur 7 après 72 heures de traitement (Figure III.29a). Ces temps courts de traitement permettent donc une accumulation de zinc dans les parties aériennes.

L'expression des 4 gènes a été étudiée pour ces trois points de prélèvement : avant le traitement zinc, puis après 6 heures et 72 heures de traitement zinc.

Les messagers *AhPDF1.1* ne sont pas détectés avant le traitement par le zinc (Figure III.29b). Par contre, après 6 heures de traitement, les messagers *AhPDF1.1* sont détectés, et leur quantité semble atteindre un maximum et se stabiliser après 72 heures.

En outre, les messagers *AhPDF1.2* ne sont pas détectables dans les parties aériennes, que ce soit avant ou après le traitement par le zinc (Figure III.29b).

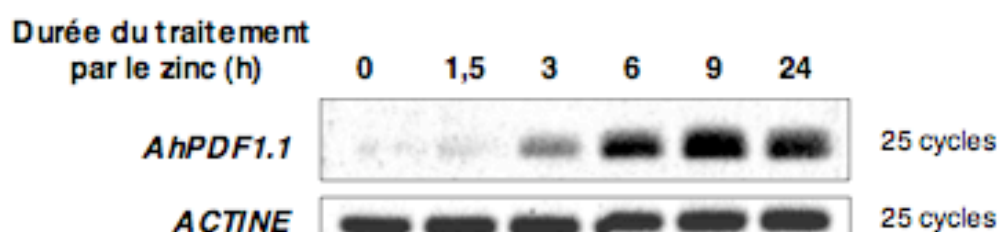


Figure III.30. Cinétique d'accumulation des messagers *AhPDF1.1* dans les parties aériennes d'*A. halleri* en réponse à un traitement par le zinc.

Des plants d'*A. halleri* ont été cultivés en hydroponie pendant 8 semaines puis traités par 1 mM $ZnSO_4$ pendant les temps indiqués (0 à 24 heures). Les ARN extraits des parties aériennes ont été analysés par RT-PCR, en utilisant une paire d'amorces spécifiques pour *AhPDF1.1* et pour l'actine qui sert de contrôle.

Les messagers *AhPDF1.3* et *AhPDF1.4* s'accumulent de façon transitoire après 6 heures de traitement zinc, mais cette accumulation n'est pas retrouvée après 72 heures. De plus, le nombre minimum de cycles d'amplification nécessaire à la détection des messagers est plus important pour les messagers *AhPDF1.3* et *AhPDF1.4* (40 cycles) que pour *AhPDF1.1* (25 cycles), suggérant que l'expression des gènes *AhPDF1.3* et *AhPDF1.4* pourrait être plus faible que celle du gène *AhPDF1.1*.

Ainsi, parmi les messagers des 4 membres de la famille *PDF1*, les messagers *AhPDF1.1* apparaissent comme les plus abondants dans les parties aériennes en réponse à un traitement par le zinc. Une cinétique plus fine a été réalisée pour déterminer le temps de traitement de zinc nécessaire à l'accumulation des messagers *AhPDF1.1*.

Dans ce but, des plantes d'*A. halleri* ont été cultivées en hydroponie sur 10 μ M de zinc pendant 5 semaines, traitées par 1 mM de zinc, puis prélevées après des temps courts de traitements : 0 ; 1,5 ; 3 ; 6 ; 9 et 24 heures. L'expression d'*AhPDF1.1* est très faiblement détectée avant le traitement par le zinc (Figure III.30), cependant dès 3 heures après le traitement la quantité de messagers *AhPDF1.1* augmente sensiblement. Après 6 heures de traitement, la quantité de messagers semble atteindre un maximum et se stabiliser jusqu'à 24 heures (Figure III.30).

Ces résultats semblent indiquer que les ARNm *AhPDF1.1* sont très faiblement accumulés dans les parties aériennes en conditions normales de culture des plantes. En revanche les messagers *AhPDF1.1* sont très rapidement accumulés, dès 3 heures, après un traitement des plantes par 1 mM de zinc.

D'après ces résultats, l'expression du gène *AhPDF1.1* semble être induite par le zinc.

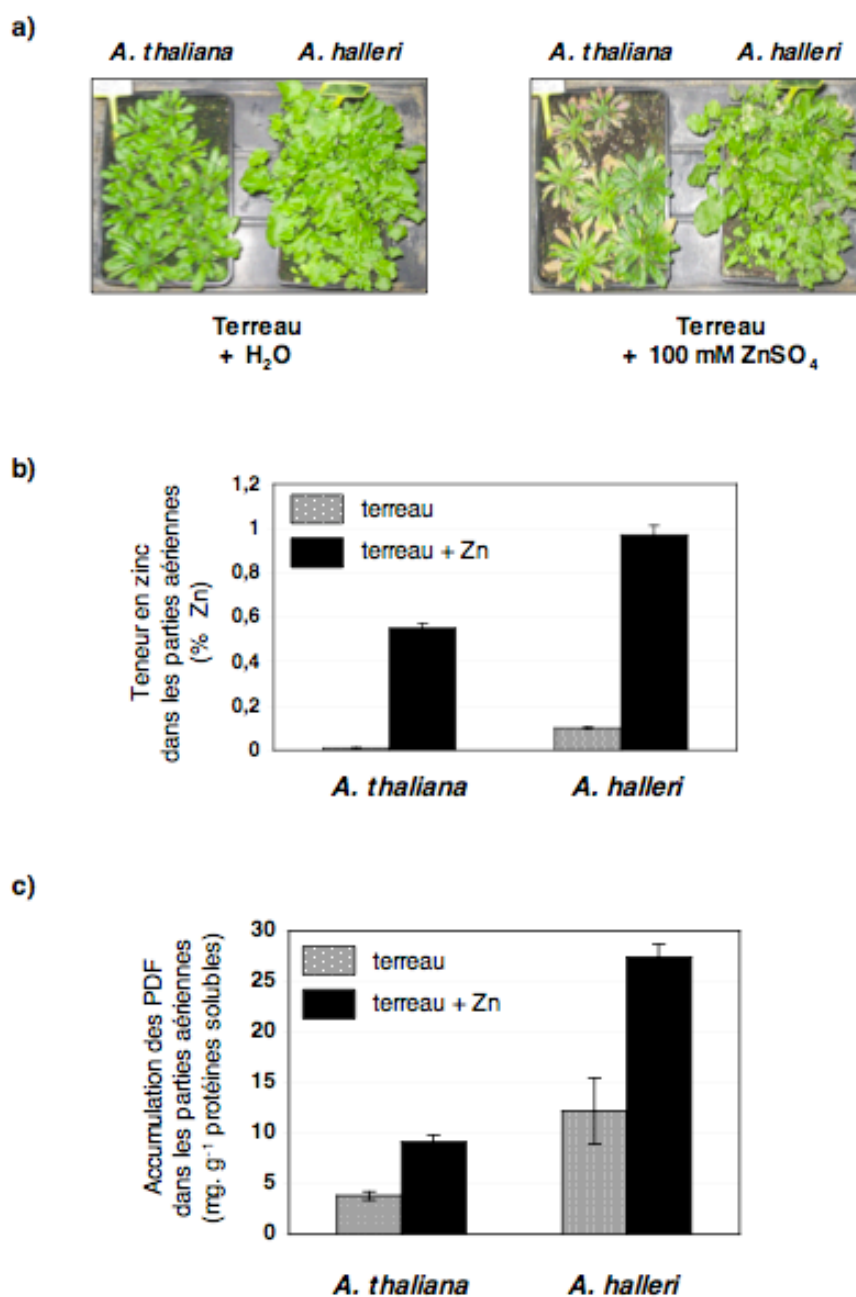


Figure III.31. Accumulation de défensines dans les parties aériennes d'*A. halleri* et *A. thaliana* en réponse à un traitement par le zinc.

a) Des plantes d'*A. halleri* et *A. thaliana* ont été cultivées en terreau pendant 5 semaines puis traités par 1 mM de zinc pendant 8 jours.

b) Teneur en zinc mesurée, après minéralisation des parties aériennes, par spectrophotométrie de flamme. Les résultats sont exprimés en %, soit par gramme de Zn pour 100 g de matière sèche. Les moyennes et les écarts-types sont donnés pour 3 dosages.

c) L'accumulation des défensines dans les parties aériennes est mesurée grâce à un test ELISA compétitif en utilisant un sérum dirigé contre RsAFP2. Le résultat est donné par rapport à la teneur de défensines chez *A. thaliana* cultivée sur terreau. Les moyennes et les écarts-types sont donnés pour 2 dosages.

C.3. Quel est l'effet du traitement par le zinc sur l'accumulation des protéines PDF chez *A. halleri* ?

Nous avons souhaité déterminer l'accumulation globale des défensines dans les parties aériennes en réponse à un traitement par le zinc. De plus, il nous a paru intéressant de comparer les niveaux d'accumulation de PDF chez les deux espèces *A. halleri* et *A. thaliana* en réponse au même traitement par le zinc.

Le niveau seuil d'accumulation de zinc qui définit une plante hyperaccumulatrice est de 1% dans les parties aériennes (soit 1 mg de zinc pour 100 mg de matière sèche). Afin d'amener les plantes d'*A. halleri* à un tel niveau d'accumulation nous les avons cultivées en terreau et arrosées avec une solution toxique en zinc (100 mM ZnSO₄). Après 8 jours d'arrosage avec cette solution de zinc, les plantes ne présentent pas de symptômes de toxicité liée au zinc (Figure III.31a), malgré la forte concentration de la solution d'arrosage. Après récolte, la teneur en zinc est dosée dans les parties aériennes. Ce dosage montre que le seuil de 1% est quasiment atteint (0,97%) dans les parties aériennes (Figure III.31b). En revanche, les plantes d'*A. thaliana* cultivées dans les mêmes conditions présentent, après traitement, un phénotype de toxicité du zinc, les feuilles étant chlorotiques, voire nécrosées (Figure III.31a). Ce phénotype est lié au taux de zinc accumulé dans les parties aériennes (près de 0,5%) qui dépasse largement le seuil critique de toxicité en zinc (0,03%) communément admis pour les plantes non tolérantes au zinc (Marschner, 1995).

Les extraits protéiques réalisés à partir des parties aériennes des plantes d'*A. thaliana* et *A. halleri* ont été testés en ELISA compétitif en utilisant le sérum anti-RsAFP2 (Figure III.31c). Nous observons que le traitement par le zinc augmente l'accumulation globale des défensines chez *A. halleri* (d'un facteur 2,25) mais également chez *A. thaliana* (d'un facteur 2,4). Nous observons également que la teneur en défensines est environ 3 fois plus élevée dans les parties aériennes des plantes d'*A. halleri* que dans celles d'*A. thaliana*.

L'expérience a également été reproduite en cultivant les plantes d'*A. halleri* en hydroponie. Cette expérience a confirmé une induction d'un facteur 2 à 3 de l'accumulation des PDF chez *A. halleri*. Le tableau ci-dessous reprend les résultats des différentes expériences.

Tableau III.4. Facteur d'accumulation des défensines chez *A. halleri*.

Culture	Exp^{ce1}	Exp^{ce2}	Exp^{ce3}	Moyenne
terreau	2,25	2,78	1,95	2,33 ± 0,42
hydroponie	2,89	3,53	-	3,21 ± 0,45

Il reste à déterminer si cette différence d'accumulation en réponse à un traitement par le zinc peut être attribuée seule à l'expression du gène *AhPDF1.1* chez *A. halleri*. Cependant nous ne disposons pas d'anticorps spécifique des protéines AhPDF1.1.

Ces résultats montrent que les plantes d'*A. halleri* accumulent naturellement plus de défensines dans leurs parties aériennes que les plantes d'*A. thaliana*. Cette accumulation est par ailleurs accrue en réponse à des conditions de toxicité en zinc, chez les deux espèces.

Conclusion du troisième chapitre des résultats

A. Les PDF forment une famille multigénique chez *A. halleri*

A.1. D'autres familles de défensines restent à identifier chez *A. halleri*

Au cours du criblage de la banque d'ADNc d'*A. halleri* dans la levure, nous avons identifié 5 ADNc codant des défensines de plantes. Quatre de ces 5 ADNc sont les orthologues de la famille *AtPDF1* d'*A. thaliana*. Chez *A. thaliana*, 15 gènes *AtPDF* ont été identifiés, regroupés en 3 familles qui sont définies à partir des homologies de séquences des protéines correspondantes (Thomma *et al.*, 2002).

Le criblage d'une banque BAC d'*A. halleri* nous a permis de définir 5 loci contenant un ou plusieurs gènes de défensines dans le génome d'*A. halleri*. Nous ne savons pas comment sont répartis les 5 ADNc isolés par rapport à ces 5 loci. Il est donc probable que nous ayons isolé une majorité des membres de la famille 1 des PDF d'*A. halleri*.

Il est possible que la sonde utilisée (l'ADNc *AhPDF1.1*) ne présente pas suffisamment d'identité avec les gènes d'autres familles de défensines pour l'hybridation. Des sondes réalisées à partir des séquences codantes de gènes des familles *AtPDF2* et *AtPDF3* chez *A. thaliana* pourraient permettre d'isoler de nouveaux gènes de défensines d'*A. halleri* orthologues aux défensines de ces familles 2 et 3.

A.2. Existe-t-il une amplification du nombre de copies de gènes *PDF1* chez *A. halleri* ?

Des études préliminaires ont montré qu'un des BAC semble regrouper plusieurs loci de *PDF*. Or, l'hypothèse concernant un rôle de l'amplification du nombre de copies d'un gène a été développée à plusieurs reprises pour expliquer la tolérance des plantes aux métaux. Chez *Silene vulgaris*, espèce tolérante au cuivre, il semble que

l'amplification du nombre de copies d'un gène de métallothionéine puisse expliquer la corrélation entre la forte expression transcriptionnelle de cette métallothionéine chez certaines populations et la tolérance au cuivre de ces mêmes populations (van Hoof *et al.*, 2001). De la même façon, Dräger *et al.*, suggèrent que l'amplification du nombre de copies du gène *AtMTP1* (transporteur de zinc) pourrait expliquer la tolérance au zinc d'*A. halleri* (Dräger *et al.*, 2004). La caractérisation du nombre de copies de gènes *PDF* dans chaque locus présente donc un intérêt particulier dans la compréhension de la tolérance au zinc chez *A. halleri*, d'un point de vue adaptatif.

B. Localisation des PDF

B.1. Les PDF sont présentes dans les feuilles et dans l'anthère chez *A. halleri*

Les gènes *AhPDF1* isolés sont détectés dans les parties aériennes et non dans les racines chez *A. halleri*. Les expériences d'immunolocalisation ont confirmé les résultats de western blot en détectant la présence de PDF dans les feuilles d'*A. halleri*. Les protéines PDF ont également été localisées au niveau de l'anthère. Dans les bases de données, les défensines ont été décrites chez plusieurs espèces comme des protéines « spécifiques de l'anthère ». Récemment plusieurs défensines ont été isolées à partir de fleurs : BSD1 chez *Brassica campestris*, NaD1 chez *Nicotiana glauca* et PhD1, une défensine atypique à 5 ponts disulfures, chez *Petunia hybrida* (Park *et al.*, 2002; Janssen *et al.*, 2003; Lay *et al.*, 2003b). Chez *A. halleri*, les expériences d'immunolocalisation ne nous permettent pas de déterminer quelles sont les défensines détectées. Une analyse par RT-PCR devrait permettre de définir quels gènes *AhPDF*, parmi ceux isolés, sont responsables de l'expression de PDF dans les anthères.

Les données disponibles quant à l'expression des *PDF* chez *A. thaliana*, montrent que ces gènes semblent globalement exprimés dans tous les tissus de la plante, avec néanmoins des spécificités possibles en fonction des gènes. L'identification exhaustive des gènes de défensines chez *A. halleri* nous permettra de définir s'il existe de telles spécificités d'expression parmi les défensines d'*A. halleri*, et s'il existe une

corrélation entre la localisation de l'expression des PDF et la tolérance au zinc. En particulier il sera intéressant d'étudier les défensines racinaires.

B.2. La localisation des PDF diffère de celle du zinc chez *A. halleri*

D'après les résultats d'immunolocalisation, les défensines d'*A. halleri* sont localisées dans les parois mais également dans le cytoplasme des cellules du mésophylle et de l'épiderme. Cette localisation diffère de celle du zinc, qui est de façon majoritaire stocké dans la vacuole chez *A. halleri*, essentiellement au niveau des cellules du mésophylle (Marquès *et al.*, 2004, Küpper *et al.*, 2000, Zhao *et al.*, 2000). Cependant la présence de défensines a également été détectée dans les trichomes. Or ces cellules particulières sont le lieu de stockage de zinc (et de cadmium) chez *A. halleri* (Sarret *et al.*, 2002, Küpper *et al.*, 2000). Néanmoins, dans les trichomes, les métaux sont essentiellement localisés au niveau de la base de la cellule (Sarret *et al.*, 2002, Zhao *et al.*, 2000), mais cette localisation subcellulaire n'a pas été retrouvée pour les défensines chez *A. halleri*.

De plus, chez *A. halleri*, le zinc accumulé dans les parties aériennes est principalement complexé avec le malate (Sarret *et al.*, 2002), des analyses par EXAF ont montré qu'il n'est pas majoritairement lié à des résidus soufrés et donc pas à des cystéines. Ces données indiquent que les défensines ne sont pas le chélateur majoritaire de zinc chez *A. halleri*. De plus, la différence de localisation entre le zinc et les PDF chez *A. halleri* suggère que ces dernières ne sont pas directement impliquées dans le stockage du zinc chez *A. halleri*.

Enfin, la présence de PDF dans l'anthere n'est pas en relation avec une concentration de zinc dans ces organes, en effet on ne détecte pas d'accumulation de zinc dans les fleurs chez *A. halleri* (Küpper *et al.*, 2000).

B.3. Localisation subcellulaire des PDF : des adressages différents pour des fonctions différentes ?

Bien que de nombreuses défensines aient été récemment isolées chez plusieurs espèces végétales, peu de données sont actuellement disponibles quant à la localisation, aussi bien tissulaire que cellulaire, des défensines chez les plantes. Chez *R. sativus*, des expériences d'immunodétection en immunogold ont permis de détecter la présence de défensines dans les zones intercellulaires de la graine. Chez *A. halleri*, comme chez d'autres Brassicacées, la présence d'un peptide signal putatif laisse supposer que ces protéines pourraient être adressées dans le compartiment extracellulaire, hypothèse en accord avec un rôle dans la défense contre les pathogènes.

Contrairement à ces données, les expériences d'immunolocalisation montrent que les défensines d'*A. halleri* sont localisées essentiellement dans le cytoplasme des cellules du mésophylle, et dans, une moindre mesure, au niveau pariétal. Cette localisation cytoplasmique atypique soulève la question d'une corrélation entre la localisation et la fonction des défensines. Dans cette hypothèse, il pourrait exister un lien entre la localisation cytoplasmique des PDF chez *A. halleri* et leur rôle dans la tolérance au zinc. En effet, l'environnement réducteur du cytoplasme, par la présence de glutathion, ne favorise pas la formation de ponts disulfures, notamment dans les petites protéines pour lesquelles ces ponts peuvent difficilement être « enfouis » dans la structure spatiale. En revanche, les ponts disulfures sont stables dans les protéines extracellulaires. De façon intéressante, Schwabe *et* Klug (1994) ont remarqué, dans une étude portant sur les domaines de protéines à zinc, que la topologie de certains domaines de protéines cytoplasmiques liant le zinc était retrouvée dans des protéines extracellulaires, lesquelles étaient stabilisées par des ponts disulfures. Il semble donc que la stabilité des petites protéines soit favorisée par une structure spatiale globulaire, impliquant la liaison avec des ions Zn^{2+} pour le cas des protéines cytoplasmiques, et la formation de ponts disulfures pour le cas des protéines extracellulaires. Ces remarques sont intéressantes en regard du mode d'action des PDF dans la tolérance au zinc chez *A. halleri*.

C. L'accumulation des PDF chez *A. halleri* est induite par un traitement des plantes par le zinc

C.1. L'expression d'un gène de défensine répond au zinc chez *A. halleri*

Nous avons montré que pour le gène *AhPDF1.1*, la présence de messagers était accrue après un traitement des plantes par le zinc. Nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle l'expression de ce gène serait induite par le zinc. Nous avons vu que l'accumulation globale des messagers de défensines était augmentée par un traitement par le zinc. L'expression du gène *AhPDF1.1* pourrait participer à cette réponse. Cependant, il faut rappeler qu'il existe peut-être d'autres membres de la famille *AhPDF1* chez *A. halleri* qui n'ont pas encore été caractérisés. Une analyse plus systématique de cette famille sera donc nécessaire afin de conclure.

Les trois autres gènes isolés ont une expression très faible (*AhPDF1.3* et *AhPDF1.4*) voire indétectable dans nos conditions (*AhPDF1.2*). Aucune réponse claire au zinc n'a été montrée. Il n'est néanmoins pas exclu que les ARNm *AhPDF1.2* s'accumulent dans des conditions de culture différentes ou pour des temps plus longs de traitement. Des analyses par PCR quantitative permettraient d'approfondir l'étude de la réponse au zinc. De plus, étant donné que les plantes transgéniques 35S::*AhPDF1.1* ont une tolérance accrue au nickel, la réponse des gènes PDF à un traitement par le nickel pourrait être recherchée.

Chez *A. thaliana*, aucune donnée dans la littérature ne décrit de réponse des gènes *PDF* au zinc. Néanmoins, l'analyse des promoteurs de gènes *PDF* chez *A. thaliana* révèle, dans le promoteur du gène *AtPDF1.3*, la présence d'un élément cis (ATCTTCAAGGT) proche de l'élément de réponse au zinc ZRE décrit dans la levure (ACC(C/T)(C/T)(A/G/C)AAGGT, Zhao *et al.*, 1998). Bien que, statistiquement, ce motif puisse être trouvé de façon aléatoire une fois tous les 350 kb, il serait néanmoins intéressant d'analyser la réponse au zinc du gène *AtPDF1.3*.

C.2. Quel est l'impact d'un traitement par le zinc en fonction de l'espèce végétale considérée ?

Pour analyser l'accumulation des PDF après un traitement des plantes par le zinc, la question du choix du traitement est essentielle. Dans nos expériences, nous avons choisi d'appliquer le même traitement aux plantes d'*A. halleri* et d'*A. thaliana*. Cette méthode, également choisie par Weber *et al.* (2004) pour des analyses transcriptomiques, ne tient pas compte du niveau de stress ressenti par la plante. Or ce stress est fonction de son niveau de tolérance, et donc diffère entre *A. thaliana* et *A. halleri*. En effet, un traitement utilisant la même dose de zinc peut représenter un stress chez *A. thaliana* alors qu'il améliore la croissance d'*A. halleri*. En hydroponie par exemple, un traitement par 100 μM de zinc entraîne une diminution de 20% environ de la biomasse de plantes d'*A. thaliana*, alors que ce même traitement entraîne une augmentation de près de 10% de la biomasse pour *A. halleri* (Becher *et al.*, 2004). Au laboratoire, nous avons observé qu'une concentration de 1 mM de zinc, létale pour des plantes d'*A. thaliana*, n'affectait pas la biomasse des plantes d'*A. halleri* après plusieurs semaines, ce qui a également été observé par (Zhao *et al.*, 2000). Les plantes hyperaccumulatrices ont ainsi des besoins d'apport de métaux dans le milieu de culture qui sont supérieurs à ceux des plantes non tolérantes aux métaux. Sur le terrain, ce besoin se traduit par une augmentation de l'exploration racinaire. La mise au point d'un paramètre rendant compte du « niveau de stress », comme la biomasse des plantes pourrait donc permettre de déterminer les doses de zinc à appliquer en fonction de l'espèce étudiée.

C.3. L'induction des PDF par le zinc est retrouvée au niveau protéique chez *A. halleri* mais aussi chez *A. thaliana*

Par des dosages ELISA de la teneur en PDF, nous avons montré que (i) *A. halleri* accumulait des quantités de PDF bien supérieures à celles mesurées chez *A. thaliana*, (ii) chez les deux espèces cette accumulation était accrue en réponse à un traitement des plantes par le zinc (augmentation d'un facteur 2 environ).

Dans les parties aériennes, le niveau d'accumulation des défensines en réponse au zinc chez *A. thaliana* est du même ordre (10 mg PDF.g⁻¹ de protéines solubles) que celui mesuré après un traitement des plantes d'*A. thaliana* par le jasmonate (Penninckx *et al.*, 1996). Or nous savons que les PDF sont accumulées chez *A. thaliana* en réponse à une attaque pathogène ou à un traitement hormonal, ce qui pourrait expliquer que le niveau d'accumulation des PDF chez *A. thaliana* est supérieur, avant traitement par le zinc, lorsque les plantes sont cultivées en terreau plutôt qu'en hydroponie. Afin de nous affranchir de ce problème, et dans le but de tenter de discriminer les réponses des gènes *PDF* à la présence de pathogènes ou de micro-organismes dans le sol et la réponse stricte au traitement par le zinc, nous proposons de mener des études de l'accumulation des PDF à partir de plantes d'*A. halleri* cultivées en conditions stériles. En effet, Penninckx *et al.*, (1998) ont montré qu'un traitement par l'éthylène (5 ppm) ou le jasmonate (50 µM) par exemple n'avait pas d'effet sur l'accumulation de PDF chez des plantes d'*A. thaliana* cultivées en milieu stérile.

Nous avons montré d'une part qu'au moins une PDF d'*A. thaliana* pouvait conférer dans la levure une tolérance au zinc, et d'autre part qu'un traitement par le zinc pouvait entraîner l'accumulation des PDF dans les parties aériennes chez *A. thaliana*. Ces conclusions sont identiques à celles obtenues pour les PDF d'*A. halleri*. Or *A. thaliana* est sensible au zinc, et la surexpression d'une PDF d'*A. halleri* lui permet d'acquérir une tolérance accrue au zinc. Ces données suggèrent que l'accumulation constitutive de PDF chez *A. halleri*, impliquant éventuellement la stabilité de la protéine, et/ou la localisation des PDF d'*A. halleri* semble être essentielle dans le rôle joué par les PDF dans la tolérance au zinc chez *A. halleri*.

D. Les défensines ne sont pas le déterminant majeur de la tolérance au zinc chez *A. halleri* mais y participent

Arabidopsis halleri est interfertile avec sa proche parente *A. lyrata* qui n'est pas tolérante au zinc. Cette opportunité a permis à Macnair *et al.* (1999) de réaliser des croisements interspécifiques entre *A. halleri* et *A. lyrata*. Les plantes F1 issues de ce croisement sont toutes tolérantes au zinc, indiquant que ce caractère est dominant. Ces descendants ont été à leur tour croisés avec un parent *A. lyrata*. Une population dite de

rétrocroisement a ainsi été obtenue, comportant plus de 250 génotypes différents. Les individus correspondant à ces 250 génotypes ont été phénotypés pour leur tolérance au zinc. Les études génétiques menées par Macnair *et al.* (1999) sur cette population les ont amenés à conclure que la tolérance au zinc chez cette espèce est sous le contrôle (i) d'un locus majeur qui déterminerait la *capacité* à tolérer le zinc et (ii) de gènes « modérateurs » qui détermineraient le *niveau* de tolérance. L'équipe du Pr. Saumitou-Laprade (Université de Lille) a entrepris de cartographier le QTL de tolérance au zinc sur cette population de rétrocroisement. La mise au point de marqueurs génétiques discriminants entre *A. halleri* et *A. lyrata* est facilitée par la proximité phylogénique de ces espèces avec *A. thaliana*, espèce pour laquelle de nombreux marqueurs génétiques sont disponibles. Cependant les marqueurs développés chez *A. thaliana* ne peuvent pas systématiquement être utilisés chez *A. halleri* et *A. lyrata*. De plus ces marqueurs peuvent s'avérer insuffisants pour couvrir tout le génome d'*A. halleri*. La cartographie du locus de tolérance chez *A. halleri* requiert ainsi la connaissance de séquences spécifiques d'*A. halleri*. Grâce à la séquence intronique d'un gène de défensine obtenue suite à notre étude, et grâce à l'obtention d'une banque BAC (Loubet *et al.*,) nous avons participé à l'élaboration d'un marqueur génétique chez *A. halleri*.

La cartographie a conduit à l'identification d'un QTL majeur et de 2 QTL mineurs chez *A. halleri* (Saumitou-Laprade, communication personnelle). Récemment, Dräger *et al.*, (2004) ont montré qu'une des copies du gène *AhMTP1*, situé dans la région du QTL majeur, coségrège avec la tolérance au zinc dans la population issue du rétro-croisement entre *A. halleri* et *A. lyrata*. Le gène *AhMTP1* apparaît donc comme un bon candidat pour ce QTL. Or, d'après la synténie entre *A. halleri* et *A. thaliana*, deux copies de gènes *PDF* seraient également proches du QTL majeur de tolérance au zinc. Cette information majeure nous a conduit à dessiner des marqueurs, à partir des séquences de *PDF*, qui seront utilisés pour déterminer si une des copies de *PDF* coségrège avec le caractère de tolérance au zinc.

Récemment, l'étude de QTL mineurs chez *A. thaliana* a montré que des phénomènes d'épistasie pouvaient entraîner la dérégulation de zone entière du génome (Kroymann and Mitchell-Olds, 2005). Or il semble que deux candidats (*AhMTP1* et *AhPDF*), proches du QTL de tolérance au zinc chez *A. halleri*, puissent être surexprimés chez *A. halleri* par rapport à *A. thaliana*. L'étude du niveau d'expression d'autres gènes

situés dans cette zone pourrait nous renseigner sur l'existence éventuelle d'une telle zone dérégulée chez *A. halleri*.

Quatrième Partie

Conclusion

Ce travail de thèse a permis de montrer que l'expression d'un gène de défensine de plante dans la levure *S. cerevisiae* ou dans la plante *A. thaliana* avait pour conséquence l'augmentation du niveau de tolérance au zinc. Ces résultats ont été obtenus grâce à l'utilisation des ressources génétiques naturelles, par le biais de l'étude d'une plante tolérante et hyperaccumulatrice de zinc, *Arabidopsis halleri*. Nos résultats confortent le choix de cette nouvelle plante modèle pour l'étude de l'homéostasie des métaux. En effet, il semble que les plantes hyperaccumulatrices présentent une expression constitutive de certains gènes impliqués dans l'homéostasie des métaux, facilitant l'identification de ces gènes par des criblages fonctionnels dans la levure.

Notre travail ouvre également la perspective de nouvelles fonctions pour les défensines de plantes (PDF), qui n'ont été à ce jour décrites que pour leur activité antifongique. Cette nouvelle fonction pourrait ne pas se limiter au zinc puisque la surexpression d'une défensine d'*A. halleri* chez *A. thaliana* confère également un phénotype de tolérance au nickel. Dans la levure, l'expression d'un gène PDF d'*A. halleri* entraîne une tolérance au zinc mais une sensibilité au cadmium. Dans ces systèmes hétérologues, les PDF pourraient donc être impliquées dans la physiologie des métaux. Cette nouvelle fonction devra être confirmée chez *A. halleri*. Chez cette espèce tolérante au zinc, nous avons montré une accumulation des PDF en réponse au zinc dans les parties aériennes, et nous avons identifié un gène dont l'expression semble induite par le zinc. Ces résultats apportent des arguments en faveur d'un rôle des défensines dans la tolérance au zinc chez *A. halleri*. Pour poursuivre cette étude, l'expression des autres gènes de défensines devra être analysée. *A. halleri* n'étant à ce jour pas transformable, l'obtention de mutants knock-out pour les défensines n'est donc pas envisageable. Chez *A. thaliana*, des gènes de défensines sont exprimés au niveau racinaire, ce qui n'a pas été observé chez *A. halleri*. Pour déterminer s'il existe une spécialisation des défensines AhPDF1 des parties aériennes dans la tolérance au zinc, le phénotype conféré dans la levure par l'expression de gènes de défensines appartenant à d'autres familles, comme les orthologues des familles PDF2 et PDF3 pourra être analysé. Enfin, nous avons isolé un ADNc codant une défensine atypique AhPDFL, qui, pourtant, confère le même phénotype de tolérance au zinc dans la levure. L'étude de

l'expression de cette défensine pourrait nous aider à comprendre le mode d'action des défensines de plantes dans la tolérance au zinc.

Le mécanisme de la tolérance au zinc conférée par l'expression des défensines de plantes reste encore à déterminer. Au fil des conclusions des différents chapitres, nous avons développé deux hypothèses concernant le mode d'action des défensines dans la tolérance aux métaux.

La première hypothèse propose une chélation du zinc par les PDF, par le biais des groupements thiols des cystéines. Or, dans les parties aériennes d'*A. halleri*, le zinc est principalement complexé avec le malate, stocké dans la vacuole. Les PDF, qui ont été localisées au niveau cytoplasmique chez *A. halleri*, pourraient servir de métallochaperonnes pour le zinc, en assurant le trafic intracellulaire de la membrane jusqu'au stockage dans la vacuole. Un tel rôle est postulé pour la nicotianamine dans la tolérance au nickel (Pianelli *et al.*, 2005). Chez les défensines de radis, les cystéines sont engagées dans des ponts disulfures. La chélation du zinc impliquerait donc une régulation des PDF par le biais de modifications du statut redox. En regard de nos résultats, cette hypothèse expliquerait l'accumulation de zinc dans les levures exprimant les PDF, mais elle ne rend pas compte de la faible teneur en zinc des plantes d'*A. thaliana* surexprimant AhPDF1.1.

La deuxième hypothèse suggère que les PDF pourraient, par le biais de modifications d'activité de canaux, perturber les flux ioniques, en particulier de zinc. En effet, certaines défensines, tout comme les toxines de scorpion dont la structure tridimensionnelle est proche de celle des PDF, peuvent moduler l'activité de canaux. Cependant, il n'existe pas de canaux spécifiques des métaux, et les études actuelles portent essentiellement sur les transporteurs. En revanche, certains métaux comme le cadmium peuvent passer à travers des canaux calciques (Perfus-Barbeoch *et al.*, 2002). Les défensines pourraient moduler ce type de canaux, mais il n'est pas exclu qu'elles puissent agir sur l'activité de transporteurs. Dans ce cas, la reconnaissance entre des défensines et des lipides de la membrane pourrait faciliter une interaction avec des canaux ou transporteurs au niveau de rafts lipidiques qui sont enrichis en sphingolipides (Edidin, 2003). Chez *S. cerevisiae*, cette hypothèse impliquerait une reconnaissance par les PDF de lipides différents des glucosyl-céramides (absents chez *S. cerevisiae*), contrairement à ce qui a été montré pour l'activité antifongique, et provoquant une modification des flux de zinc conduisant à une tolérance accrue au zinc.

Les expériences menées jusqu'ici apportent des arguments contradictoires et ne nous permettent pas de choisir *a priori* une hypothèse plutôt que l'autre. Des expériences supplémentaires devront donc apporter des réponses à cette interrogation. L'hypothèse de chélation pourra être testée sur les défensines purifiées à partir de feuilles d'*A. halleri*, ou produite en système hétérologue, chez *Pichia pastoris* par exemple. Des expériences d'électrophysiologie en ovocyte de Xénope produisant des PDF permettraient d'étudier l'effet de la présence des PDF sur des modifications de flux de métaux comme le zinc. Si ces expériences confirmaient la seconde hypothèse, alors un parallèle pourrait être envisagé entre le mode d'action antifongique des PDF, basé sur la reconnaissance de phospholipides et la perméabilisation de la membrane du champignon, et leur rôle dans la physiologie des métaux. Dans ce cas l'étude de l'un des mécanismes pourrait aider à la compréhension de l'autre. Alternativement, il pourrait s'agir du même mécanisme médié par la reconnaissance de phospholipides de champignons ou de phospholipides de plantes.

Ces dernières années, les études menées sur certains membres de la très large famille des petites protéines riches en cystéines ont révélé bien des surprises. Chez les animaux, une découverte majeure a récemment établi un lien entre une petite protéine basique, riche en cystéines (l'hepcidine) et l'absorption du fer. Chez la souris, l'hepcidine a d'abord été identifiée comme une protéine hépatique de 25 acides aminés, dont 8 cystéines, et présentant une activité antimicrobienne (*hepatic bactericidal protein*). La découverte du rôle de l'hepcidine a pourtant été fortuite : en réalisant un mutant knock-out de souris pour un autre gène d'intérêt, des chercheurs ont également éteint le gène de l'hepcidine. Les souris ainsi mutées souffrent d'une surcharge en fer. Au contraire, l'expression constitutive de l'hepcidine entraîne une anémie (Nicolas *et al.*, 2002). Ces différents résultats sont autant de preuves génétiques de l'implication de l'hepcidine dans l'homéostasie du fer chez les animaux (Ganz, 2003b; Robson, 2004). Cependant, aucun rôle fonctionnel ne permettait de relier cette petite protéine riche en cystéines avec le métabolisme du fer. Récemment, des recherches ont montré que l'hepcidine interagissait avec un transporteur d'efflux de fer (la ferroportine) conduisant à une modification des flux de fer. En se liant à la ferroportine, l'hepcidine induit l'internalisation du transporteur et donc l'arrêt de l'efflux de fer (Nemeth *et al.*, 2004). Cette découverte qui met en évidence une relocalisation d'un transporteur suite à

l'interaction avec l'hepcidine permet d'envisager de nouveaux modes d'actions dans la régulation des flux d'ions et en particulier d'ions métalliques. Le monde des petites protéines basiques et riches en cystéines est très certainement encore largement méconnu, et promet des modes d'action variés.

De nouvelles voies restent donc à explorer quant au rôle des petites protéines riches en cystéines dans les stress biotiques mais également abiotiques. Ces études pourraient aider à la compréhension des mécanismes encore mal connus de la tolérance mais également de l'homéostasie des métaux dans les plantes.

Cinquième Partie

Références bibliographiques

- Achstetter, T., Nguyen-Juilleret, M., Findeli, A., Merkamm, M., Lemoine, Y.** (1992). A new signal peptide useful for secretion of heterologous proteins from yeast and its application for synthesis of hirudin. *Gene* **110**, 25-31.
- Adams, C.L., Hambidge, M., Raboy, V., Dorsch, J.A., Sian, L., Westcott, J.L., Krebs, N.F.** (2002). Zinc absorption from a low-phytic acid maize. *Am J Clin Nutr* **76**, 556-559.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Alves, A.L., De Samblanx, G.W., Terras, F.R., Cammue, B.P., Broekaert, W.F.** (1994). Expression of functional *Raphanus sativus* antifungal protein in yeast. *FEBS Lett* **348**, 228-232.
- Assunção, A.G.L., Da Costa Martins, P., De Folter, S., Vooijs, R., Schat, H., Aarts, M.G.M.** (2001). Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Cell Env* **24**, 217-226.
- Assunção, A.G.L., Schat, H., Aarts, M.G.M.** (2003). *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. *New Phytol* **159**, 351-360.
- Baker, A.J.M., and Brooks, R.** (1989). Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements- a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* **1**, 81-126.
- Becher, M., Talke, I.N., Krall, L., Krämer, U.** (2004). Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant J* **37**, 251-268.
- Berg, J.M.** (1990). Zinc fingers and other metal-binding domains. Elements for interactions between macromolecules. *J Biol Chem* **265**, 6513-6516.
- Berg, J.M., and Shi, Y.** (1996). The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science* **271**, 1081-1085.
- Bernard, C., Roosens, N., Czernic, P., Lebrun, M., Verbruggen, N.** (2004). A novel CPx-ATPase from the cadmium hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *FEBS Lett* **569**, 140-148.
- Berrocal-Lobo, M., Segura, A., Moreno, M., Lopez, G., Garcia-Olmedo, F., Molina, A.** (2002). Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. *Plant Physiol* **128**, 951-961.
- Bert, V.** (2000). Tolérance aux métaux lourds et accumulation chez *Arabidopsis halleri* (*Brassicaceae*). In Thèse, Université des Sciences et Technologies de Lille.
- Bert, V., Macnair, M., De Laguerie, P., Saumitou-Laprade, P., Petit, D.** (2000). Zinc tolerance and accumulation in metallicolous and non-metallicolous populations of *Arabidopsis halleri* (*Brassicaceae*). *New Phytol.* **146**, 225-233.
- Bert, V., Bonnin, I., Saumitou-Laprade, P., de Laguérie, P., Petit, D.** (2002). Do *Arabidopsis halleri* from nonmetallicolous populations accumulate zinc and cadmium more efficiently than those from metallicolous populations? *New Phytol* **155**, 47-57.
- Bert, V., Meerts, P., Saumitou-Laprade, P., Salis, P., Gruber, W., Verbruggen, N.** (2003). Genetic basis of Cd tolerance and hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*. *Plant and Soil* **249**, 9-18.

- Bloss, T., Clemens, S., Nies, D.H.** (2002). Characterization of the ZAT1p zinc transporter from *Arabidopsis thaliana* in microbial model organisms and reconstituted proteoliposomes. *Planta* **214**, 783-791.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Briat, J.F., and Lebrun, M.** (1999). Plant responses to metal toxicity. *C R Acad Sci III* **322**, 43-54.
- Broekaert, W.F., Terras, F.R., Cammue, B.P., Osborn, R.W.** (1995). Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol* **108**, 1353-1358.
- Brown, R.L., Kazan, K., McGrath, K.C., Maclean, D.J., Manners, J.M.** (2003). A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the PDF1.2 gene of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **132**, 1020-1032.
- Clemens, S.** (2001a). Developing tools for phytoremediation: towards a molecular understanding of plant metal tolerance and accumulation. *Int J Occup Med Environ Health* **14**, 235-239.
- Clemens, S.** (2001b). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212**, 475-486.
- Clemens, S., Bloss, T., Vess, C., Neumann, D., Nies, D.H., Zur Nieden, U.** (2002). A transporter in the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe* cells mediates zinc storage and differentially affects transition metal tolerance. *J Biol Chem* **277**, 18215-18221.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735-743.
- Cobbett, C., and Goldsbrough, P.** (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 159-182.
- Cobbett, C.S.** (2000). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol* **123**, 825-832.
- Colilla, F.J., Rocher, A., Mendez, E.** (1990). gamma-Purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. *FEBS Lett* **270**, 191-194.
- Conklin, D.S., Culbertson, M.R., Kung, C.** (1994). Interactions between gene products involved in divalent cation transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **244**, 303-311.
- Corpet, F.** (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* **16**, 10881-10890.
- Cosio, C., Martinoia, E., Keller, C.** (2004). Hyperaccumulation of cadmium and zinc in *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri* at the leaf cellular level. *Plant Physiol* **134**, 716-725.
- Costello, L.C., Guan, Z., Franklin, R.B., Feng, P.** (2004). Metallothionein can function as a chaperone for zinc uptake transport into prostate and liver mitochondria. *J Inorg Biochem* **98**, 664-666.
- Dräger, D.B., Desbrosses-Fonrouge, A.G., Krach, C., Chardonens, A.N., Meyer, R.C., Saumitou-Laprade, P., Krämer, U.** (2004). Two genes encoding *Arabidopsis halleri* MTP1 metal transport proteins co-segregate with zinc tolerance and account for high MTP1 transcript levels. *Plant J* **39**, 425-439.
- Eddidin, M.** (2003). The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **32**, 257-283.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J., Guerinot, M.L.** (1996). A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5624-5628.

- Eren, E., and Arguello, J.M. (2004). Arabidopsis HMA2, a divalent heavy metal-transporting P(1B)-type ATPase, is involved in cytoplasmic Zn²⁺ homeostasis. *Plant Physiol* **136**, 3712-3723.
- Fant, F., Vranken, W., Broekaert, W., Borremans, F. (1998). Determination of the three-dimensional solution structure of *Raphanus sativus* antifungal protein 1 by ¹H NMR. *J Mol Biol* **279**, 257-270.
- Finney, L.A., and O'Halloran, T.V. (2003). Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science* **300**, 931-936.
- Forzani, C., Loulergue, C., Lobreaux, S., Briat, J.F., Lebrun, M. (2001). Nickel resistance and chromatin condensation in *Saccharomyces cerevisiae* expressing a maize high mobility group I/Y protein. *J Biol Chem* **276**, 16731-16738.
- Fox, T.C., and Guerinot, M.L. (1998). Molecular Biology of Cation Transport in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**, 669-696.
- Francois, I.E., De Bolle, M.F., Dwyer, G., Goderis, I.J., Woutors, P.F., Verhaert, P.D., Proost, P., Schaaper, W.M., Cammue, B.P., Broekaert, W.F. (2002). Transgenic expression in Arabidopsis of a polyprotein construct leading to production of two different antimicrobial proteins. *Plant Physiol* **128**, 1346-1358.
- Froy, O., and Gurevitz, M. (1998). Membrane potential modulators: a thread of scarlet from plants to humans. *Faseb J* **12**, 1793-1796.
- Ganz, T. (2003a). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* **3**, 710-720.
- Ganz, T. (2003b). Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* **102**, 783-788.
- Gao, A.G., Hakimi, S.M., Mittanck, C.A., Wu, Y., Woerner, B.M., Stark, D.M., Shah, D.M., Liang, J., Rommens, C.M. (2000). Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nat Biotechnol* **18**, 1307-1310.
- Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Segura, A., Moreno, M. (1995). The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol* **3**, 72-74.
- Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J.M., Rodriguez-Palenzuela, P. (1998). Plant defense peptides. *Biopolymers* **47**, 479-491.
- Gietz, R.D., and Schiestl, R.H. (1991). Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier. *Yeast* **7**, 253-263.
- Gitan, R.S., Luo, H., Rodgers, J., Broderius, M., Eide, D. (1998). Zinc-induced inactivation of the yeast ZRT1 zinc transporter occurs through endocytosis and vacuolar degradation. *J Biol Chem* **273**, 28617-28624.
- Gitan, R.S., and Eide, D.J. (2000). Zinc-regulated ubiquitin conjugation signals endocytosis of the yeast ZRT1 zinc transporter. *Biochem J* **346 Pt 2**, 329-336.
- Grotz, N., Fox, T., Connolly, E., Park, W., Guerinot, M.L., Eide, D. (1998). Identification of a family of zinc transporter genes from Arabidopsis that respond to zinc deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7220-7224.
- Guerinot, M.L., and Eide, D. (1999). Zeroing in on zinc uptake in yeast and plants. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 244-249.
- Guerinot, M.L. (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochim Biophys Acta* **1465**, 190-198.
- Hall, J.L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* **53**, 1-11.
- Harmens, H., Den Hartog, P.R., Bookum, W., Verkleij, J. (1993). Increased zinc tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke is not due to increased production of phytochelatins. *Plant Physiol* **103**, 1305-1309.

- Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S., Mullineaux, P.M. (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* **42**, 819-832.
- Huang, L., and Gitschier, J. (1997). A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal milk mouse. *Nat Genet* **17**, 292-297.
- Huitson, S.B., and Macnair, M.R. (2003). Does zinc protect the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* from herbivory by snails? *New Phytologist* **159**, 453-459.
- Hussain, D., Haydon, M.J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S.M., Young, J., Camakaris, J., Harper, J.F., Cobbett, C.S. (2004). P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 1327-1339.
- Im, Y.J., Idkowiak-Baldys, J., Thevissen, K., Cammue, B.P., Takemoto, J.Y. (2003). IPT1-independent sphingolipid biosynthesis and yeast inhibition by syringomycin E and plant defensin DmAMP1. *FEMS Microbiol Lett* **223**, 199-203.
- Jacob, C., Maret, W., Vallee, B.L. (1998). Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3489-3494.
- Janssen, B.J., Schirra, H.J., Lay, F.T., Anderson, M.A., Craik, D.J. (2003). Structure of *Petunia hybrida* defensin 1, a novel plant defensin with five disulfide bonds. *Biochemistry* **42**, 8214-8222.
- Jhee, E.M., Dandridge, K.L., Christy, A.M., Pollard, A.J. (1999). Selective herbivory on low-zinc phenotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae). *Chemoecology* **9**, 93-95.
- Jiang, R.F., Ma, D.Y., Zhao, F.J., McGrath, S.P. (2005). Cadmium hyperaccumulation protects *Thlaspi caerulescens* from leaf feeding damage by thrips (*Frankliniella occidentalis*). *New Phytologist* **0**.
- Kamizono, A., Nishizawa, N.K., Teranishi, Y., Murata, K., Kimura, A. (1989). Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **219**, 161-167.
- Kawashima, I., Kennedy, T.D., Chino, M., Lane, B.G. (1992). Wheat Ec metallothionein genes. Like mammalian Zn²⁺ metallothionein genes, wheat Zn²⁺ metallothionein genes are conspicuously expressed during embryogenesis. *Eur J Biochem* **209**, 971-976.
- Kelly, E.J., Quaife, C.J., Froelick, G.J., Palmiter, R.D. (1996). Metallothionein I and II protect against zinc deficiency and zinc toxicity in mice. *J Nutr* **126**, 1782-1790.
- Kim, D., Gustin, J.L., Lahner, B., Persans, M.W., Baek, D., Yun, D.J., Salt, D.E. (2004). The plant CDF family member TgMTP1 from the Ni/Zn hyperaccumulator *Thlaspi goesingense* acts to enhance efflux of Zn at the plasma membrane when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant J* **39**, 237-251.
- Kobae, Y., Uemura, T., Sato, M.H., Ohnishi, M., Mimura, T., Nakagawa, T., Maeshima, M. (2004). Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis. *Plant Cell Physiol* **45**, 1749-1758.
- Koch, M.A., Haubold, B., Mitchell-Olds, T. (2000). Comparative evolutionary analysis of chalcone synthase and alcohol dehydrogenase loci in Arabidopsis, Arabis, and related genera (Brassicaceae). *Mol Biol Evol* **17**, 1483-1498.
- Kohler, A., Blaudez, D., Chalot, M., Martin, F. (2004). Cloning and expression of multiple metallothioneins from hybrid poplar. *New Phytol* **164**, 83-93.
- Koike, M., Okamoto, T., Tsuda, S., Imai, R. (2002). A novel plant defensin-like gene of winter wheat is specifically induced during cold acclimation. *Biochem Biophys Res Commun* **298**, 46-53.

- Korshunova, Y.O., Eide, D., Clark, W.G., Guerinot, M.L., Pakrasi, H.B. (1999). The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol Biol* **40**, 37-44.
- Kroymann, J., and Mitchell-Olds, T. (2005). Epistasis and balanced polymorphism influencing complex trait variation. *Nature* **435**, 95-98.
- Krämer, U., Cotter-Howells, J.D., Charnock, J.M., Baker, A.J.M., Smith, J.A.C. (1996). Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* **379**, 635-638.
- Krämer, U., Pickering, I.J., Prince, R.C., Raskin, I., Salt, D.E. (2000). Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. *Plant Physiol* **122**, 1343-1353.
- Krämer, U. (2005). Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Curr Opin Biotechnol* **16**, 133-141.
- Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F.J., McGrath, S.P. (2000). Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta* **212**, 75-84.
- Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F.J., Wieshammer, G., McGrath, S.P. (2001). Cellular compartmentation of nickel in the hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense*. *J Exp Bot* **52**, 2291-2300.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lahner, B., Gong, J., Mahmoudian, M., Smith, E.L., Abid, K.B., Rogers, E.E., Guerinot, M.L., Harper, J.F., Ward, J.M., McIntyre, L., Schroeder, J.I., Salt, D.E. (2003). Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol* **21**, 1215-1221.
- Lasat, M.M., Baker, A., Kochian, L.V. (1996). Physiological characterization of root Zn²⁺ absorption and translocation to shoots in Zn hyperaccumulator and nonaccumulator species of *Thlaspi*. *Plant Physiol* **112**, 1715-1722.
- Lasat, M.M., Pence, N.S., Garvin, D.F., Ebbs, S.D., Kochian, L.V. (2000). Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J Exp Bot* **51**, 71-79.
- Lay, F.T., Brugliera, F., Anderson, M.A. (2003a). Isolation and properties of floral defensins from ornamental tobacco and petunia. *Plant Physiol* **131**, 1283-1293.
- Lay, F.T., Schirra, H.J., Scanlon, M.J., Anderson, M.A., Craik, D.J. (2003b). The three-dimensional solution structure of NaD1, a new floral defensin from *Nicotiana glauca* and its application to a homology model of the crop defense protein alfAFP. *J Mol Biol* **325**, 175-188.
- Lay, F.T., and Anderson, M.A. (2005). Defensins--components of the innate immune system in plants. *Curr Protein Pept Sci* **6**, 85-101.
- Lee, J., Bae, H., Jeong, J., Lee, J.Y., Yang, Y.Y., Hwang, I., Martinoia, E., Lee, Y. (2003). Functional expression of a bacterial heavy metal transporter in *Arabidopsis* enhances resistance to and decreases uptake of heavy metals. *Plant Physiol* **133**, 589-596.
- Loubet, S., Cosségal, M., Varroquau, F., Benabdelmouna, A., Piffanelli, P., D'Honte, A., Lebrun, M., Lacombe, E. (en préparation). Construction and characterisation of a BAC library from *Arabidopsis halleri*: a new tool towards the understanding of chromosome structure and ecophysiological evolution within *Arabidopsis* spp. Manuscrit en préparation.
- Lyons, T.J., Gasch, A.P., Gaither, L.A., Botstein, D., Brown, P.O., Eide, D.J. (2000). Genome-wide characterization of the Zap1p zinc-responsive regulon in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7957-7962.
- MacDiarmid, C.W., Gaither, L.A., Eide, D. (2000). Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **19**, 2845-2855.

- MacDiarmid, C.W., Milanick, M.A., Eide, D.J.** (2002). Biochemical properties of vacuolar zinc transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**, 39187-39194.
- MacDiarmid, C.W., Milanick, M.A., Eide, D.J.** (2003). Induction of the ZRC1 metal tolerance gene in zinc-limited yeast confers resistance to zinc shock. *J Biol Chem* **278**, 15065-15072.
- Macnair, M.R., Bert, V., Huitson, S.B., Saumitou-Laprade, P., Petit, D.** (1999). Zinc tolerance and hyperaccumulation are genetically independent characters. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **266**, 2175-2179.
- Maitra, N., and Cushman, J.** (1998). PGR 98-213. *Plant physiol* **118**, 1536.
- Manners, J.M., Penninckx, I.A., Vermaere, K., Kazan, K., Brown, R.L., Morgan, A., Maclean, D.J., Curtis, M.D., Cammue, B.P., Broekaert, W.F.** (1998). The promoter of the plant defensin gene *PDF1.2* from *Arabidopsis* is systemically activated by fungal pathogens and responds to methyl jasmonate but not to salicylic acid. *Plant Mol Biol* **38**, 1071-1080.
- Marquès, L., Cossegal, M., Bodin, S., Czernic, P., Lebrun, M.** (2004). Heavy metal specificity of cellular tolerance in two hyperaccumulating plants, *Arabidopsis halleri* and *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist* **164**, 289-295.
- Marschner, H.** (1995). Mineral nutrition of higher plants. (London: Academic Press).
- McGrath, S.P., and Zhao, F.J.** (2003). Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Curr Opin Biotechnol* **14**, 277-282.
- Mendez, E., Moreno, A., Colilla, F., Pelaez, F., Limas, G.G., Mendez, R., Soriano, F., Salinas, M., de Haro, C.** (1990). Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, gamma-hordothionin, from barley endosperm. *Eur J Biochem* **194**, 533-539.
- Mills, R.F., Francini, A., Ferreira da Rocha, P.S., Baccharini, P.J., Aylett, M., Krijger, G.C., Williams, L.E.** (2005). The plant P1B-type ATPase AtHMA4 transports Zn and Cd and plays a role in detoxification of transition metals supplied at elevated levels. *FEBS Lett* **579**, 783-791.
- Minet, M., Dufour, M.E., Lacroute, F.** (1992). Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. *Plant J* **2**, 417-422.
- Miquel, G.** (2001). Rapport sur les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. (Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, N° 2979 Assemblée Nationale, N° 261 Sénat).
- Murashige, T., and Skoog, F.** (1963). A revised medium for a rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* **15**, 473-497.
- Murphy, A., Zhou, J., Goldsbrough, P.B., Taiz, L.** (1997). Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **113**, 1293-1301.
- Mäser, P., Thomine, S., Schroeder, J.I., Ward, J.M., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I.N., Amtmann, A., Maathuis, F.J., Sanders, D., Harper, J.F., Tchieu, J., Gribkov, M., Persans, M.W., Salt, D.E., Kim, S.A., Guerinot, M.L.** (2001). Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **126**, 1646-1667.
- Nemeth, E., Tuttle, M.S., Powelson, J., Vaughn, M.B., Donovan, A., Ward, D.M., Ganz, T., Kaplan, J.** (2004). Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* **306**, 2090-2093.
- Nicolas, G., Bennoun, M., Porteu, A., Mativet, S., Beaumont, C., Grandchamp, B., Siritto, M., Sawadogo, M., Kahn, A., Vulont, S.** (2002). Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *PNAS* **99**, 4596-4601.
- O'Dell, B.L.** (1992). Zinc plays both structural and catalytic roles in metalloproteins. *Nutr Rev* **50**, 48-50.

- O'Kane, S.L.J., and Al-Shehbaz, I.A. (1997). A synopsis of Arabidopsis (Brassicaceae). *Novon* **7**, 323-327.
- Osborn, R.W., De Samblanx, G.W., Thevissen, K., Goderis, I., Torrekens, S., Van Leuven, F., Attenborough, S., Rees, S.B., Broekaert, W.F. (1995). Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Lett* **368**, 257-262.
- Outten, C.E., and O'Halloran, T.V. (2001). Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* **292**, 2488-2492.
- Palmiter, R.D., and Findley, S.D. (1995). Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *Embo J* **14**, 639-649.
- Palmiter, R.D., Cole, T.B., Findley, S.D. (1996a). ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration. *Embo J* **15**, 1784-1791.
- Palmiter, R.D., Cole, T.B., Quaife, C.J., Findley, S.D. (1996b). ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14934-14939.
- Palmiter, R.D. (1998). The elusive function of metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8428-8430.
- Palmiter, R.D. (2004). Protection against zinc toxicity by metallothionein and zinc transporter 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4918-4923.
- Park, H.C., Kang, Y.H., Chun, H.J., Koo, J.C., Cheong, Y.H., Kim, C.Y., Kim, M.C., Chung, W.S., Kim, J.C., Yoo, J.H., Koo, Y.D., Koo, S.C., Lim, C.O., Lee, S.Y., Cho, M.J. (2002). Characterization of a stamen-specific cDNA encoding a novel plant defensin in Chinese cabbage. *Plant Mol Biol* **50**, 59-69.
- Pence, N.S., Larsen, P.B., Ebbs, S.D., Latham, D.L., Lasat, M.M., Garvin, D.F., Eide, D., Kochian, L.V. (2000). The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4956-4960.
- Penninckx, I.A., Eggermont, K., Terras, F.R., Thomma, B.P., De Samblanx, G.W., Buchala, A., Metraux, J.P., Manners, J.M., Broekaert, W.F. (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in Arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* **8**, 2309-2323.
- Penninckx, I.A., Thomma, B.P., Buchala, A., Metraux, J.P., Broekaert, W.F. (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 2103-2113.
- Perfus-Barbeoch, L., Leonhardt, N., Vavasseur, A., Forestier, C. (2002). Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J* **32**, 539-548.
- Persans, M.W., Nieman, K., Salt, D.E. (2001). Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9995-10000.
- Pianelli, K. (2004). Recherche des déterminants moléculaires de la tolérance aux métaux lourds dans la plante hyperaccumulatrice *Thlaspi caerulescens*: Analyse du rôle de la nicotianamine dans la tolérance au nickel. In Thèse, Université Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc.
- Pianelli, K., Mari, S., Marquès, L., Lebrun, M., Czernic, P. (2005). Nicotianamine over-accumulation confers resistance to nickel in *Arabidopsis thaliana*. *Transgenic Research* **14**, 739-748.
- Pilon-Smits, E. (2005). Phytoremediation. *Annu Rev Plant Biol* **56**, 15-39.

- Pollard, A.J., Powell, K.D., Harper, F.A., Smith, J.A. (2002). The genetic basis of metal hyperaccumulation in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **21**, 539-566.
- Rausser, W.E. (1999). Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochem Biophys* **31**, 19-48.
- Rea, P.A. (2003). Ion genomics. *Nat Biotechnol* **21**, 1149-1151.
- Robson, K.J. (2004). Hcpidin and its role in iron absorption. *Gut* **53**, 617-619.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.
- Salt, D.E., Prince, R.C., Baker, A.J.M., Raskin, I., Pickering, I.J. (1999). Zinc ligands in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X-ray absorption spectroscopy. *Environmental Science Technology* **33**, 713-717.
- Sarret, G., Saumitou-Laprade, P., Bert, V., Proux, O., Hazemann, J.L., Traverse, A., Marcus, M.A., Manceau, A. (2002). Forms of zinc accumulated in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiol* **130**, 1815-1826.
- Schwartz, C., Morel, J.-L., Saumier, S., Whiting, S.N., Baker, A.J.M. (1999). Root development of the Zinc-hyperaccumulator plant *Thlaspi caerulescens* as affected by metal origin, content and localization in soil. *Plant and Soil* **208**, 103-115.
- Segura, A., Moreno, M., Madueno, F., Molina, A., Garcia-Olmedo, F. (1999). Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* **12**, 16-23.
- Song, W.Y., Martinoia, E., Lee, J., Kim, D., Kim, D.Y., Vogt, E., Shim, D., Choi, K.S., Hwang, I., Lee, Y. (2004). A novel family of cys-rich membrane proteins mediates cadmium resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol* **135**, 1027-1039.
- Song, X., Wang, J., Wu, F., Li, X., Teng, M., Gong, W. (2005). cDNA cloning, functional expression and antifungal activities of a dimeric plant defensin SPE10 from *Pachyrrhizus erosus* seeds. *Plant Mol Biol* **57**, 13-20.
- Taji, T., Seki, M., Satou, M., Sakurai, T., Kobayashi, M., Ishiyama, K., Narusaka, Y., Narusaka, M., Zhu, J.K., Shinozaki, K. (2004). Comparative genomics in salt tolerance between Arabidopsis and Arabidopsis-related halophyte salt cress using Arabidopsis microarray. *Plant Physiol* **135**, 1697-1709.
- Terras, F.R., Schoofs, H.M., De Bolle, M.F., Van Leuven, F., Rees, S.B., Vanderleyden, J., Cammue, B.P., Broekaert, W.F. (1992). Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J Biol Chem* **267**, 15301-15309.
- Terras, F.R., Torrekens, S., Van Leuven, F., Osborn, R.W., Vanderleyden, J., Cammue, B.P., Broekaert, W.F. (1993). A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. *FEBS Lett* **316**, 233-240.
- Terras, F.R., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N.V., Osborn, R.W., Kester, A., Rees, S.B., Torrekens, S., Van Leuven, F., Vanderleyden, J., Cammue, B.P., Broekaert, W.F. (1995). Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell* **7**, 573-588.
- Thevissen, K., Ghazi, A., De Samblanx, G.W., Brownlee, C., Osborn, R.W., Broekaert, W.F. (1996). Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *J Biol Chem* **271**, 15018-15025.
- Thevissen, K., Terras, F.R., Broekaert, W.F. (1999). Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl Environ Microbiol* **65**, 5451-5458.
- Thevissen, K., Cammue, B.P., Lemaire, K., Winderickx, J., Dickson, R.C., Lester, R.L., Ferket, K.K., Van Even, F., Parret, A.H., Broekaert, W.F. (2000a). A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of

- Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). Proc Natl Acad Sci U S A **97**, 9531-9536.
- Thevissen, K., Osborn, R.W., Acland, D.P., Broekaert, W.F.** (2000b). Specific binding sites for an antifungal plant defensin from Dahlia (*Dahlia merckii*) on fungal cells are required for antifungal activity. Mol Plant Microbe Interact **13**, 54-61.
- Thevissen, K., Ferket, K.K., Francois, I.E., Cammue, B.P.** (2003a). Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. Peptides **24**, 1705-1712.
- Thevissen, K., Francois, I.E., Takemoto, J.Y., Ferket, K.K., Meert, E.M., Cammue, B.P.** (2003b). DmAMP1, an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*), interacts with sphingolipids from *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Lett **226**, 169-173.
- Thevissen, K., Warnecke, D.C., Francois, I.E., Leipelt, M., Heinz, E., Ott, C., Zahringer, U., Thomma, B.P., Ferket, K.K., Cammue, B.P.** (2004). Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. J Biol Chem **279**, 3900-3905.
- Thevissen, K., Idkowiak-Baldys, J., Im, Y.J., Takemoto, J., Francois, I.E., Ferket, K.K., Aerts, A.M., Meert, E.M., Winderickx, J., Roosen, J., Cammue, B.P.** (2005). SKN1, a novel plant defensin-sensitivity gene in *Saccharomyces cerevisiae*, is implicated in sphingolipid biosynthesis. FEBS Lett **579**, 1973-1977.
- Thomma, B.P., Cammue, B.P., Thevissen, K.** (2002). Plant defensins. Planta **216**, 193-202.
- Thomma, B.P.H.J., and Broekaert, W.F.** (1998). Tissue-specific expression of plant defensin genes *PDF2.1* and *PDF2.2* in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology and Biochemistry **36**, 533-537.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res **22**, 4673-4680.
- Turrini, A., Sbrana, C., Pitto, L., Ruffini Castiglione, M., Giorgetti, L., Briganti, R., Bracci, T., Evangelista, M., Nuti, M.P., Giovannetti, M.** (2004). The antifungal Dm-AMP1 protein from *Dahlia merckii* expressed in *Solanum melongena* is released in root exudates and differentially affects pathogenic fungi and mycorrhizal symbiosis. New Phytologist **163**, 393-403.
- Vacchina, V., Mari, S., Czernic, P., Marques, L., Pianelli, K., Schaumlöffel, D., Lebrun, M., Lobinski, R.** (2003). Speciation of nickel in a hyperaccumulating plant by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray MS/MS assisted by cloning using yeast complementation. Anal Chem **75**, 2740-2745.
- van der Zaal, B.J., Neuteboom, L.W., Pinas, J.E., Chardonnens, A.N., Schat, H., Verkleij, J.A., Hooykaas, P.J.** (1999). Overexpression of a novel Arabidopsis gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. Plant Physiol **119**, 1047-1055.
- van Hoof, N.A., Hassinen, V.H., Hakvoort, H.W., Ballintijn, K.F., Schat, H., Verkleij, J.A., Ernst, W.H., Karenlampi, S.O., Tervahauta, A.I.** (2001). Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene. Plant Physiol **126**, 1519-1526.
- Vasak, M., and Hasler, D.W.** (2000). Metallothioneins: new functional and structural insights. Curr Opin Chem Biol **4**, 177-183.

- Vatamaniuk, O.K., Mari, S., Lu, Y.P., Rea, P.** (1999). AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: Isolation and *in vitro* reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7110-7115.
- Vert, G., Briat, J.F., Curie, C.** (2001). Arabidopsis IRT2 gene encodes a root-periphery iron transporter. *Plant J* **26**, 181-189.
- Walker, C.F., and Black, R.E.** (2004). Zinc and the risk for infectious disease. *Annu Rev Nutr* **24**, 255-275.
- Watt, N.T., and Hooper, N.M.** (2003). The prion protein and neuronal zinc homeostasis. *Trends Biochem Sci* **28**, 406-410.
- Weber, M., Harada, E., Vess, C., Roepenack-Lahaye, E., Clemens, S.** (2004). Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. *Plant J* **37**, 269-281.
- Wenzel, H.J., Cole, T.B., Born, D.E., Schwartzkroin, P.A., Palmiter, R.D.** (1997). Ultrastructural localization of zinc transporter-3 (ZnT-3) to synaptic vesicle membranes within mossy fiber boutons in the hippocampus of mouse and monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12676-12681.
- Yamada, S., Komori, T., Imaseki, H.** (1997). PGR 97-131. *Plant Physiol* **115**, 314.
- Zhao, F.J., Lombi, E., Breedon, T., McGrath, S.P.** (2000). Zinc hyperaccumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri*. *Plant, Cell Env* **23**, 507-514.
- Zhao, H., and Eide, D.** (1996a). The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271**, 23203-23210.
- Zhao, H., and Eide, D.** (1996b). The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2454-2458.
- Zhao, H., Butler, E., Rodgers, J., Spizzo, T., Duesterhoeft, S., and Eide, D.** (1998). Regulation of zinc homeostasis in yeast by binding of the ZAP1 transcriptional activator to zinc-responsive promoter elements. *J Biol Chem* **273**, 28713-28720.
- Zhou, J., and Goldsbrough, P.B.** (1995). Structure, organization and expression of the metallothionein gene family in *Arabidopsis*. *Mol Gen Genet* **248**, 318-328.
- Zimmermann, M.B., and Hurrell, R.F.** (2002). Improving iron, zinc and vitamin A nutrition through plant biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 142-145.

Annexes

Tableaux récapitulatifs des nomenclatures et accessions des défensines chez *A. thaliana*, *A. halleri* et *R. sativus*.

a) *Arabidopsis thaliana*

Famille	Gène	Locus génomique
<i>AtPDF1</i>	<i>AtPDF1.1</i>	At1g75830
	<i>AtPDF1.2a</i>	At5g44420
	<i>AtPDF1.2b</i>	At2g26020
	<i>AtPDF1.2c</i>	At2g44430
	<i>AtPDF1.3</i>	At2g26010
	<i>AtPDF1.4</i>	At1g19610
	<i>AtPDF1.5</i>	At1g55010
<i>AtPDF2</i>	<i>AtPDF2.1</i>	At2g02120
	<i>AtPDF2.2</i>	At2g02100
	<i>AtPDF2.3</i>	At2g02130
	<i>AtPDF2.4</i>	At1g61070
	<i>AtPDF2.5</i>	At5g63660
	<i>AtPDF2.6</i>	At2g02140
<i>AtPDF3</i>		At5g38330
		At4g30070

b) *Arabidopsis halleri*

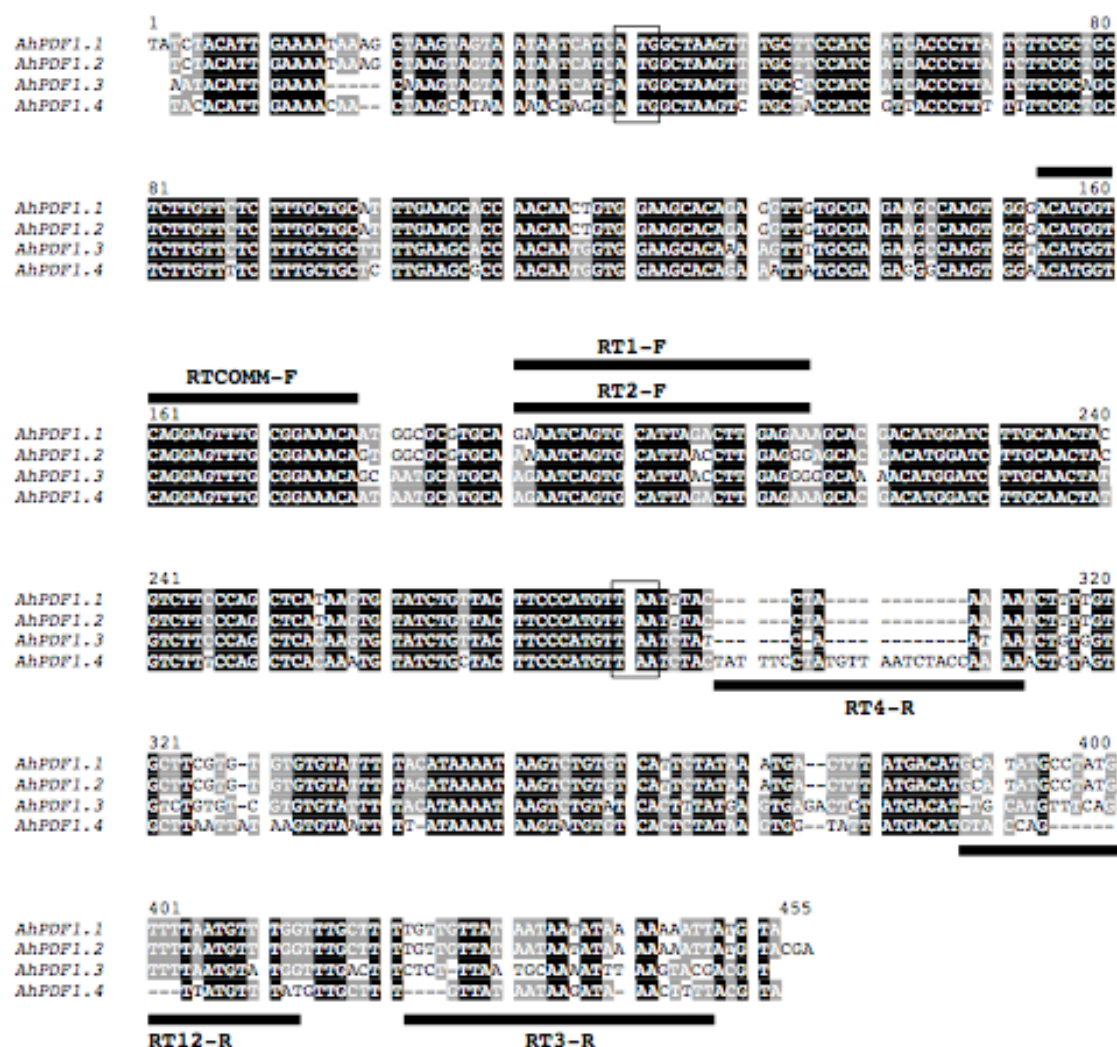
Famille	Gène	Accession GenBank provisoire
<i>AhPDF1</i>	<i>AtPDF1.1</i>	AY961376
	<i>AtPDF1.2</i>	AY961377
	<i>AtPDF1.3</i>	AY961378
	<i>AtPDF1.4</i>	AY961379

c) *Raphanus sativus*

Famille	Gène	Accession
<i>RsAFP</i>	<i>RsAFP1</i>	P69241
	<i>RsAFP2</i>	P30230
	<i>RsAFP3</i>	O24332
	<i>RsAFP4</i>	O24331

Alignement des séquences nucléotidiques des ADNc *AhPDF1.1*, *AhPDF1.2*, *AhPDF1.3* et *AhPDF1.4* indiquant la position des amorces choisies pour la transcription reverse.

L'alignement est celui décrit dans le chapitre I des résultats. Le codon d'initiation de la traduction (ATG) et le codon Stop (TAA) sont encadrés. Les barres noires indiquent la position des amorces spécifiques de chaque gène : *AhPDF1.1* (RT1-F ; RT12-R), *AhPDF1.2* (RT2-F ; RT12-R), *AhPDF1.3* (RTCOMM-F ; RT3-R) et *AhPDF1.4* (RTCOMM-F; RT4-R). Les amorces 5'-3' (notées -F) sont indiquées au dessus de l'alignement, les amorces 3'-5' (notées -R) étant dessinées sous l'alignement.



Séquences nucléotidiques des amorces mentionnées dans la partie Matériel et méthodes.

Nom	Séquence 5'-3'
AFPSTOP	CCCATGTTAATTTAGAATTCAAT
AtPDF-F	AATAATCACCATGGCTAAGTCTGC
AtPDF-R	ATTGAATTCTAAATTAACATGGG
M13	AGGAAACAGCTATGAC
MFAFP1	GGGGTAAGCTTGGATAAAAGACAGAGGTTGTG CGAGAAGCC
MFEco	CGGAATTCATGAGATTTCCCTCAATTTTTACTGC
MFHindXho	CCGCTCGAGTCTCTTTTATCCAAGCTTATCCC
POLYA	AGGGATGTATCGGTCAGTCA
RT1-F	GAAATCAGTGCATTAGACTTGAGAA
RT2-F	AAAATCAGTGCATTAACCTTGAGGG
RTCOMM-F	ACATGGTCAGGAGTTTGCGGAAACA
RT12-R	CCAAACATTAACATAGGCATATG
RT3-R	CGTACTTAAATTTGCATTAAGAG
RT4-R	TTTTGGTAGATTAACATAGGAAATA
RTACTINE-F	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG
RTACTINE-R	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC
TPI	ATTTACTATTTTTCCCTTCTTACG