

Université de Montréal

**Caractérisation et étude de la régulation d'une isoforme
cytosolique de peroxyrédoxine chez les solanacées**

par

Émilie Maheux

Département des sciences biologiques

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté Faculté des arts et des sciences
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en sciences biologiques

Août 2012

© Émilie Maheux, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation et étude de la régulation d'une isoforme cytosolique de peroxyrédoxine
chez les solanacées

Présenté par :
Émilie Maheux

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Mohamed Hijri, PhD, président-rapporteur
Jean Rivoal, PhD, directeur de recherche
Daniel P. Matton, PhD, membre du jury

Résumé

Les peroxyrédoxines (PRXs) forment une famille de peroxydases récemment découvertes communes à tous les organismes vivants et ubiquitaires dans la cellule. Leur particularité provient d'un ou deux résidus cystéines actifs accomplissant un cycle d'oxydo-réduction à l'aide d'un donneur d'électron. Ces protéines thiols sensibles au potentiel redox sont impliquées dans le mécanisme de détoxification du H₂O₂, une molécule oxydante induite lors de situations de stress biotiques et abiotiques. Les PRXs pourraient être induites par le stress et régulées par phosphorylation. En effet, des expérimentations *in vitro* ont démontré que la nucléoside diphosphate kinase 1 (NDPK1) a la capacité de phosphoryler une PRX cytosolique de pomme de terre.

Ce mémoire décrit les travaux expérimentaux effectués pour caractériser de façon préliminaire la fonction de la PRX. Pour cela, le clonage d'une isoforme a été effectué, suivi d'une caractérisation biochimique et d'une étude d'expression de la protéine. Les données de séquençage révèlent qu'il s'agit d'une PRX de type II phylogénétiquement liée aux PRXs cytosoliques. L'ADNc codant pour cette peroxyrédoxine (PRX1) a été cloné chez *Solanum chacoense*. Une protéine recombinante portant une étiquette (6xHis) en N-terminale a été produite. Des essais enzymatiques ont confirmé la fonction antioxydante de la protéine recombinante et un anticorps polyclonal a été généré chez le lapin puis utilisé en conjonction avec un anticorps anti-NDPK1 pour déterminer les patrons d'expression généraux de ces protéines chez *Solanum lycopersicum* et *Solanum tuberosum* lors de situations de stress. Les données démontrent que les deux protéines sont généralement co-exprimées mais pas co-réglées et que la PRX1 est induite en certaines situations de stress.

Mots-clés : peroxyrédoxine, peroxydase, phosphorylation, nucléoside diphosphate kinase, stress, oxydation

Abstract

The peroxiredoxins (PRXs) are a recently discovered family of peroxidases found in all organisms and ubiquitous in the cell. An important particularity of these proteins is the presence of one or two active cysteines that accomplish an oxydo-reduction cycle with an electron donor. The PRXs are sensitive to the redox potential and are implicated in the detoxification of the H₂O₂, an oxidante molecule induced in stress situations. The PRXs should be induced in stress situations and regulated by phosphorylation. Indeed, *in vitro* experimentations have shown that the NDPK1 can phosphorylate a cytosolic PRX isoform of the potato.

This dissertation describes the experimentation made to acquire a preliminary understanding of the function of the PRX. For this purpose, we cloned a PRX isoform, followed by a biochemical characterization and expression studies of the protein. The sequencing data shown a type II PRX phylogenetically related to the cytosolic isoforms. The cDNA of this peroxiredoxin (PRX1) has been cloned in *Solanum chacoense*. The recombinant protein produced had a N-terminal (6xHis) tag. Enzymatic assays confirmed the antioxidant activity of the recombinant protein and a polyclonal antibody has been generated from the rabbit. This antibody was used in conjunction with an antibody anti-NDPK1 to determine the general expression patterns of those proteins during stresses in *Solanum lycopersicum* and *Solanum tuberosum*. The results obtained showed that the two proteins are generally co-expressed but not co-regulated. Obvious experimental facts displayed an induction of the PRX1 in biotic and abiotic stresses situations.

Keywords : peroxiredoxin, peroxidase, phosphorylation, nucleoside diphosphate kinase, stresses, oxydation

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Abréviations.....	ix
Remerciements.....	xiii
Introduction et revue de littérature.....	1
1.1 Le métabolisme aérobie.....	1
1.2 Les formes réactives de l'oxygène (ROS).....	2
1.2.1 Les ROS dans la mitochondrie.....	3
1.2.2 Les ROS dans le chloroplaste.....	4
1.2.3 Les ROS dans le peroxysome.....	5
1.2.4 Les ROS dans les autres compartiments cellulaires, dans le cytosol et dans la matrice extracellulaire.....	5
1.3 Les dommages générés par les ROS.....	6
1.3.1 Le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$).....	7
1.3.2 Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).....	8
1.3.3 Le radical hydroxyle ($\cdot OH$).....	10
1.3.4 L'oxygène singulet (1O_2).....	11
1.3.5 Le stress par oxydation.....	12
1.4 Les défenses contre l'oxydation.....	13
1.4.1 L'oxydase alternative (AOX).....	13
1.4.2 Les superoxyde dismutases (SODs).....	14
1.4.3 La catalase (CAT).....	15
1.4.4 La peroxydase à ascorbate (APX).....	15
1.4.5 La peroxydase à glutathion (GPX).....	16
1.4.6 Les peroxyrédoxines (PRXs).....	17

1.5 Les ROS occupent des fonctions cellulaires essentielles par leur implication dans les mécanismes de défense et la signalisation cellulaire	26
1.5.1 La croissance cellulaire.....	27
1.5.2 L'ouverture et la fermeture des stomates.....	28
1.5.3 La défense contre les pathogènes.....	29
1.6 Le H ₂ O ₂ occupe un rôle prépondérant dans la signalisation cellulaire	30
1.6.1 Le H ₂ O ₂ est une molécule mobile	31
1.6.2 La signalisation par le H ₂ O ₂ implique la modification de résidus Cys et Met.....	32
1.6.3 L'expression des PRXs pourrait moduler la concentration en H ₂ O ₂	35
1.7 Objectifs de la recherche présentée dans ce mémoire.....	35
Matériels et méthodes	38
2.1 Produits chimiques, matériel biologique et origine du matériel végétal.....	38
2.2 Clonage et séquençage d'un ADNc codant pour une peroxyrédoxine	38
2.3 Expression de la protéine recombinante PRX1 dans les bactéries.....	39
2.4 Induction et purification de la protéine recombinante	41
2.5 Traitements du matériel végétal pour les études d'expression et les stress	42
2.5.1 Études d'expression au cours du développement	42
2.5.2 Études d'expression suite à un stress	43
2.6 Extraction, dosage et analyse des protéines par SDS-PAGE.....	47
2.7 Mesure de l'activité enzymatique de la peroxyrédoxine	48
2.8 Production d'un sérum polyclonal anti-PRX.....	48
2.9 Analyse des protéines par transfert Western et immunodétection.....	49
2.10 Étude des ARN par hybridation Northern.....	50
Résultats.....	52
3.1 Clonage, analyse et identification de la séquence de la PRX1	52
3.2 Génération de la (6xHis)ScPRX1, purification de la protéine recombinante et démonstration de son activité peroxydase	55
3.3 Expression de PRX1 dans différents tissus chez <i>S. lycopersicum</i>	58

3.4 Étude de la modulation de l'expression de la PRX1 et de la NDPK1 par des stress abiotiques dans les cultures cellulaires de pomme de terre.....	60
3.4.1 Expression de la PRX1 et de la NDPK1 suite à un stress par des agents oxydants dans les cultures cellulaires de pomme de terre	61
3.4.2 Expression de la PRX1 suite à des stress abiotiques	65
3.5 Étude de la modulation de l'expression de la PRX1 et de la NDPK1 par des stress biotiques	68
3.5.1 Expression de la PRX1 et de NDPK1 suite à un traitement par des bactéries pathogènes	69
3.5.2. La PRX1 est induite par l'interaction compatible avec le nématode <i>Meloidogyne hapla</i>	72
Discussion	74
4.1 ScPRX1 est une PRX de type II typique	75
4.2 ScPRX1 code pour une protéine ayant une activité peroxydase.....	76
4.3 La PRX1 est induite par des situations de stress abiotiques et biotiques.....	78
4.4 La PRX1 et la NDPK1 sont co-exprimées mais pas forcément co-régulées ...	83
Conclusion	86
Bibliographie.....	88
Annexe 1	i
Introduction (annexe).....	i
Matériels et méthodes (annexe)	ii
2.1 Constructions pour l'expression de la PRX1 chez la tomate	ii
2.2 Génération et propagation des racines transgéniques de tomates	iii
Résultats (annexe).....	v
3.1 Évaluation du niveau d'expression de la PRX dans des racines transgéniques. v	
Littérature citée	viii

Liste des tableaux

Tableau I : Les cibles cellulaires des principales formes réactives de l'oxygène et de l'azote.....	7
Tableau II : Principales caractéristiques des isoformes de PRXs d' <i>Arabidopsis thaliana</i> ..	18

Liste des figures

Figure 1: Principaux sites de formation des ROS dans la cellule.....	3
Figure 2 : Réduction d'un substrat oxydant par une PRX 2-Cys typique.....	24
Figure 3 : Clonage de l'ADN ScPRX1.....	40
Figure 4 : Clonage de ScPRX1 dans le vecteur d'expression bactérienne pProEx HTb	41
Figure 5 : Séquences nucléotidique et protéique de la protéine codée par ScPRX1.	52
Figure 6 : Alignements de séquences PRX de type II démontrant une forte homologie de séquence avec la protéine ScPRX1.....	54
Figure 7 : Arbre phylogénique de ScPRX1 avec des séquences PRX de type II d'origines végétales.....	55
Figure 8 : Séquence protéique déduite de la protéine (6xHis)ScPRX1.....	56
Figure 9 : Analyse par SDS-PAGE de la purification de la protéine recombinante (6xHis)ScPRX1.....	57
Figure 10 : Mise en évidence de l'activité de peroxydase de la (6xHis)ScPRX1	58
Figure 11 : Patron d'expression de la PRX1 de <i>S. lycopersicum</i>	60
Figure 12 : Effets des traitements de cultures cellulaires de pomme de terre avec du H ₂ O ₂	63
Figure 13 : Effets des traitements de cultures cellulaires de pomme de terre avec le tBOOH.....	64
Figure 14 : Effets de traitements de cellules de pomme de terre à des extrêmes de températures.....	65
Figure 15 : Effets du traitement de cellules de pomme de terre à un stress hypoxique	67
Figure 16 : Effet-dose de la salinité sur l'expression de la PRX1 et de la NDPK1 sur des cellules de pomme de terre	68

Figure 17 : Effets de traitements de cellules de pomme de terre avec des agrobactéries	70
Figure 18 : Effets de traitements de cellules de pomme de terre avec <i>P. syringae</i> pv. <i>Tomato</i> DC 3000.....	71
Figure 19 : Effet d'une infection des racines de <i>S. lycopersicum</i> avec le nématode <i>M. hapla</i>	73
Figure 20 : Clonage de la PRX1 dans le vecteur d'expression végétale pGA643	iii
Figure 21 : Criblage des clones racinaires transgéniques pour la PRX1	vii

Abréviations

2,4-D : acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

aa : acide aminé

ABA : acide abscissique

ADH : alcool déhydrogénase

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADNct : ADN chloroplastique

ADNmt : ADN mitochondrial

ADN-T : ADN de transfert

AOX : oxydase alternative

APX : peroxydase à ascorbate

Arg: arginine

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ATP : adénosine triphosphate

BCIP : 5-bromo, 4-chloro, 3-indolylphosphate

BD Ti : bordure droite du plasmide Ti

BG Ti : bordure gauche du plasmide Ti

Ca²⁺ : ion calcium

CaCl₂ : chlorure de calcium

CAT : catalase

CBL : calcineurin B-like protein

CDK : kinase cycline-dépendante

CTE : chaîne de transport d'électrons

Cu/Zn-SOD : cuivre/zinc superoxyde dismutase

Cys : cystéine

DHA : déhydroascorbate

DTT : dithiothréitol

\bar{e} : électron

EC : commission des enzymes

EST : marqueur de séquence exprimée

ETOH : éthanol

Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ : sulfate ammonium ferreux

Fe-S : groupement fer-soufre

Fe-SOD : fer superoxyde dismutase

GAPDH : glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase

GPx : peroxydase à glutathion

GR : glutathion réductase

GRX : glutarédoxine

GSH : glutathion

GSSG : glutathion oxydé

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HCl : acide chlorhydrique

His : histidine

IgG : immunoglobuline G

IPTG : isopropyl β -D thiogalactose

K_{cat} : constante catalytique

kDa: kilodalton

MAPK : protéine kinase "mitogen-activated"

MDA : monodéhydroascorbate

MDAR : monodéhydroascorbate réductase

Met : méthionine

Met-SO : méthionine sulfoxyde

MgCl₂: chlorure de magnésium

Mn-SOD : SOD à manganèse

MOPS : 3-(N-morpholino) acide propanesulfonique

MS: Murashige-Skoog

MYA : malt, levure, agar

NADPH : nicotinamide adénine di-nucléotide phosphate

NaOAc: acétate de sodium

NBT : nitro bleu tetrazolium

NDPK : nucléoside diphosphate kinase

NO[·] : radical monoxyde d'azote

NPK : azote, phosphore, potassium

NTR: NADPH thiorédoxine réductase

¹O₂ : oxygène singulet

O₂ : dioxygène

O₂^{·-} : radical superoxide

[·]OH : radical hydroxyl

ONOO⁻ : peroxy nitrite

ONOOH : acide peroxy nitreux

PAR : rayonnement photosynthétiquement actif

Pb : paire de bases

PCR : réactions en chaînes de la polymérase

pH : potentiel Hydrogène

PMSF : fluorure de phénylméthylsulfonyl

Pro : proline

PRX : peroxyrédoxine

PSI : photosystème I

PVPP : polyvinylpyrrolidone insoluble

RNS : formes réactives de l'azote

ROS : formes réactives de l'oxygène

Rpm : rotation par minute

RT-PCR : transcription inverse de la réaction en chaînes de la polymérase

SA : acide salicylique

SCM : site de clonage multiple

SDS-PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium

Ser : sérine

SH : groupement thiol

SOD : superoxyde dismutase

SO₂H : acide sulfinique

SO₃H : acide sulfonique

SOH : acide sulfénique

S-S : pont disulfure

SSC : citrate de sodium et chlorure de sodium

tBOOH : tert-butyl-hydroperoxyde

Thr: thréonine

TRX : thiorédoxine

UV : ultra-violet

YEP : extrait de levure, peptone

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche Jean Rivoal pour le temps qu'il a consacré à me guider et me soutenir tout au long de ce projet de maîtrise.

Un remerciement spécial pour Sonia Dorion, pour son aide soutenue au laboratoire lors de mes expérimentations de même que pour son soutien technique en de nombreuses occasions. Sa présence et son engagement envers les projets qui se déroulent au laboratoire sont incomparables. J'ai apprécié particulièrement sa disponibilité, ses conseils avisés et son partage de connaissances scientifiques.

Je voudrais remercier également M. D. P. Matton pour l'ADNc qu'il nous a fourni et M. Guy Bélair, pour son accueil dans son laboratoire lors d'expérimentations avec les nématodes.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers les membres de mon jury qui ont mis du temps pour évaluer ce mémoire et pour les conseils retenus pour améliorer la qualité de ce manuscrit.

Introduction et revue de littérature

1.1 Le métabolisme aérobie

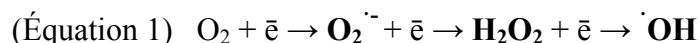
L'évolution des cyanobactéries photosynthétiques, il y a plus de 3 milliards d'années, serait à l'origine de l'accumulation d'oxygène dans l'atmosphère terrestre. Les cyanobactéries auraient été les premiers organismes à exploiter l'énergie solaire. Les rayons lumineux étaient utilisés par ces êtres vivants pour scinder les molécules d'eau et ainsi obtenir le pouvoir réducteur nécessaire à leur métabolisme. L'O₂, le sous-produit de cette réaction, a été accumulé dans l'atmosphère. La formation de la couche d'ozone a suivi, constituant alors une protection contre les rayons UV et permettant la colonisation des milieux terrestres par des organismes jusqu'alors anaérobies. La transition vers le métabolisme aérobie a engendré une plus grande complexité des organismes vivants et a certainement constitué un avantage évolutif d'un point de vue énergétique. En effet, chez les organismes aérobies, l'O₂ est utilisé comme accepteur final d'électrons dans la chaîne de transport de la respiration et procure, à partir d'une molécule d'hexose, une production d'ATP jusqu'à 15 fois supérieure comparativement à la respiration anaérobie (Regelsberger et al. 2002; Halliwell 2006). En contrepartie, l'utilisation métabolique de l'O₂ engendre la formation de sous-produits cytotoxiques, soit des molécules dérivées de l'O₂, exerçant un fort pouvoir oxydant. Les organismes aérobies ont donc eu avantage à développer un système de défense pour contrôler la toxicité de ces molécules.

Dans cette introduction, ma revue de littérature va dévoiler les principaux enjeux du métabolisme aérobie chez les végétaux en décrivant sommairement les processus menant à la formation des molécules oxydantes dérivées de l'O₂ ainsi que les mécanismes de détoxification mis en œuvre par la cellule. Une attention particulière sera portée sur l'implication de ces molécules oxydantes dans la régulation de nombreux processus métaboliques et principalement de l'importance du peroxyde d'hydrogène dans la signalisation cellulaire. Enfin, je présenterai les peroxyrédoxines (PRXs), une famille de peroxydases qui pourraient réguler la concentration intracellulaire du peroxyde

d'hydrogène. Une isoforme cytosolique de *Solanum chacoense* (ScPRX1) fera également l'objet d'études expérimentales dans les sections suivantes de ce mémoire.

1.2 Les formes réactives de l'oxygène (ROS)

Chez les organismes aérobies, l'O₂ est utilisé dans une large gamme de réactions de synthèse à la base de la croissance et du développement cellulaire (Babcock 1999). L'O₂ procure le pouvoir réducteur qui permet une plus grande complexité métabolique comparativement aux organismes anaérobies. Par contre, la prédisposition de l'O₂ à accepter des électrons univalents entraîne la production de radicaux libres et de formes réactives de l'oxygène, généralement connues sous le terme de «ROS» dans la littérature (Sweetlove et al. 2002). La réduction incomplète de l'O₂ par le gain de un à trois électrons produit les principales formes de ROS, soit le radical superoxyde (O₂^{•-}), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le radical hydroxyle (•OH) selon l'équation suivante :



Les ROS sont des molécules oxydantes qui, en soutirant des électrons à des molécules organiques essentielles, peuvent gravement altérer les fonctions cellulaires. La production de ces formes réactives de l'oxygène est en grande partie liée au métabolisme aérobie. En effet, Les ROS sont notamment produites par le fonctionnement normal de la mitochondrie lors de la respiration, lors des réactions photochimiques de la photosynthèse ou lors de la photorespiration. De plus, des ROS sont également produites dans tous les compartiments subcellulaires via de nombreux processus métaboliques. Les principaux modes de formation des ROS chez les végétaux seront maintenant explorés. Un schéma général de la formation des molécules oxydantes dérivées de l'O₂ peut être visualisé à la Figure 1 (p.3).

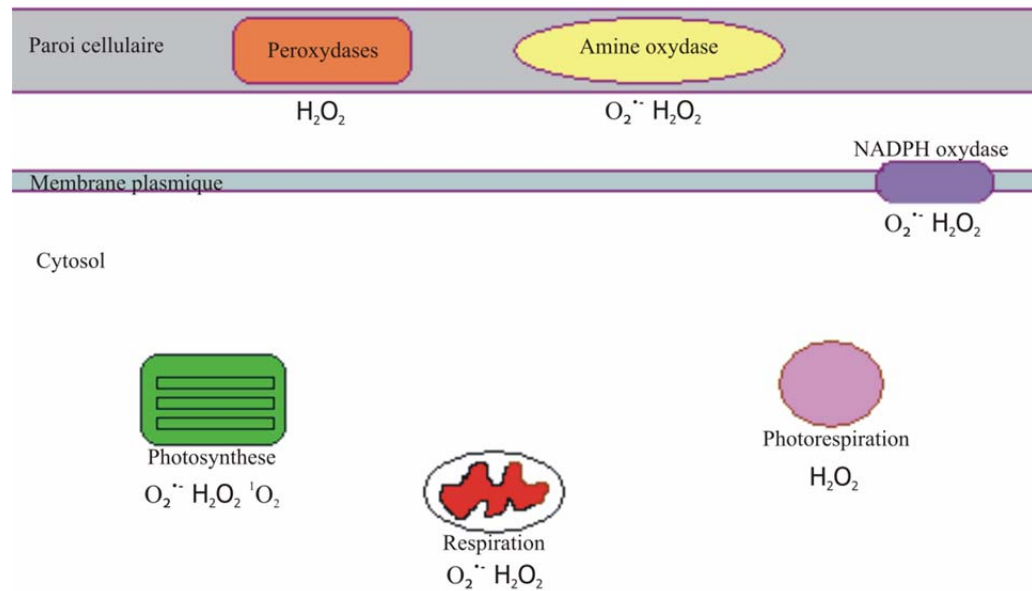


Figure 1: Principaux sites de formation des ROS dans la cellule. La formation du $O_2^{\bullet -}$ provient majoritairement des chaînes de transport d'électrons du chloroplaste et de la mitochondrie et cette molécule est rapidement réduite en H_2O_2 par la SOD. La photorespiration au sein du peroxysome produit du H_2O_2 qui peut rapidement s'échapper dans le cytosol. Au site de la membrane plasmique, la NADPH oxydase produit le $O_2^{\bullet -}$ en réponse aux différents stimuli externes perçus. Les ROS sont également présents dans l'apoplaste par l'action de diverses peroxydases et par l'amine oxydase localisées à la paroi cellulaire.

1.2.1 Les ROS dans la mitochondrie

Lors de la respiration aérobie, la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie permet à l'enzyme cytochrome oxydase du complexe IV de la chaîne respiratoire de réduire l' O_2 de façon tétravalente et de produire de l'eau. Pour ce faire, l'enzyme retire un e^- de chacun des quatre groupes hème- Fe^{2+} contenus dans la molécule de cytochrome *c* et ces quatre e^- servent ensuite à la réduction de l' O_2 en H_2O . Cependant, puisque le transfert de ces quatre e^- ne se produit pas simultanément, des molécules d' O_2 peuvent être partiellement réduites par des e^- solitaires et former le $O_2^{\bullet -}$ (Babcock 1999). On assiste donc à la

production de ce radical principalement en deux sites de la CTE, soit au niveau de la NAD(P)H déshydrogénase du complexe I et au niveau du cytochrome bc_1 du complexe III (Slesak et al. 2007). Cette forme réactive peut également être produite en présence du radical ubiquinone (Gechev et al. 2006). Le $O_2^{\cdot-}$ produit dans la mitochondrie est rapidement réduit en H_2O_2 par l'enzyme Mn-SOD (Moller 2001).

1.2.2 Les ROS dans le chloroplaste

Dans les tissus photosynthétiques de la plante, le chloroplaste est le site majeur de production de ROS (Asada 2006). Au niveau de la CTE chloroplastique, la production du $O_2^{\cdot-}$ survient lors de la réduction monovalente de l' O_2 par la ferrédoxine ou la thiorédoxine réduites ainsi que par des électrons s'échappant des centres Fe-S du PSI. La réduction directe de l' O_2 par des e^- du PS1 est nommée la réaction de Mehler (Gechev et al. 2006; Slesak et al. 2007). Il est estimé que 2 à 5% des e^- de la CTE chloroplastique sont dissipés par cette réaction qui représente une alternative pour éviter la photoinhibition causée par la surréduction de la CTE (Polle 2001; Slesak et al. 2007). Le $O_2^{\cdot-}$ produit par la réaction de Mehler est ensuite dismuté en H_2O_2 par une SOD mitochondriale et cette espèce réactive est à son tour réduite en H_2O par des peroxydases de la mitochondrie. En considérant cette chaîne de réactions, on remarque que les e^- extraits de l' H_2O au site du PSII sont transférés aux molécules d' O_2 pour former le $O_2^{\cdot-}$, à son tour réduit en H_2O_2 puis en H_2O . Cette boucle de réactions est nommée «water-water cycle» (Arnon, 1977; Heber 2002).

Le PSII est également le site de production d'une autre forme réactive, l'oxygène singulet (1O_2), via des molécules excitées du centre réactionnel. Ce phénomène survient par exemple, lors de l'interaction entre une molécule d' O_2 et une chlorophylle excitée (Regelsberger et al. 2002).

1.2.3 Les ROS dans le peroxysome

Le peroxysome serait responsable de la formation de la majorité du H_2O_2 intracellulaire (Del Rio et al. 2006). Effectivement, une importante production de H_2O_2 survient dans cette organelle lors de la photorespiration, qui est un processus connexe à la photosynthèse chez les plantes photosynthétique de type C_3 . La photorespiration se déclenche lors de conditions environnementales qui limitent l'approvisionnement en CO_2 , par exemple lors de la fermeture des stomates observée en période de sécheresse. La photorespiration implique plusieurs étapes qui se déroulent au sein du chloroplaste, de la mitochondrie et du peroxysome. Sommairement, la fermeture des stomates rend la présence de CO_2 limitante pour l'alimentation du processus de la photosynthèse. Dans ces conditions, on peut avoir une augmentation de l'activité oxygénase de la Rubisco située dans le stroma du chloroplaste. La fixation de l' O_2 par l'enzyme entraîne la formation d'un sous-produit, le glycolate, qui est par la suite métabolisé en glycérate et en CO_2 . L'étape de l'oxydation du glycolate par la glycolate oxydase s'effectue dans le peroxysome et cette réaction libère du H_2O_2 (Foyer and Noctor 2003).

D'autres réactions générant des ROS peuvent avoir lieu dans le peroxysome. L'oxydation des acides gras et l'activité des flavines oxydases sont par exemple des processus métaboliques responsables de la formation de ROS dans cette organelle. De plus, dans la matrice peroxysomale, l'activité de la xanthine oxydase catalyse l'oxydation de la xanthine et de l'hypoxanthine en acide urique et produit du $O_2^{\cdot-}$ (Del Rio et al. 2006).

1.2.4 Les ROS dans les autres compartiments cellulaires, dans le cytosol et dans la matrice extracellulaire

La formation du $O_2^{\cdot-}$ est observée lors de certaines réactions d'oxydo-réduction ayant lieu au niveau du réticulum endoplasmique. Les formes réduites du cytochrome P450

et de la cytochrome réductase P450 impliqués dans les processus d'oxydation et d'hydroxylation de même que le cytochrome b_5 et la cytochrome b_5 réductase impliqués dans la désaturation des acides gras peuvent transférer un e^- à l' O_2 . Le $O_2^{\cdot-}$ produit est rapidement convertit en H_2O_2 par l'enzyme SOD. Dans les cellules végétales, le cytosol n'est pas un producteur majeur de H_2O_2 mais formerait plutôt un réservoir pour cette forme réactive provenant des autres compartiments cellulaires discutés ci-dessus (Slesak et al. 2007), puisque les ROS peuvent diffuser d'un compartiment à un autre au sein de la cellule.

Au niveau des espaces extracellulaires, la formation des ROS est également observée en réponse à plusieurs stimuli environnementaux perçus à la surface de la cellule par la membrane plasmique (Scandalios 2005). L'exemple le plus étudié est la NADPH oxydase, localisée sur cette membrane, qui produit des ROS lors de la reconnaissance d'un pathogène (Slesak et al. 2007). Cette enzyme catalyse la formation du $O_2^{\cdot-}$ en réduisant l' O_2 par l'utilisation du pouvoir réducteur du NADPH (Desikan et al. 2001). Le radical produit est ensuite majoritairement retrouvé dans l'apoplaste et est convertit en H_2O_2 par la SOD extracellulaire. D'autres enzymes de l'apoplaste telles que l'amine oxydase et les peroxydases de la paroi cellulaire forment aussi du H_2O_2 au niveau de la matrice extracellulaire (Bolwell et al. 2002).

1.3 Les dommages générés par les ROS

Les formes réactives de l' O_2 sont inévitablement produites par le métabolisme normal de la plante, principalement lors de la respiration et de la photosynthèse. La production de ROS est également augmentée en réponse aux différents stress subis par la plante, accroissant le risque de dommages par oxydation dans les cellules (Kotchoni and Gachomo 2006). Les dommages par oxydation causés par les ROS sont nombreux et varient en fonction de la forme réactive en cause. En effet, l'oxydation des structures cellulaires par les différentes formes réactives ne se fait pas au hasard. De plus, les ROS sont des formes interchangeableables entre elles et leur capacité d'interaction avec d'autres

formes réactives, comme par exemple avec les espèces réactives de l'azote (RNS), peut créer d'autres molécules potentiellement cytotoxiques. Ces caractéristiques démontrent la multitude d'effets que peuvent avoir les ROS au sein d'une cellule (Halliwell 2006). Les effets par oxydation des principales formes de ROS et de RNS seront maintenant survolés et sont regroupés dans le tableau I (p.7).

Tableau I : Les cibles cellulaires des principales formes réactives de l'oxygène et de l'azote. Les formes réactives s'attaquent spécifiquement à différents composants cellulaires par oxydation.

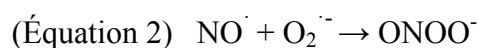
Forme réactive	Cibles cellulaires	Référence
O_2^-	Groupements Fe-S des protéines	Halliwell, 2006
H_2O_2	Groupements thiols des protéines	Bienert et al. 2006
$\cdot OH$	Acides nucléiques, carbohydrates, lipides, protéines	Wiseman et Halliwell, 1996
1O_2	Guanine, lipides	Regelsberger et al. 2002, Moller et al. 2007
$ONOO^-$	Acides nucléiques	Halliwell, 2006
$ONOOH$	Acides nucléiques, carbohydrates, lipides, protéines	Halliwell, 2006

1.3.1 Le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)

La production des ROS implique dans bien des cas une cascade de réactions qui débute avec la production du $O_2^{\cdot-}$. De façon générale, ce radical est rapidement converti en H_2O_2 directement en son site de production par l'enzyme SOD (Bedard and Krause 2007). Le $O_2^{\cdot-}$ oxyde principalement les groupements Fe-S de certaines protéines et peut donc en affecter la fonction catalytique. Les principales enzymes inactivées par ce radical sont impliquées dans la production énergétique et dans le métabolisme des acides aminés.

L'inactivation enzymatique provient de la perte du fer dans le centre catalytique suite à l'oxydation. La protéine oxydée peut par contre être réparée suite à un réassemblage du centre Fe-S (Halliwell 2006; Moskovitz and Stadtman 2003).

Le $O_2^{\cdot-}$ peut également réagir avec le radical NO^{\cdot} , une molécule majeure de la signalisation chez les plantes, et former l'agent mutagène $ONOO^-$, une forme réactive de l'azote (RNS), selon l'équation 2 ci-dessous :



Aux pH physiologiques, le $ONOO^-$ est rapidement protoné en $ONOOH$, qui est un puissant agent oxydant pouvant endommager les protéines, les lipides et l'ADN (Halliwell 2006). L'oxydation des acides nucléiques peut altérer la structure de l'ADN en causant des délétions, des insertions ou des amplifications de séquences de même que des mutations des paires de bases (Wiseman and Halliwell 1996). L'ADNmt et l'ADNct sont principalement susceptibles aux dommages par oxydation car ils sont très peu protégés étant donné qu'ils ne contiennent pas d'histones et de chromatine. De plus, ces génomes sont à proximité des principaux sites de production des espèces réactives (Moller et al. 2007).

1.3.2 Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Le H_2O_2 oxyde préférentiellement les protéines thiols et peut moduler l'activité enzymatique de celles-ci (Moller and Kristensen 2004). Les protéines sont les molécules les plus fréquemment ciblées par les ROS et le niveau de stress par oxydation dans une cellule peut être estimé par des méthodes immunocytochimiques qui quantifient les protéines oxydées. Suite à l'oxydation, les acides aminés du site actif ou ceux qui sont impliqués dans la structure de la protéine peuvent être modifiés ou inactivés. En conséquence, l'activité, la structure ou le repliement normal de la chaîne polypeptidique peuvent être affectés. La majorité des modifications par oxydation sont irréversibles et entraînent la

dégradation protéolytique. Cependant, les acides aminés soufrés peuvent être de nouveau réduits en leur forme initiale et c'est pourquoi les protéines thiols occupent un rôle clé dans la régulation du potentiel redox de la cellule (Jung et al. 2007; Bienert et al. 2006).

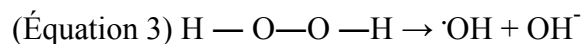
La chaîne latérale de la Cys contient un groupement thiol et cet acide aminé est fréquemment impliqué dans le processus de catalyse des enzymes. L'oxydation des résidus Cys par le H_2O_2 peut provoquer divers changements de conformation des protéines et en modifier les fonctions (Levine et al. 1999). Trois réactions d'oxydation subséquentes sur une Cys forment respectivement l'acide sulfénique (-SOH), l'acide sulfinique (-SO₂H) et l'acide sulfonique (-SO₃H). De plus, suite à l'oxydation de groupements thiol de deux Cys situés à proximité l'un de l'autre, la formation d'un pont disulfure peut survenir. Le pont disulfure peut être de trois types : I) intermoléculaire, qui implique une liaison entre les cystéines de deux sous-unités d'un polymère, II) intramoléculaire, soit entre deux cystéines d'une même chaîne polypeptidique, ou III) mixte, entre deux cystéines de molécules différentes (Hancock et al. 2006). L'action de certaines enzymes dont les TRXs et les GRXs peut rétablir le groupement thiol des Cys oxydées. Ces enzymes peuvent réduire l'acide sulfénique et les ponts disulfures en leur état de thiol initial. Les enzymes sulfurédoxines sont nécessaires à la réduction de l'acide sulfinique en acide sulfénique par une réaction nécessitant de l'ATP. L'oxydation de l'acide sulfinique en acide sulfonique est cependant irréversible. L'acide sulfonique est dommageable pour la cellule alors que les acides sulfénique et sulfinique de même que les états de thiols et les ponts disulfure peuvent être utilisés comme molécules de signalisation cellulaire (Hancock 2006; Moller 2007). Par ailleurs, une quantité importante de protéines thiols régulées par les TRXs a été identifiée dans les mitochondries et les chloroplastes (Moller 2007).

L'oxydation par le H_2O_2 du second acide aminé soufré, la Met, conduit principalement à la formation du composé méthionine sulfoxyde. Cette réaction est réversible par l'action de l'enzyme peptide-méthionine sulfoxyde reductase. Les Met se retrouvent en quantité non négligeable dans les chaînes polypeptidiques des protéines même si leur présence ne semble toutefois pas nécessaire à l'activité catalytique des enzymes. Par ailleurs, la réparation enzymatique des Met oxydées est un processus clé

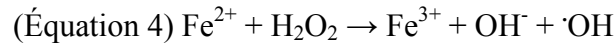
notamment mis à jour chez l'humain car l'état oxydé de cet acide aminé est responsable de nombreuses conditions pathologiques. De plus, l'étude de mutants déficients pour le gène codant pour l'enzyme peptide-méthionine sulfoxyde reductase chez la levure et *Escherichia coli* a révélé une plus grande susceptibilité de ces organismes à un stress par oxydation en comparaison avec les organismes de type sauvage (Sadanandom et al. 2000). Par son impressionnante susceptibilité à l'oxydation, Levine (Levine 1999) et ses collègues ont donc émis l'hypothèse que la Met occupe une fonction antioxydante "de dernière chance". Ce principe suppose que la capacité de la Met à attirer les molécules oxydantes ainsi que sa présence dans les protéines protégeraient les autres acides aminés peptidiques contre l'oxydation. La fonction de la protéine affectée peut ainsi être préservée et le composé méthionine sulfoxyde formé par l'oxydation de la Met peut être subséquentement réduit, et donc réparé (Levine 1999). Cependant, il est à noter que deux réactions oxydantes successives sur une même Met mène à la formation irréversible de la méthionine sulfone, un composé dommageable pour la protéine (Moller 2007).

1.3.3 Le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$)

Le $\cdot\text{OH}$ est un agent oxydant puissant qui possède une courte demi-vie et qui peut s'attaquer à toutes les structures cellulaires directement en son site de production (Halliwell 2006; Wiseman and Halliwell 1996). Ce radical peut être formé à partir du H_2O_2 selon des conditions particulières. Par exemple, en présence de rayons UV, le lien O—O contenu dans le H_2O_2 est rompu et génère le $\cdot\text{OH}$ selon l'équation suivante :



Le radical $\cdot\text{OH}$ est également produit en milieu aqueux dans des conditions acides avec des métaux de transition grâce à une réaction non enzymatique appelée la réaction de Fenton et selon l'équation suivante:



D'autres réactions non-enzymatiques peuvent entraîner la réduction de l' O_2 et la formation de $\cdot\text{OH}$. C'est le cas par exemple de l'acide ascorbique mis en présence d'ions Cu (Schweikert et al. 2000).

Puisque le radical $\cdot\text{OH}$ est une forme réactive hautement dommageable ne pouvant être détoxifiée enzymatiquement, la cellule a élaboré des stratégies visant à en empêcher sa formation. Ces stratégies incluent l'élimination rapide du $\text{O}_2^{\cdot-}$ et du H_2O_2 par le système de défense antioxydant de même que la séquestration des ions métalliques par des protéines liant ces métaux (Gechev et al. 2006).

1.3.4 L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$)

Le $^1\text{O}_2$ est particulièrement dommageable pour les acides gras polyinsaturés constituant les membranes biologiques (Regelsberger et al. 2002). La peroxydation des lipides par cette molécule réactive diminue la fluidité membranaire, en affecte la perméabilité et module l'activité des protéines qui y sont associées (Halliwell et al. 1999). La peroxydation des lipides de la membrane plasmique peut conduire à la perte des constituants cellulaires, à une dessiccation rapide de la cellule et à sa mort. Une attaque des membranes entourant les organelles peut affecter la respiration mitochondriale, détruire les pigments photosynthétiques et empêcher la fixation du carbone dans les chloroplastes (Scandalios 1993). Le $^1\text{O}_2$ peut également modifier l'ADN en s'attaquant principalement à la guanine (Moller 2007). La formation du composé 8-hydroxyguanine est la modification de l'ADN la plus fréquemment observée et la présence de ce composé altère le processus

enzymatique de méthylation des cytosines adjacentes. La méthylation des cytosines est un important processus de régulation de l'expression des gènes (Wiseman 1996).

1.3.5 Le stress par oxydation

De façon générale, la présence des ROS dans les cellules est maintenue à un niveau basal constant (Gechev et al. 2006). Les dommages par oxydation sont ainsi normalement réduits à un degré minimal et les mécanismes de correction de ces dommages sont nombreux : réparation de l'ADN, réassemblage des centre Fe-S, réparation des résidus méthionine des protéines et destruction des protéines et des lipides oxydés (Halliwell 2006). Par contre, l'équilibre redox de la cellule est régulé, entre autres, par les conditions environnementales auxquelles elle est exposée. Ainsi, les stress biotiques et abiotiques subi par l'organisme peuvent élever considérablement le niveau de ROS intracellulaire et augmenter la menace oxydante (Gechev et al. 2006). Le stress par oxydation survient donc lorsqu'il y a un déséquilibre entre la formation des molécules oxydantes et leur métabolisation (Mahalingam et al. 2003). Cette forme de stress est une menace d'autant plus importante chez les plantes car leur immobilité les expose directement aux variations des conditions environnementales et à leurs pathogènes (Scandalios 1993). En situation de stress, la formation accrue des ROS peut dérégler le fonctionnement cellulaire normal et même entraîner la mort de la cellule (Slesak et al. 2007). Nous verrons maintenant que les cellules végétales possèdent des défenses moléculaires efficaces pour contrer les effets néfastes du stress par oxydation.

1.4 Les défenses contre l'oxydation

La bioactivité des ROS peut être contrôlée par le rythme de production de ces formes réactives mais également par leur détoxification. Pour ce faire, les plantes, de même que les autres organismes aérobies, ont évolué en élaborant un important système de détoxification des ROS. Ce système de défense agit de façon à ajuster la concentration intracellulaire de ces molécules oxydantes en fonction des différents besoins de l'organisme liés aux types de cellules, à l'organe et aux différents stades de développement (Gechev et al. 2006). Le système de défense antioxydante repose sur des systèmes d'évitement du stress par oxydation tels que l'oxydase alternative, sur des enzymes de détoxification des ROS (les SODs, la catalase, les peroxydases) et sur des molécules antioxydantes (ascorbate, glutathion et NADPH) (Pauly et al. 2006).

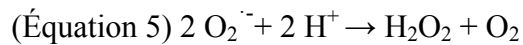
1.4.1 L'oxydase alternative (AOX)

Dans la mitochondrie, la première ligne de défense contre les dommages par oxydation évoque une stratégie visant à éviter le stress par oxydation en conservant l'état oxydé de la CTE. En effet, une surréduction de cette chaîne de transporteurs entraîne une fuite des e^- surnuméraires qui réduisent directement l' O_2 et forment des ROS (Finkemeier et al. 2005). L'AOX mitochondriale entre en compétition avec la cytochrome oxydase du complexe IV de la CTE pour l'acceptation des électrons et restreint ainsi la formation des molécules oxydantes. L'AOX catalyse la réduction tétravalente de l' O_2 en utilisant le pouvoir réducteur de l'ubiquinone de la CTE (Maxwell et al. 1999; Slesak et al. 2007). Cette enzyme est un homodimère localisé dans la matrice de la membrane interne de la mitochondrie. Plusieurs AOXs de cette famille contiennent un résidu Cys conservé permettant un contrôle biochimique de l'enzyme selon les besoins métaboliques de la cellule (Vanlerberghe et al. 2009). En situation de stress, l'activité de cette enzyme est accrue et celle-ci se révèle être particulièrement efficace pour détourner le flux des

électrons surnuméraires et pour réduire la concentration d'O₂ présente dans la mitochondrie (Mittler 2002; Vanlerberghe et al. 2009).

1.4.2 Les superoxyde dismutases (SODs)

La famille des SODs constitue la première ligne de défense contre les ROS car elle converti le radical O₂^{•-} en H₂O₂. Pour ce faire, l'enzyme SOD réduit une première molécule de O₂^{•-} en H₂O₂ et oxyde une seconde molécule de O₂^{•-} en O₂ selon l'équation suivante :



Les SODs doivent donc travailler de concert avec les différentes peroxydases de la cellule pour enrayer la menace oxydante causée par le H₂O₂ (Halliwell 2006). On retrouve au moins un représentant de la famille SOD dans chacun des compartiments cellulaires où le O₂^{•-} est formé. De cette façon, la cellule s'assure que la forme réactive est interceptée immédiatement à même son site de production (Alscher et al. 2002).

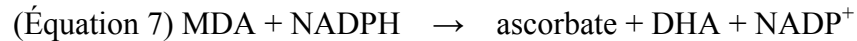
L'activité enzymatique des SODs repose sur la présence d'un groupement actif constitué d'un métal et la réaction catalytique demeure la même peu importe ce métal (Halliwell 2006). Dans le chloroplaste, on retrouve les isoformes dont les groupements métalliques sont constitués d'ions de cuivre/zinc (Cu/Zn-SOD) ou de fer (Fe-SOD). La SOD à manganèse (Mn-SOD) est localisée dans la mitochondrie alors qu'une autre Cu/Zn-SOD est retrouvée dans le cytosol et également possiblement dans l'apoplaste (Alscher et al. 2002).

1.4.3 La catalase (CAT)

L'enzyme peroxysomale CAT est un tétramère de 4 chaînes polypeptidiques d'environ 500 acides aminés. Elle contient 4 groupes prosthétiques hèmes constitués de porphyrine. Une particularité intéressante de l'enzyme CAT est sa capacité à dégrader le H_2O_2 sans consommer de pouvoir réducteur. Cette enzyme est donc insensible au potentiel redox de la cellule (Mittler 2002). Une molécule de CAT peut convertir près d'un million de molécules de H_2O_2 en O_2 et H_2O par seconde mais possède une faible affinité avec son substrat par son K_m allant de 10 à 140 mM de H_2O_2 . Cette enzyme est donc active dans les situations où l'on retrouve de fortes concentrations de H_2O_2 (Dietz et al. 2006; Gechev et al. 2006; Willekens et al. 1997).

1.4.4 La peroxydase à ascorbate (APX)

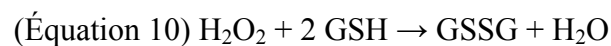
L'APX est une peroxydase dont l'activité catalytique est assurée par un groupe prosthétique hème. On retrouve cette enzyme dans tous les compartiments cellulaires. Il existe notamment deux isoformes chloroplastiques localisées dans le stroma et associées à la membrane du thylakoïde (Dietz et al. 2006). L'APX catalyse la réduction du H_2O_2 en H_2O en utilisant l'ascorbate, considéré comme étant le métabolite principal servant de donneur de pouvoir réducteur aux diverses peroxydases végétales (Foyer and Noctor 2009; Jimenez et al. 1998). Le cycle ascorbate-glutathion est alors enclenché pour la régénération de ce métabolite par une série de réactions enzymatiques décrites à l'aide des équations 6 à 9. Sommairement, la réduction du H_2O_2 par l'APX forme du MDA qui est réduit à son tour en ascorbate par l'activité de l'enzyme MDAR qui utilise le pouvoir réducteur du NADPH ou de la ferredoxine réduite. Le DHA formé par cette réaction est réduit en ascorbate par l'enzyme DHAR qui utilise du GSH. Enfin, le GSSG est réduit par l'enzyme GR qui utilise le NADPH (Apel and Hirt 2004).

APX**MDAR****DHAR****GR**

Seulement de faibles concentrations de H_2O_2 peuvent être réduites par l'APX. Par contre, l'APX a une affinité beaucoup plus grande pour le H_2O_2 que la catalase puisque son K_m est souvent de l'ordre 10-100 μM . Ainsi, cette enzyme sert à la modulation fine du niveau de ROS et joue un rôle dans la signalisation cellulaire (Mittler 2002). Dans le chloroplaste, l'APX occupe un rôle majeur dans la détoxification du H_2O_2 puisque la catalase est absente de cette organelle. De plus, la grande sensibilité de certaines enzymes du cycle de Calvin à l'inactivation par de faibles concentrations de H_2O_2 permet à l'APX d'effectuer son travail (De Gara et al. 2010).

1.4.5 La peroxydase à glutathion (GPX)

La peroxydase à glutathion est une enzyme cytosolique et chloroplastique qui réduit le H_2O_2 en H_2O par l'oxydation de deux molécules de glutathion réduit (GSH) selon l'équation 10 (Halliwell 2006).



Le glutathion est une abondante molécule thiol qui, tout comme l'ascorbate, est majoritairement maintenue à son état réduit dans les cellules vivantes (Foyer and Noctor 2009). L'état oxydé de cette molécule, le GSSG, est constitué de deux molécules de GSH liées par un pont disulfure. Le GSSG sera ensuite réduit en GSH par l'action de l'enzyme glutathion réductase (Halliwell 2006) qui utilise le pouvoir réducteur du NADPH (Apel and Hirt 2004).

1.4.6 Les peroxyrédoxines (PRXs)

Les PRXs sont les peroxydases végétales les plus récemment découvertes. Il est maintenant établi que ces enzymes sont présentes chez tous les organismes vivants et elles ont été identifiées pour la première fois chez les plantes en 1996 (Baier and Dietz 1996). L'importance des PRXs dans la détoxification des molécules oxydantes provient de leur capacité à décomposer non seulement le H_2O_2 en eau mais également les hydroperoxydes d'alkyl en leur alcool respectif et en eau ainsi que de métaboliser le $ONOO^-$ en NO_2^- . Les PRXs modulent donc les voies de signalisation impliquant les ROS\RNS et elles servent également à la protection de l'ADN contre les dommages par oxydation (Dietz et al. 2006).

Le fonctionnement enzymatique des PRXs ne dépend pas de la présence d'un groupe prosthétique mais repose plutôt sur un cycle d'oxydo-réduction impliquant l'utilisation du pouvoir réducteur de protéines thiols (Rouhier et al. 2001). L'activité peroxydase des PRXs dépend donc d'un résidu Cys actif, la Cys peroxydatique. Des expérimentations ont démontré que le remplacement de cette Cys peroxydatique par un résidu Sérine aboli complètement l'activité peroxydase de la protéine mutante (Konig et al. 2002).

Dans la cellule végétale, les PRXs sont abondantes et localisées dans plusieurs compartiments (Tableau II, p.18). L'efficacité de réduction des molécules oxydantes par cette famille de peroxydases se situe entre 1 à 300 moles de substrat réduites par mole d'enzyme (Dietz et al. 2006;Horling et al. 2003;Konig et al. 2003). Elles démontrent donc

une efficacité de réduction du H₂O₂ moindre par rapport aux GPXs mais leur abondance dans la cellule et leur faible Km (normalement < 20 µM) pourraient compenser pour cet état (Halliwell 2006).

Tableau II : Principales caractéristiques des isoformes de PRXs d'*Arabidopsis thaliana*. Les PRXs sont divisées en 4 groupes, soit les PRXs de type 1-Cys, les PRXs 2-Cys typiques, la PRXQ et les PRXs de type II. Les PRXs de type II et les PRXs 2-Cys sont également divisés en sous-classes. Les positions des Cys conservées sont indiquées pour chaque isoforme à l'exception de la PRX 1-Cys qui ne contient qu'un seul résidu Cys. On retrouve au moins une PRX dans le noyau, la mitochondrie, le chloroplaste et le cytosol. La masse moléculaire des PRXs varie de 17.4 à 62.7 kDa et la longueur en acides aminés varie de 199 à 271 selon l'isoforme.

Type	Sous-classe	Positions Cys conservées	Localisation subcellulaire	Masse moléculaire (kDa)	Longueur nucléotidique (aa)
Prx 1-Cys	—	46	Noyau	24.1	216
Prx 2-Cys	A	36, 158	Chloroplaste	29.1	266
	B	36, 158	Chloroplaste	29.6	271
Prx Q	—	54, 59	Chloroplaste	23.7	216
Prx type II	A	51, 76	Cytosol	62.7	553
	B	51, 77	Cytosol	17.4	162
	C	51, 78	Cytosol	17.4	162
	D	51, 79	Cytosol	17.4	174
	E	51, 80	Chloroplaste	24.7	234
	F	59, 84	Mitochondrie	21.2	199

La famille des PRXs est complexe puisqu'elle est composée de plusieurs isoformes regroupées en sous-classes qui partagent une identité de séquences variant de 4% à 96%. Malgré cette forte variabilité de séquences entre les isoformes, les PRXs exercent toutes la même fonction peroxydase selon la base de données Enzyme Commission (classe EC : 1.11.1.15). Chez *Arabidopsis thaliana*, on compte dix cadres de lecture codant pour une

PRX dont au moins huit d'entre elles sont exprimées (Dietz 2003;Horling et al. 2002). Les poids moléculaires de ces protéines varient entre 17 et 22 kDa (Dietz et al. 2006;Rouhier et al. 2002). Les PRXs se distinguent entre elles par leurs similarités de séquence ainsi que leurs mécanismes catalytiques et sont classées en 4 groupes. On dénombre les PRXs 1-Cys, les PRX 2-Cys typiques, les PRX Q et enfin les PRX de type II (Tripathi et al. 2009;Dietz et al. 2002;Rouhier et al, 2002). La classification des isoformes dans ces 4 groupes sera maintenant décrite, ainsi que les mécanismes réactionnels et les processus de régulation propres à chacun.

1.4.6.1 La PRX 1-Cys

La PRX 1-Cys se caractérise par le fait qu'elle ne possède qu'une seule Cys catalytique qui occupe la position 46. Cette isoforme a été découverte chez l'orge en 1996 (Stacy et al. 1996). Chez cet organisme, la PRX 1-Cys est une protéine nucléaire codée par le gène *PERI* et est spécifiquement exprimée dans l'embryon et l'aleurone des graines (Stacy et al. 1999). D'après son patron d'expression, il a été conclu que la PRX 1-Cys protège les composants des semences en dormance contre l'oxydation et la dessiccation. En effet, suite à l'imbibition de la graine, il a été déterminé que chez le riz, les ARNm *PERI* décroissent rapidement jusqu'à devenir indétectable 20 jours suivant le début de la germination. Ces données indiquent que le rôle primaire de la PRX 1-Cys est son activité antioxydante (Lee et al. 2000). De plus, la localisation nucléaire de la PRX 1-Cys suggère qu'elle joue un rôle dans la protection de l'ADN et des composants de la machinerie de transcription pendant la germination et au début de l'établissement de la plante (Dietz et al. 2006).

Le mécanisme de réduction de la PRX 1-Cys lors de son cycle catalytique demeure encore inconnu mais certains auteurs (Pulido et al. 2009) ont émis l'hypothèse que la NTR pourrait effectuer la régénération de la PRX 1-Cys dans le noyau de semences de blé exposées à un stress par oxydation (Tripathi et al. 2009;Stacy et al. 1996).

1.4.6.2 La PRX 2-Cys

La PRX 2-Cys a d'abord été observée dans les bactéries et les levures avant d'être découverte chez les végétaux (Storz et al. 1989; Kim et al. 1988). Il existe deux gènes *PRX 2-Cys* (A et B) dans le génome d'*A. thaliana*. Les protéines de ce groupe contiennent deux résidus Cys catalytiques conservés de façon absolue aux positions 36 et 158 de la séquence codante. Les PRXs 2-Cys contiennent un peptide de transit d'environ 80 acides aminés les confinant dans le chloroplaste (Dietz 2003). Il paraît maintenant bien établi que le rôle primaire des PRXs 2-Cys est la protection des intervenants de l'activité photosynthétique contre l'oxydation résultant des réactions photochimiques (Horling et al. 2001). En accord avec cette fonction, il a été démontré que les PRXs 2-Cys sont exprimées dans tous les tissus photosynthétiques et sont absentes des racines (Rouhier et al. 2004).

La PRX 2-Cys est un homodimère contenant 2 Cys par sous-unité et est considérée comme étant la PRX typique (Dietz et al. 2002). Cette protéine a une forte tendance à former un oligomère à dix unités et chez *Salmonella typhimurium*, il a été déterminé qu'elle oscille entre la forme dimérique et la forme décamerique selon le potentiel redox de la cellule (Wood et al. 2002). Une PRX 2-Cys oxydée change sa structure quaternaire et forme un oligomère (Konig et al. 2003). Des études d'immunolocalisation effectuées chez l'orge ont révélé que la forme oligomérique de la protéine se lie de façon réversible à la membrane du thylakoïde. La forme oligomérique de la PRX 2-Cys est aussi plus fortement présente en période de stress (Konig et al. 2002). Cette dernière pourrait ainsi agir en détecteur du potentiel redox de la cellule. La forme dimérique de la PRX 2-Cys est une structure compacte dont l'orientation parallèle des feuilletts β des deux sous-unités permet la formation d'un pont disulfure (Konig et al. 2003).

L'activité catalytique des protéines PRXs 2-Cys permet la réduction de H_2O_2 et d'alkyls hydroperoxydes complexes. La TRX d'*Escherichia coli*, les TRXs *f* et *m* chloroplastiques de même que la cyclophiline peuvent réduire la PRX 2-Cys oxydée (Konig et al. 2002). L'expression des *PRX 2-Cys* est entre autres régulée par la salinité, l'intensité lumineuse et la concentration en oxygène (Rouhier et al. 2004). La réduction d'expression

des gènes *PRX 2-Cys* chez *A. thaliana* dérègle le processus photosynthétique et accroît les dommages par oxydation causés aux protéines chloroplastiques de jeunes plantules (Horling et al. 2003).

1.4.6.3 La PRX Q

La PRX Q forme le troisième groupe de PRXs le plus récemment découvert et cloné chez les plantes. La PRX Q est un monomère homologue à une protéine associée à la bactérioferritine d'*E. coli* (Kong et al. 2000). On connaît la présence d'une seule isoforme *PRX Q* dans le génome d'*A. thaliana* et elle possède un peptide signal en N-terminale qui dirige la protéine dans le chloroplaste. Selon Lamkemeyer et son équipe (Lamkemeyer et al. 2006), la PRX Q d'*A. thaliana* serait rattachée à la membrane du thylakoïde alors que Peterson et Luckhart (Peterson and Luckhart 2006) rapportent plutôt que celle-ci se retrouve dans le lumen (Tripathi et al. 2009). Quoiqu'il en soit, la PRX Q réduit le H₂O₂ et les alkyls hydroperoxydes plus complexes qui se retrouvent dans le chloroplaste et est régénérée par la TRX y (Lamkemeyer et al. 2006; Collin et al. 2004). La PRX Q possède 2 Cys séparées entre elles par seulement 4 acides aminés (Rouhier et al. 2002).

La PRX Q est également associée à la défense contre les pathogènes. Il a été démontré que la transcription de *PRX Q* est augmentée chez *Populus trichocarpa* en réponse à une infection par le pathogène *Botrytis cinerea* (Rouhier et al. 2004). La Gt-PRX Q de *Gentiana triflora* a été isolée pour son activité antifongique. La surexpression de Gt-PRX Q dans les feuilles du tabac a permis chez cette plante transgénique une résistance accrue au paraquat et au pathogène *Botrytis cinerea*. L'expression de *PRX Q* est induite par un traitement au SA (Kiba et al. 2005). Le champignon *B. cinerea* est un pathogène virulent pouvant pénétrer dans la plante et les lésions observées sur les feuilles de la plante infectée par celui-ci sont probablement causées par la production de ROS induite par la présence de l'envahisseur. L'augmentation de l'expression de *PRX Q* sert donc probablement à la défense antioxydante pour limiter les dommages par oxydation causés par les ROS et ainsi

limiter la taille des lésions. Dans le cas d'une infection par un pathogène avirulent tel que *Phytophthora infestans*, l'expression de *PRX Q* n'a pas été caractérisée complètement chez *A. thaliana* (Dietz 2006;Kong et al. 2000).

1.4.6.4 Les PRXs de type II

Les PRXs de type II ont été identifiées pour la première fois chez la levure (Jeong et al. 1999) et chez *Brassica campestris* (Choi et al. 1999). Chez *A. thaliana*, l'existence de 6 gènes codants pour les PRXs II A, B, C, D, E et F est prédite (<http://signal.salk.edu>)(Dietz et al. 2006;Brehelin et al. 2003). Ces enzymes monomériques possèdent 2 Cys actives séparées par 24 acides aminés à l'exception de la PRX II D. Elles sont localisées dans différents compartiments cellulaires et sont en général exprimées dans tous les tissus végétaux (Dietz 2003). De plus, toutes les protéines de type II possèdent un site actif conservé portant la séquence PGAFTPTCSMSHVPD autour de la première Cys catalytique (Horling et al. 2001).

Chez *A. thaliana*, 5 des 6 gènes codant pour des PRXs de type II (B à F) sont exprimés alors qu'aucun EST n'est disponible pour l'instant pour le gène codant pour la PRX II A. Ce gène, At1g65990, comporte en C-terminal une très longue extension ayant une homologie avec des protéines sans fonction connue (Brehelin et al. 2003). Les PRXs II B à D correspondant respectivement aux gènes At1g65980 (UniProt Q9XEX2), At1g65970 (UniProt Q9SRZ4) et At1g60740 (UniProt O22711) sont transcrites et ne possèdent pas de peptide signal et sont donc normalement retrouvées dans le cytosol (Dietz et al. 2006). Le gène At1g65980 est annoté dans le génome d'*A. thaliana* avec deux transcrits. Le premier code pour la protéine ayant le numéro d'accèsion UniProt Q9XEX2 dont la longueur est de 162 acides aminés, alors que le deuxième code pour une protéine ne possédant pas les 41 derniers acides aminés, possiblement à cause d'un épissage alternatif. Une autre séquence PRX II dont la localisation est prédite dans le cytosol est présente dans la base de données UniProt (numéro d'accèsion Q8L9P7 identifiée, comme séquence possible). Aucun gène

n'est cependant associé à cette séquence qui possède de 8 à 13 substitutions en acides aminés par rapport aux autres séquences. Les séquences codantes de la PRX II B et de la PRX II C sont très similaires entre elles et ne diffèrent que par 5 acides aminés. La PRX II E est pour sa part localisée dans les chloroplastes et est exprimée principalement dans les tissus reproducteurs alors que la PRX II F se retrouve dans les mitochondries (Dietz 2003).

Lors d'essais enzymatiques *in vitro*, toutes les PRXs de type II ont démontré une forte activité peroxydase en utilisant le DTT comme donneur d'e pour leur régénération (Horling et al. 2003; Brehelin et al. 2003). Pour sa part, la PRX II cytosolique isolée chez le peuplier démontrait une efficacité de réduction du H₂O₂ et des hydroperoxydes d'alkyl et pouvait être régénérée par la TRX *h* ou la GRX (Rouhier et al. 2001).

1.4.6.5 Le cycle d'oxydo-réduction des PRXs

Le mécanisme réactionnel des PRXs est constitué d'une phase d'oxydation puis d'une phase de réduction dépendante d'une protéine thiol. Tout d'abord, le substrat oxydant réagit avec la Cys peroxydatique située dans la région N-terminale de la PRX. Le groupement thiol (-SH) de l'enzyme est alors oxydé en acide sulfénique (-SOH) alors que l'agent oxydant est réduit en molécules non réactives. Dans le cas de la PRX 1-Cys, l'acide sulfénique est réduit à l'état de thiol par un partenaire d'interaction encore inconnu. La régénération du groupement thiol permet à l'enzyme de réduire un nouveau substrat (Kang et al. 1998). À part les PRXs 1-Cys, toutes les autres formes de PRXs contiennent un second résidu Cys actif. Dans le cas d'une PRX 2-Cys typique, le second résidu Cys réagit avec l'acide sulfénique de la Cys peroxydatique. Un pont disulfure intermoléculaire est formé et une molécule d'eau est libérée, tel qu'illustré à la Figure 2 (p.24) (Dietz et al. 2006). La formation du pont disulfure est accompagnée d'un important changement structural (Konig et al. 2003). Dans le cas de la PRX Q et des PRXs de type II, l'interaction de la deuxième Cys active avec l'acide sulfénique de la Cys peroxydatique conduit à la formation d'un pont disulfure intramoléculaire. Le pont disulfure de toutes les PRXs à deux

Cys peut être réduit par l'action des protéines thiols TRX, GRX, cyclophiline ainsi que le GSH (Dietz et al. 2006).

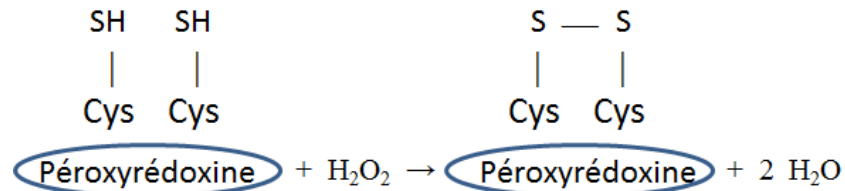


Figure 2 : Réduction d'un substrat oxydant par une PRX 2-Cys typique. Dans son état réduit, la PRX contient 2 résidus Cys à l'état de thiol (-SH). Le substrat oxydant, dans ce cas le H₂O₂, oxyde la Cys peroxydatique de l'enzyme en acide sulfénique (-SOH) qui réagit avec la deuxième Cys. Un pont disulfure (S-S) est alors formé avec libération de molécules d'eau.

1.4.6.6 La régulation des PRXs

L'expression des *PRXs* est régulée par le potentiel redox de la cellule qui détermine si la protéine sera majoritairement retrouvée en son état réduit (-SH) ou son état oxydé (S-S) (Konig et al. 2002). Des molécules intermédiaires peuvent également affecter l'état des *PRXs*. En effet, l'acide sulfinique (-SO₂H) formé par deux oxydations successives du groupement thiol peut être réduit en acide sulfénique (-SOH) par l'action de l'enzyme sulfirédoxine, présente chez la levure (Biteau et al. 2003) et chez l'homme (Chang et al. 2004), dans une réaction nécessitant l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Il existe chez *A. thaliana*, un homologue de l'enzyme sulfirédoxine (codé par le gène At1g31170). Certains auteurs ont par ailleurs énoncé que la surréduction de la PRX 2-Cys conduit à son inactivation (Konig et al. 2002) et que la nitrosylation de la PRX II E est irréversible (Dietz et al. 2006).

Des expérimentations *in vitro* suggèrent que les *PRXs* pourraient également être régulées par phosphorylation. Chez les mammifères, l'isoforme cytosolique PRXI peut être phosphorylée sur son résidu Thr⁹⁰ par des CDKs. La phosphorylation de PRXI inhibe son

activité peroxydase de 80% (Chang et al. 2002). Des travaux menés dans notre laboratoire ont par ailleurs démontré qu'une PRX cytosolique végétale peut être phosphorylée *in vitro* par la NDPK cytosolique (NDPK1) de *Solanum chacoense* (Dorion et Rivoal, en préparation). Les NDPKs sont des protéines multifonctionnelles présentes des procaryotes aux eucaryotes. La NDPK1 a précédemment été caractérisée au laboratoire. L'étude de son expression a révélé que cette protéine est présente de façon générale dans tous les tissus de la plante mais qu'elle est exprimée de façon plus importante dans les régions méristématiques et dans les cellules en croissance (Dorion et al. 2006). Par contre, l'expression de la NDPK1 en condition de stress n'a pas été étudiée pour le moment. Les NDPKs sont des enzymes multifonctionnelles et leur rôle le plus connu et le mieux caractérisé est le transfert du γ -phosphate d'un donneur nucléoside triphosphate (NTP) vers un receveur nucléoside diphosphate (NDP). Ce transfert se fait préférentiellement à partir de l'ATP dans les cellules vivantes et, de ce fait, les NDPKs jouent un rôle majeur dans l'homéostasie des NTP (Dorion et al. 2006). Les NDPKs ont été associées à d'autres fonctions dans différents systèmes (Roymans et al. 2002). Plusieurs de ces fonctions sont liées à la capacité des NDPKs de phosphoryler d'autres protéines (Freije et al. 1997). Des approches utilisant la caractérisation des résidus phospho-aminoacides et la mutagenèse dirigée ont permis de démontrer que la NDPK1 végétale était capable de s'autophosphoryler sur deux acides aminés (Dorion et al. 2006) : le premier est le résidu His catalytique également impliqué dans le transfert du γ -phosphate lors de la synthèse des NTP et le second est un résidu Ser strictement conservé à proximité du site actif. Ces données indiquent que la NDPK1 a une activité de protéine kinase et peut phosphoryler des résidus Ser. Des études subséquentes ont montré que la phosphorylation sur le résidu Ser se fait entre deux chaînes polypeptidiques distinctes (Dar and Chakraborti 2010). De plus, comme indiqué ci-dessus, des données encore non publiées de notre laboratoire ont démontré que la NDPK1 végétale est capable de phosphoryler d'autres protéines *in vitro* et certaines de ces cibles phosphorylées ont été identifiées par séquençage. On retrouve notamment une PRX cytosolique (séquence NH₂-APIAVGDVIPDGTVSYFD) et une

GAPDH cytosolique (séquence NH₂-LQRDDVELVAVNDP) (Dorion et Rivoal, en préparation).

1.5 Les ROS occupent des fonctions cellulaires essentielles par leur implication dans les mécanismes de défense et la signalisation cellulaire

Anciennement considérées comme étant des sous-produits indésirables du métabolisme aérobie, les ROS sont maintenant connues pour occuper des fonctions essentielles au sein de la cellule. En effet, il est maintenant bien établi que ces molécules oxydantes sont impliquées dans plusieurs processus essentiels à la vie de la cellule. Le premier de ces rôles est l'implication des ROS dans les mécanismes de défense contre les pathogènes (O'Brien et al. 2012). En effet, les végétaux, tout comme les autres organismes aérobies, sont capables d'augmenter rapidement et de façon importante les niveaux de ROS intracellulaires lors d'une attaque par un pathogène. Ce mécanisme de défense est connu sous le terme "*oxidative burst*" et permet de créer de façon locale un environnement hostile pour l'envahisseur (en revue dans (O'Brien et al. 2012). Dans ces conditions, la plante doit bien sûr mettre en place ses mécanismes de défense contre la toxicité de ses propres armes.

Un second rôle joué par les ROS est leur implication dans la régulation des stades de développement et de la croissance cellulaire de même que dans la réponse de défense de la plante face à un stress en agissant comme molécules de signalisation (Kotchoni and Gachomo 2006; O'Brien et al. 2012). Les ROS possèdent en effet plusieurs caractéristiques leur permettant d'agir en signal moléculaire et leur ubiquité cellulaire les amène à réagir à toutes les formes de stimuli ressentis par la plante (Pauly 2006). Chez les plantes, le mécanisme d'action des ROS dans la signalisation cellulaire est très complexe car il implique de nombreux niveaux hiérarchiques comme par exemple des interactions entre cellules, le transport du signal sur de longues distances et les relations croisées entre les

ROS et les phytohormones. De même, les enzymes et molécules antioxydantes affectent la fonction de signalisation des ROS en modulant le potentiel redox de la cellule ou en y répondant (Halliwell 2009).

L'efficacité d'une molécule signal dépend d'abord de la rapidité à laquelle elle est synthétisée et l'induction de son activité doit aussi être rapide pour provoquer la réponse cellulaire appropriée. Le signal moléculaire doit ensuite être dégradé promptement lorsque son rôle est accompli. Puisque la plupart des ROS sont synthétisées de façon enzymatique, leur formation rapide leur permet d'agir en molécule signal. Toutes les espèces réactives exercent également leur pouvoir oxydant promptement et sont aussi rapidement dégradées par les défenses antioxydantes (Pauly 2006). L'efficacité d'action des ROS dans les différentes voies de signalisation provient de leur habileté à moduler l'expression d'une large variété de gènes en agissant avec les groupements métalliques et les groupements thiols critiques pour l'activité catalytique des protéines ou qui sont situés sur des sites allostériques (Abbas et al. 2008). La fonction de signalisation des ROS peut donc être modulée selon 4 niveaux, soit I) par l'ajustement du rythme de leur production, II) par l'ajustement de leur détoxification, III) par le site subcellulaire de leur production et IV) en fonction de la présence d'un récepteur ou d'un détecteur du potentiel redox (Foyer and Noctor 2009). Voici donc ci-dessous quelques évidences obtenues de la littérature qui font état de la fonction de signalisation des ROS.

1.5.1 La croissance cellulaire

Les ROS sont impliquées dans la régulation de la croissance cellulaire. La formation de ces molécules oxydantes dans l'apoplaste servirait d'abord et avant tout à la régulation de l'agencement des composants de la paroi cellulaire (Slesak et al. 2007). Par exemple, la production de H₂O₂ dans le xylème formerait une réaction oxydante couplée nécessaire à la polymérisation de l'alcool cinnamylique dans ces vaisseaux vasculaires (Ros 1997).

La réaction de Fenton (voir Équation 4 p.11) est un processus non enzymatique qui se déroule dans l'apoplaste et qui cause la scission des polysaccharides de la paroi par la production de $\cdot\text{OH}$ lors d'expérimentations *in vitro*. En effet, cette espèce réactive peut dégrader localement les polysaccharides de la paroi cellulaire tels que la pectine et le xyloglucane pour ainsi permettre l'élongation de la cellule si celle-ci exerce une pression sur la membrane plasmique (Schweikert et al. 2000). Suite à ces observations, Fry (Fry 1998) a émis l'hypothèse que le $\cdot\text{OH}$ de l'apoplaste occuperait un rôle spécifique dans les processus d'extension cellulaire, d'ouverture des fruits et d'abscission des organes. Par ailleurs, le $\cdot\text{OH}$ apoplastique peut également être produit de façon enzymatique en présence d' O_2 par un cycle de réactions oxydantes complexes réalisées à l'aide d'une peroxydase et de NADH. Les expérimentations *in vitro* ont confirmé la scission des polysaccharides tels que le dextran, la pectine et le xyloglucane en présence de ces intervenants. De plus, l'implication du $\cdot\text{OH}$ dans la dégradation de ces polysaccharides a été démontrée par l'ajout de molécules antioxydantes dans l'essai, qui enravaient ce phénomène (Schweikert et al. 2000). D'autres expérimentations *in vitro* effectuées chez le maïs ont démontré que la croissance du coléoptile des semences en germination s'accompagne d'une production de ROS au site de la paroi cellulaire. L'utilisation de l'auxine induit la production du $\cdot\text{OH}$ à partir de l' O_2 lors de l'élongation racinaire. La génération *in vitro* du $\cdot\text{OH}$ induit une extensibilité de la paroi cellulaire dans un phénomène permettant le remplacement de l'auxine lors de la croissance. Cette élongation cellulaire peut être inhibée par l'ajout de molécules antioxydantes (Schopfer et al. 2002).

1.5.2 L'ouverture et la fermeture des stomates

La sécheresse est une condition environnementale fréquemment observée qui affecte la productivité photosynthétique des plantes. Une perte de turgescence dans les cellules végétales suite à un déficit hydrique conduit à la synthèse de l'hormone ABA. Cette hormone active une cascade de signalisation qui induit la production de H_2O_2 . Cette

molécule réactive provoque à son tour un influx d'ions Ca^{2+} dans les cellules de garde et une hyperpolarisation de la membrane cellulaire de ces cellules s'ensuit et provoque la fermeture des stomates. Des expérimentations *in vitro* illustrent que l'amplitude du potentiel électrique transmembranaire de ces cellules de garde est proportionnelle à la concentration intracellulaire en H_2O_2 . En accord avec cette observation, il a été déterminé que la concentration biologique normale en H_2O_2 dans le cytosol ($\sim 50 \mu\text{M}$) est suffisante pour induire un potentiel électrique permettant l'hyperpolarisation membranaire. Par ailleurs, l'utilisation du mutant *gca2* d'*A. thaliana* insensible à l'hormone ABA a démontré qu'une application exogène de H_2O_2 sur l'épiderme de ce mutant ne peut induire un influx d'ions Ca^{2+} dans les cellules de garde comparativement au type sauvage. Il a donc été conclu que l'activation des canaux Ca^{2+} par le H_2O_2 dépend de la présence d'ABA (Pei 2000).

1.5.3 La défense contre les pathogènes

Plusieurs stimuli environnementaux sont perçus à la surface de la cellule végétale par la membrane plasmique (Scandalios 2005). Lors de la reconnaissance d'un pathogène avirulent, les plantes produisent rapidement des ROS comme mécanisme de défense (O'Brien et al. 2012). Au site de la membrane plasmique, le $\text{O}_2^{\cdot -}$ est produit par la NADPH oxydase et l'amine oxydase et de plus, diverses peroxydases liées de façon covalente ou ionique à la paroi cellulaire contribuent à la production des ROS dans l'apoplaste (Mahalingam et al. 2003). L'accumulation de ces molécules oxydantes peut alors entraîner la réponse hypersensible, une forme de mort cellulaire programmée causant des lésions nécrotiques rapides au site d'infection (Mateo et al. 2004). La réponse hypersensible est une réaction de défense qui, en sacrifiant les cellules victimes de l'attaque du pathogène, restreint la propagation de ce dernier au reste de l'organisme (Huckelhoven et al. 2003; Slesak et al. 2007).

On a longtemps pensé que lors de la réponse hypersensible, la mort cellulaire était causée par l'action directe des molécules oxydantes. Toutefois, la concentration cellulaire des ROS conduisant à la mort de la cellule lors de cette réponse est souvent bien en-dessous de la concentration jugée mortelle. La réponse de la plante face aux pathogènes n'est effectivement pas toujours associée à une forte production de ces molécules oxydantes. La mort cellulaire pourrait plutôt être induite par le rôle de molécule signal des ROS (Mahalingam et al. 2003).

De plus, lors d'une interaction plante-pathogène, on assiste à la répression de l'activité des enzymes antioxydantes APX et CAT par l'action du SA et du NO[·] (Apel and Hirt 2004). Lors de la réponse hypersensible, le SA et le NO[·] lient le groupe prosthétique hème de ces peroxydases et inhibent leur activité (Mahalingam et al. 2003; Kotchoni and Gachomo 2006). Il est supposé que l'inhibition de la défense antioxydante permettrait la diffusion libre de molécules peu réactives comme le H₂O₂ ou le NO[·] en tant que molécule signal qui pourraient alors activer l'expression de gènes de défense (Neill et al. 2002). Dans la prochaine section, nous allons nous attarder sur la fonction de signalisation de la molécule H₂O₂.

1.6 Le H₂O₂ occupe un rôle prépondérant dans la signalisation cellulaire

L'implication des ROS dans la signalisation cellulaire est maintenant un phénomène reconnu (Hancock et al. 2006). Plus particulièrement, le H₂O₂ est indispensable à une large gamme de processus biologiques, spécifiquement lors de la régulation des réactions d'acclimatation, de défense et de développement (Slesak et al. 2007; Mateo et al. 2004). Un concept émergent donne un rôle prépondérant au H₂O₂ dans la signalisation cellulaire dans ces conditions. En effet, l'accumulation de cette molécule réactive dans la cellule permet d'activer de nombreuses voies de réponse incluant l'altération de l'expression génique (Mittler et al. 2004), l'induction de la fermeture des stomates (Pei et al. 2000) de même que

la réponse hypersensible (Mahalingam et al. 2003). Voici maintenant une description sommaire des caractéristiques physico-chimiques permettant à cette molécule d'occuper un rôle d'importance dans la signalisation et démontrant sa polyvalence dans une panoplie de processus cellulaires.

1.6.1 Le H₂O₂ est une molécule mobile

Le H₂O₂ est la forme de ROS la moins réactive et elle peut donc se retrouver à des concentrations non négligeables dans les cellules des organismes aérobies. Cette molécule est aussi relativement stable *in vivo* comparée aux autres ROS. Sa demi-vie de 1 ms lui permet de migrer entre les différents compartiments cellulaires et même entre cellules différentes alors qu'au contraire, le ¹O₂, le O₂⁻ et le ·OH ne sont pas des espèces réactives particulièrement mobiles (Gechev et al. 2006). De plus, la propension du H₂O₂ à diffuser à travers les membranes cellulaires lui permettraient d'activer de nombreuses voies de réponse et ce, à des sites éloignés de la production initiale des ROS (De et al. 2010).

Le déplacement du H₂O₂ dans les couches lipidiques des membranes semble être permis par la diffusion libre acquise par sa similitude chimique avec l'eau (Bienert et al. 2006). Les membranes jouent un rôle de protection de la cellule contre la toxicité et chez les plantes, la conductance des canaux hydriques par les aquaporines peut être modulée de façon post-transcriptionnelle en fonction de différents stimuli. Dans le même ordre d'idées, il a été démontré que divers systèmes membranaires peuvent effectivement être moins perméables aux molécules de H₂O₂. De façon générale, les membranes natives vont restreindre la diffusion libre du H₂O₂ en créant un gradient de concentration de part et d'autre de la membrane (Dynowski et al. 2008). Ceci laisse supposer la possibilité d'une régulation de la concentration en H₂O₂ dans les compartiments subcellulaires grâce à des modifications de la composition membranaire ou à la présence de canaux protéiques sélectifs. Ainsi, la membrane serait en mesure de moduler sa perméabilité au H₂O₂ en modifiant sa pression osmotique (Bienert et al. 2006). Il a cependant été démontré que le

H₂O₂ traverse aussi les membranes par des pores spécifiques appartenant à la famille des aquaporines, nommés les peroxyporines (Bienert et al. 2007). Ces pores spécifiques serviraient à ajuster les concentrations en H₂O₂ dans la cellule en modifiant la perméabilité des membranes à cette molécule réactive (Bienert et al. 2007). En situation de stress ou lors de processus de développement nécessitant des signaux moléculaires, le H₂O₂ des organelles pourrait alors fuir dans le cytosol et diffuser dans d'autres compartiments pour effectuer son rôle de signalisation (Gechev et al. 2006).

1.6.2 La signalisation par le H₂O₂ implique la modification de résidus Cys et Met

Le H₂O₂ affecte le potentiel redox de la cellule en agissant directement sur des systèmes comme le NAD(P)H/NAD(P)⁺, l'ascorbate/déhydroascorbate, le GSH et le GSSG, la thiorédoxine et la thiorédoxine oxydée, sans compter l'équilibre entre les résidus -SH et les ponts disulfures des protéines. L'état redox de la cellule influence l'environnement physiologique et la fonctionnalité d'une panoplie de protéines (Bienert et al. 2006).

Le H₂O₂ s'attaque principalement aux protéines présentant des groupements thiols et l'oxydation de ces derniers promeut la formation des ponts disulfures. De cette façon, l'oxydation d'un résidu spécifique peut par exemple activer la protéine ciblée en exposant son site actif ou encore l'inhiber en le bloquant. Dans plusieurs cas, l'oxydation des protéines par le H₂O₂ ne serait pas un phénomène arrivant au hasard. En conséquence, les modifications protéiques spécifiques exercées par cette molécule réactive permettraient la formation de signaux moléculaires (Cumming et al. 2004). En effet, plusieurs protéines thiols ciblées par le H₂O₂ sont impliquées dans des processus métaboliques de production et de conversion d'énergie. Une modification de la conformation d'un facteur de transcription peut aussi moduler l'expression d'un gène en réponse à une situation de stress particulière (Bienert et al. 2006). Les Cys sont les acides aminés également sensibles au potentiel redox

de la cellule par la formation réversible des acide sulfénique (-SOH) et sulfinique (-SO₂H) suite à une oxydation de ce résidu (Hardin et al. 2009). La façon dont le H₂O₂ est ressenti dans la cellule n'est pas encore complètement élucidée mais l'hypothèse la plus probable jusqu'à présent veut que la perception du signal se fasse via des modifications chimiques de groupements thiols sur des protéines. Dans ce contexte, il est important de noter la découverte récente de l'implication de modifications de la GAPDH cytosolique dans ce mécanisme pour contrôler la sensibilité des cellules stomatales à l'ABA (la GAPDH cytosolique est, avec la PRX cytosolique, l'une des cibles phosphorylées par la NDPK1, (Dorion et Rivoal en préparation). En effet, selon Guo et son équipe (Guo et al. 2012), le H₂O₂ intervient dans ce mécanisme en oxydant le groupement -SH du résidu Cys catalytique de la GAPDH cytosolique. Cet état oxydé inactive la GAPDH et lui permet d'interagir avec la phospholipase D δ membranaire et d'activer cette dernière. À son tour, l'acide phosphatidique produit par la phospholipase D δ faciliterait l'action de l'ABA pour induire la fermeture des stomates (Guo et al. 2012).

La Met présente aussi une grande sensibilité à l'oxydation par le H₂O₂ qui modifie la chaîne latérale Met [R-(CH₂)₂-S-CH₃] pour produire de façon réversible le composé MetSO [R-(CH₂)₂-SO⁻-CH₃]. De façon intéressante, l'oxydation en MetSO convertit la chaîne latérale hydrophobe de l'acide aminé en un résidu polaire hydrophile. Le changement réversible de la nature chimique de ce résidu fait de l'oxydation de la Met un potentiel de régulation intéressant (Vogt 1995). L'oxydation de la Met peut donc avoir un large impact sur la fonctionnalité de la protéine et sa capacité d'interaction avec les autres (Hardin et al. 2009). Par exemple, chez les animaux, l'oxydation de résidus Met spécifiques sur la calmoduline atténue sa liaison avec d'autres molécules et pourrait jouer un rôle d'inhibiteur du métabolisme énergétique lors de situations de stress (Bigelow and Squier 2005).

En réponse aux stress biotiques et abiotiques, les plantes induisent un arrangement complexe de voies de réponse conduisant à des cascades de phosphorylation des protéines et le H₂O₂ est également produit en ces conditions (Emes 2009). Hardin et ses collègues proposent un lien plausible entre la régulation de la phosphorylation et le H₂O₂. Les auteurs

proposent que l'oxydation de résidus Met à des sites clés des motifs canoniques définit les sites de phosphorylation de nombreuses protéines. Cette hypothèse provient du fait que chez les enzymes phosphorylées, les résidus hydrophobes Met de la séquence canonique au niveau de plusieurs sites de phosphorylation sont nécessaires à la reconnaissance d'éléments par les protéines kinases sérine/thréonine au motif (Hardin et al. 2009). L'oxydation de résidus Met par le H₂O₂ rend ce résidu hydrophile et polaire et cause un changement de conformation de la protéine empêchant la protéine kinase de se lier au motif (Hardin et al. 2009). Ceci a par exemple été démontré dans le cas de la phosphorylation régulatrice du résidu Ser⁵³⁴ de la nitrate réductase d'*A. thaliana* (Hardin et al. 2009). De plus, l'effet de H₂O₂ sur la phosphorylation de Ser⁵³⁴ *in vivo* était diminué par la surexpression d'une protéine méthionine sulfoxyde réductase (Hardin et al. 2009).

Quoiqu'il en soit, la cible la mieux caractérisée du H₂O₂ demeure jusqu'à présent le résidu Cys. À l'exception du facteur de transcription PerR contenant un groupe prosthétique, tous les mécanismes de régulation spécifique au H₂O₂ connus requièrent l'oxydation d'un unique résidu Cys (D'Autreaux and Toledano 2007). La Cys servirait principalement de mécanisme de régulation en exerçant un contrôle redox sur la liaison du zinc. Le zinc agit comme un acide de Lewis en abaissant le pK_a de son thiol correspondant et en modifie ainsi la réactivité (Ilbert et al. 2006). Réciproquement, l'oxydation de la Cys libère le zinc et la fonction protéique est modifiée par le changement de conformation engendré (D'Autreaux and Toledano 2007).

Enfin, le H₂O₂ semble également capable d'activer de nombreuses protéines kinase\phosphatase et il peut moduler la concentrations des ions Ca²⁺ intracellulaires (Bienert et al. 2006). En activant plusieurs MAPKs et en interagissant avec les phytohormones, le H₂O₂ permet à ces molécules d'exercer leur fonction de signalisation lors de la réponse face aux stress et durant la cytokinèse (Apel 2004). L'activation des MAPKs induit une cascade signalétique et elle peuvent phosphoryler une variété de substrats incluant certains facteurs de transcription (Jonak 2002).

1.6.3 L'expression des PRXs pourrait moduler la concentration en H₂O₂

De plus en plus d'évidences semblent démontrer que chez les eucaryotes, les PRXs contrôlent les niveaux de H₂O₂. De ce fait, elles pourraient jouer un rôle dans le contrôle des effets délétères de ce métabolite et également moduler son activité de signalisation. Les PRXs sont effectivement au croisement des voies de signalisation des ROS et du NO par leur capacité à réduire à la fois les hydroperoxydes et le peroxydite (Abbas et al. 2008). Dans l'optique où les PRXs sont des peroxydases de faible efficacité et sont hautement susceptibles à une inactivation par le H₂O₂, il est supposé que cette famille d'antioxydants n'occuperait pas une unique fonction de peroxydase. Il est proposé, du moins dans le cas de la PRX 2-Cys, que l'enzyme active agirait pour la détoxification des hydroperoxydes lors des conditions métaboliques normales. Par contre, en conditions de stress, l'accumulation de ROS conduit à une inactivation de la PRX suite à son oxydation et l'enzyme inactive servirait alors en messager moléculaire pouvant induire l'expression de gènes reliés à la réponse de défense (Kitajima 2008). Dans un article paru en 2003, Wood et ses collègues propose que les PRXs 2-Cys agissent en interrupteur pour déterminer si le H₂O₂ est un oxydant délétère ou un messager utile (Wood et al. 2003).

1.7 Objectifs de la recherche présentée dans ce mémoire

L'objectif général de mon travail de maîtrise était de caractériser la PRX dont la phosphorylation *in vitro* par la NDPK1 avait été détectée au laboratoire tel que mentionné ci-dessus (section 1.4.6.6). L'un des axes de recherche de notre laboratoire s'intéresse à la caractérisation de la NDPK1 (Dorion et al. 2006; Dorion et al. 2006). Jusqu'à présent chez les plantes, les PRXs localisées dans les organelles ont été bien caractérisées. Par contre, le rôle des PRXs cytosoliques reste encore largement à définir. Il était important de mieux comprendre cette protéine afin de pouvoir, dans un deuxième temps, entreprendre l'étude de sa possible régulation par phosphorylation. En effet, lors de l'amorce de ce travail, très

peu de données étaient disponibles dans la littérature concernant les conditions auxquelles les PRXs cytosoliques sont exprimées chez les végétaux et sur leur(s) rôle(s) possible(s) dans la physiologie de la plante. Dans ce contexte, mon projet maîtrise avait donc les objectifs généraux suivants :

- Identifier et cloner la PRX phosphorylée par la NDPK1 à partir des données de la séquence N-terminale de cette protéine. Pour cet aspect de la recherche, nous avons pris avantage du fait que des bibliothèques d'ADNc de *Solanum chacoense* ont été mises à notre disposition par le Dr Matton (IRBV).
- Exprimer la protéine clonée sous forme recombinante dans *Escherichia coli* de façon à mettre en évidence son activité enzymatique et à générer un anticorps polyclonal.
- Utiliser ces anticorps anti-PRX et des anticorps anti-NDPK1 précédemment générés au laboratoire pour déterminer les tissus et les conditions dans lesquelles la PRX et la NDPK1 sont co-exprimées chez les végétaux. Lors de cette étude, une emphase particulière sera mise sur les situations de stress.

Étant donné l'importance des PRXs dans la métabolisation du H_2O_2 , nous émettons l'hypothèse de départ que l'isoforme cytosolique de PRX étudiée ici pourrait servir à métaboliser cette molécule. La PRX pourrait donc hypothétiquement agir à deux niveaux dans le métabolisme du H_2O_2 . Une première possibilité est qu'elle serve de détecteur du potentiel redox de la cellule en réagissant face à la concentration en H_2O_2 et en régulant la fonction signal de ce dernier, par exemple dans une situation de stress. Une autre possibilité est que la PRX soit impliquée dans la détoxification du H_2O_2 pour éviter que des concentrations trop élevées de cette molécule ne s'accumulent dans la cellule végétale. Cette éventualité pourrait aussi advenir en condition de stress. Pour sa part, la PRX cytosolique pourrait être régulée, entre autres, par la NDPK1 cytosolique. Nous avons donc observé

l'expression de l'isoforme cytosolique PRX en réponse à différentes situations de stress impliquant la formation de H_2O_2 et avons démontré une surexpression de l'isoforme en réponse à la salinité, en présence de H_2O_2 exogène et suite à une infection par le nématode *Meloidogyne hapla*. En parallèle, nous avons également observé le patron d'expression de la NDPK1 pour établir une corrélation d'expression entre la PRX1 et la NDPK1. Ces études ont été réalisées avec des plantes de la famille des solanacées (tout comme *S. chacoense*, que nous avons utilisée pour le clonage) et en utilisant différents systèmes expérimentaux. Nous avons notamment travaillé avec des cultures cellulaires de *Solanum tuberosum* (pomme de terre). Ce système permet une manipulation très contrôlée des conditions environnementales et permet donc facilement l'application de divers stress de nature chimique, physique ou biologique. Nous avons aussi travaillé avec des plantes de *S. lycopersicum* (tomate) cultivées en conditions contrôlées. Ce système a permis d'étudier l'expression spatio-temporelle de la PRX au niveau de la plante entière et a permis de réaliser des études avec un agent pathogène des racines, le nématode *M. hapla*.

Matériels et méthodes

2.1 Produits chimiques, matériel biologique et origine du matériel végétal

Sauf lorsque cela est mentionné différemment, les produits chimiques et les réactifs utilisés dans les expériences décrites ci-dessous étaient de qualité analytique et provenaient de chez Sigma Chemical Co. (St Louis, MO), Fisher Scientific (Nepean, ON, Canada) ou Invitrogen Canada Inc. (Burlington, ON, Canada). L'ADN polymérase Phusion a été obtenue chez New England BioLabs (Pickering, ON, Canada), les enzymes de restriction provenaient de MBI Fermentas (Burlington, ON, Canada) et les amorces utilisées pour l'amplification par PCR et le séquençage, de Sigma Genosys (The Woodlands, TX). Les semences de *S. lycopersicum* (cv Roma) ont été obtenues chez Stokes (Thorold, ON, Canada). La culture de cellules hétérotrophes de pommes de terre est issue d'un tubercule et a été gracieusement offerte par le Dr. R. D. Law (Lakehead University).

2.2 Clonage et séquençage d'un ADNc codant pour une peroxyrédoxine

Le clonage et toutes les expériences de biologie moléculaire ont été réalisés en suivant les protocoles établis (Sambrook and Russell 2001). La recherche d'un ADNc complet pour une peroxyrédoxine a été effectuée dans la banque EST de *S. chacoense* construite à partir d'ovaires fécondés dépericarpés âgés de 2 à 6 jours. Le numéro d'accèsion Genbank de ce clone de PRX est DN982695 (Dr. D. P. Matton, Université de

Montréal). Pour cette recherche, nous avons utilisé la séquence NH₂-APIAVGDVIPDGTVSFYFD qui avait été identifiée comme étant la séquence N-terminale de la protéine phosphorylée *in vitro* par la NDPK1 recombinante. Un clone d'ADNc complet et codant pour une protéine présentant une très forte homologie de séquence avec la séquence NH₂-APIAVGDVIPDGTVSFYFD a pu être identifié. Cet ADNc a été nommé ScPRX1 (Figure 3 (A, B), p.40) et était clonée dans le vecteur pBlueScript II SK + (pBSII) entre les sites *EcoRI* et *XhoI* (Figure 3 (C), p.40). La séquence a été déterminée complètement sur les deux brins par l'utilisation du kit de séquençage Big Dye Terminator 2.0 (Perkin Elmer, Montréal, Qc, Canada) et le séquenceur automatique ABI 310.

2.3 Expression de la protéine recombinante PRX1 dans les bactéries

L'ADNc ScPRX1 décrit ci-dessus a été amplifié sur le brin sens avec l'amorce Perox-F3 5'-ATGGCTCGGATCGCCGT-3' débutant avec le cadre de lecture de la protéine et sur le brin antisens avec l'amorce T7-22 5'-CGACTCACTATAGGGCGAATT-3' contenue dans le vecteur. Le fragment de 741 paires de bases obtenu a été digéré avec l'enzyme de restriction *XhoI* (coupure en position 669, Figure 3 (C), p.40). Le fragment résultant de 695 paires de bases et portant la séquence codante entière de ScPRX1 a ensuite été cloné dans le vecteur pProEx HTb préalablement digéré avec *EheI* et *XhoI* (Figure 4, p.41). Le produit de ligation du plasmide et de l'insert a ensuite été utilisé pour transformer des bactéries compétentes *E. coli* DH5 α . La construction a été vérifiée par séquençage. Le plasmide d'expression contenait la séquence codante complète de ScPRX1 dans le même cadre de lecture qu'une étiquette (6 \times His) en N-terminale.

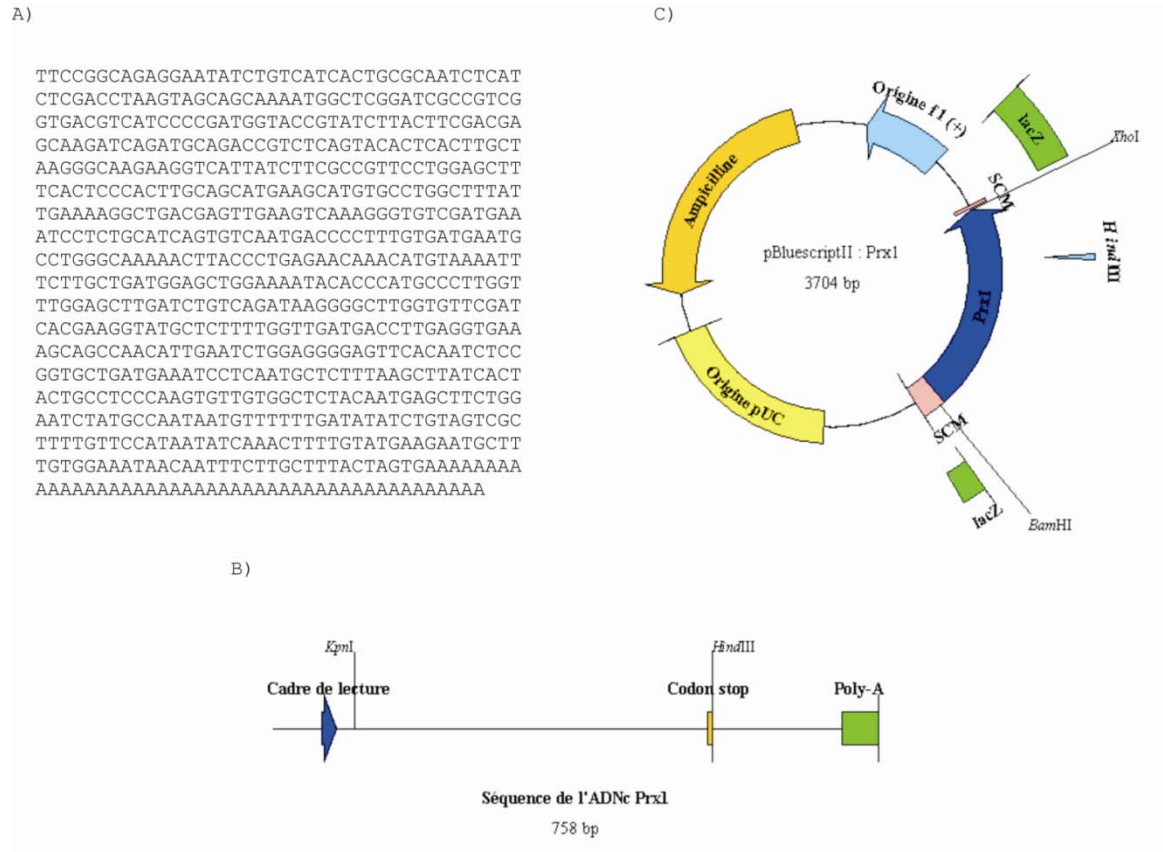


Figure 3 : Clonage de l'ADN ScPRX1. (A, B) Séquence d'un ADNc complet codant pour une peroxyrédoxine de *S. chacoense*. L'ADNc ScPRX1 a été obtenu à partir d'ovaires dépericarpés âgés de 2 à 6 jours issus de la banque EST du laboratoire du Dr. D. P. Matton. (C) Construction de la séquence ScPRX1 inséré dans le vecteur pBlueScript II SK + entre les sites de restriction *EcoRI* et *XhoI* du site de clonage multiple.

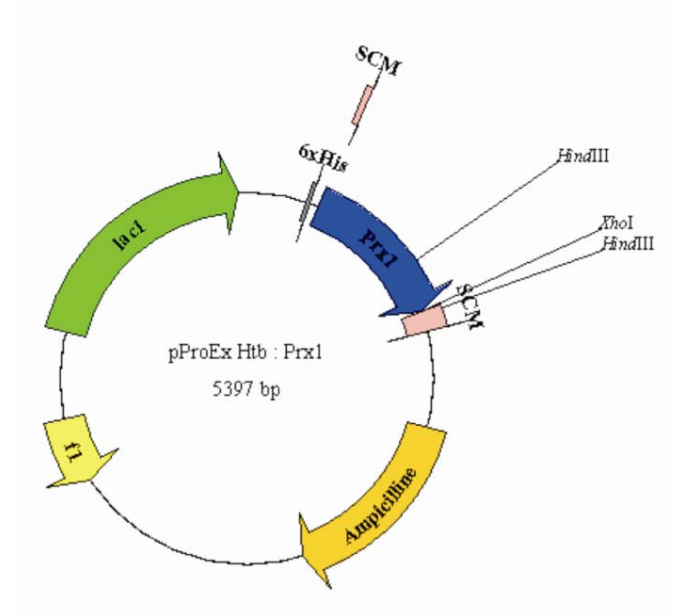


Figure 4 : Clonage de ScPRX1 dans le vecteur d'expression bactérienne pProEx HTb. La séquence ScPRX1 contenue dans le vecteur pBSII SK+ a été amplifiée par PCR en utilisant les amorces Perox-F3 et T7-22. Le fragment de 741 pb a ensuite été digéré avec l'enzyme de restriction *XhoI* pour générer une extrémité collante. Un clonage unidirectionnel de la ScPRX1 de 695 pb a été réalisé suite à la digestion du vecteur pProEx HTb par les enzymes de restriction *EheI* (extrémité franche) et *XhoI*. Le vecteur pProEx HTb utilisé pour l'expression de la protéine recombinante dans les bactéries contient une étiquette 6×His en N-terminale à la position 279 pb.

2.4 Induction et purification de la protéine recombinante

La bactérie *E. coli* contenant la construction codant pour (6×His)ScPRX1 a été inoculée dans un bouillon Luria-Bertoni (volume total de 500 ml) à 37°C jusqu'à une densité optique de 0,5 à 600 nm. De l'IPTG a été ajouté à la concentration finale de 0,6 mM et les bactéries ont poussé durant 4 h additionnelles. Les cellules ont été récupérées par centrifugation (10 min. 5000 × g) et le culot a été conservé à -80°C jusqu'à son utilisation. La purification de la (6×His)ScPRX1 a été réalisée en conditions natives à température

ambiante sur une colonne contenant 1 ml de résine Ni-NTA selon les instructions du fabricant (Invitrogen Canada Inc, Burlington, ON, Canada). Les fractions purifiées ont été regroupées et dialysées dans un tampon contenant 25 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM de $MgCl_2$ et 1 mM de DTT, puis utilisées pour la fabrication d'un anticorps contre la PRX1. La (6×His)ScPRX1 dialysée a été conservée à $-20^{\circ}C$ en 50% (v/v) de glycérol jusqu'à son utilisation.

2.5 Traitements du matériel végétal pour les études d'expression et les stress

Pour ces études, tout le matériel végétal a été récolté, pesé et congelé à l'azote liquide puis conservé à $-80^{\circ}C$ jusqu'à son utilisation.

2.5.1 Études d'expression au cours du développement

Les plants de tomate ont été cultivés dans un terreau (Pro-Mix-BX, Tourbières Premier, Rivière-du-Loup, Qc, Canada):loam:perlite (2:2:1, v/v/v) en chambre de croissance (12 h jour/12 h nuit, $22^{\circ}C$, 200-300 μmol PAR quanta m^2s^{-1}). Un fertilisant chimique (NPK 20-20-20) a été appliqué de façon hebdomadaire selon la concentration de 1 g/L. Les différents tissus aériens ont été récoltés à intervalles réguliers au cours du développement des plants. Pour la récolte des racines de plantules de tomates, les semences ont préalablement été stérilisées dans une solution 10 % (v/v) de javellisant commercial puis rincées à l'eau stérile avant de germer pendant 3 jours à la noirceur à $27^{\circ}C$ sur un papier

filtre humide. Par la suite, les apex et les segments racinaires ont été excisés à une longueur de 5 mm chacun.

2.5.2 Études d'expression suite à un stress

Pour les expériences réalisées sur des racines, ces dernières ont été prélevées soit sur des plantes maintenues en chambre de croissance, soit sur des plantules germées âgées de 3 jours en conditions stériles. Concernant les expériences réalisées sur des cellules non photosynthétiques, celles-ci ont été maintenues sur un agitateur giratoire (140 rpm) à 22°C dans un milieu Murashige-Skoog (Murashige and Skoog, 1962) contenant 30 g/L de sucrose et 1 mg/L de 2,4-D. La culture cellulaire a été sous-cultivée aux 14 jours en transférant 10 ml de cellules dans 60 ml de milieu MS frais. Les traitements de stress ont été effectués sur des cultures cellulaires âgées de 7 jours, ce qui correspond au début de la phase exponentielle de croissance (Dorion et al. 2006). Les cellules ont été stressées selon les conditions de culture décrites ci-dessus avant d'être récoltées par filtration. Toutes les expériences présentées dans le mémoire ont été réalisées sur au moins trois réplicas biologiques. Les analyses par buvardage de western (immunoblot) présentées dans le mémoire sont des résultats représentatifs de ces expériences.

2.5.2.1 Stress imposés par des agents oxydants

Lors des stress par oxydation réalisés sur des cultures cellulaires, les cellules ont été traitées avec différentes concentrations de H₂O₂ et de tBOOH pour des durées allant jusqu'à 36 h. Chaque traitement a été réalisé dans des erlenmeyers contenant 70 ml de

culture cellulaire. Dans le cas du traitement au H₂O₂, les cellules traitées ont reçu des concentrations de 25 mM, 50 mM et 100 mM alors que les cellules contrôles ont reçu de l'eau stérile selon un volume équivalent (Sweetlove et al. 2002). Pour le traitement au tBOOH, des concentrations de 0,1 mM et 0,5 mM ont été utilisées et les cellules contrôles ont reçu du décane qui sert de solvant au tBOOH (Luhua et al. 2008).

2.5.2.2 Stress de température

Un stress de température a été imposé aux cultures cellulaires en incubant des erlenmeyers de 250 ml contenant 70 ml de suspension cellulaire à 4°C ou à 35°C selon une échelle de temps allant jusqu'à 24 h. Les cultures cellulaires témoins ont été maintenues à température ambiante ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) pour les mêmes durées.

2.5.2.3 Stress hypoxique

Des cultures cellulaires de 70 ml ont subi un stress hypoxique de 16 h en restreignant l'accès à l'oxygène en maintenant les cellules sans agitation. Les cultures cellulaires servant de contrôles ont été maintenues en normoxie en conservant une agitation constante de 140 rpm.

2.5.2.4 Stress salin

L'effet de la salinité a été étudié en traitant des cultures cellulaires de 70 ml avec des concentrations de 0, 50, 100 et 200 mM de NaCl pour une durée de 18 h.

2.5.2.5 Traitements avec des bactéries pathogènes

Des cultures cellulaires ont subi une infection aux agrobactéries. Pour ce faire, 5 ml de milieu MYA (Petit and Fryns 1983) et 5 ml de milieu YEP (Kassir and Simchen 1976) contenant 200 mg/L de streptomycine ont été respectivement inoculés avec *Agrobacterium rhizogenes* (souche A4) et *A. tumefaciens* (souche LBA4404) pour produire des précultures. Les bactéries ont poussé dans ces milieux pendant 3 jours à 28°C avec une agitation de 250 rpm. La préculture d'*A. rhizogenes* a ensuite servi à inoculer 50 ml de MYA et la préculture d'*A. tumefaciens* a été transférée dans le bouillon d'induction décrit par cet auteur (Ditt et al. 2001). Après 16 h de croissance dans ces conditions, les deux cultures bactériennes ont été centrifugées et resuspendues dans du milieu MS à une $DO_{600} = 1.0$. Des cultures cellulaires ont alors été inoculées avec 600 μ L d'*A. tumefaciens* et 100 μ M d'acétosyringone ou 600 μ L d'*A. rhizogenes*. Les cultures cellulaires servant de contrôle pour *A. tumefaciens* ont reçu de l'acétosyringone (100 μ M) et 600 μ L de MS alors que les cellules contrôles d'*A. rhizogenes* ont reçu 600 μ L de MS. Ces traitements ont duré 6 et 24 h.

Pour le traitement avec *Pseudomonas syringa* pv. *Tomato DC3000*, la bactérie a poussé dans 3 ml de milieu King's B (Unknown 2009) contenant 50 μ g/ml de rifampicine pendant 4 h à 28°C avec agitation de 250 rpm. L'inoculum a ensuite été transféré dans 50 ml de milieu King's B pour une croissance supplémentaire de 16 h. Les bactéries ont alors

été centrifugées et resuspendues dans de l'eau stérile pour l'obtention d'une $DO_{600} = 1.0$. Cette suspension a servi pour le traitement. Des cultures cellulaires de pommes de terre ont été inoculées avec 280 μL , 1400 μL ou 2800 μL de suspension bactérienne. Un volume équivalent en eau stérile a été ajouté aux cellules témoins et les traitements ont été effectués durant 24 h.

2.5.2.6 Traitements avec le nématode *Meloidogyne hapla*

Un terreau infesté de nématodes *Meloidogyne hapla* a été obtenu auprès de M. G. Bélair de la station Agriculture et Agroalimentaire Canada (AAC) de St-Jean sur Richelieu. Le terreau provenait d'une parcelle expérimentale de AAC située à Ste-Clothilde (Qc, Canada). Des plants de *S. lycopersicum* ont été cultivés en chambre de croissance dans ce terreau. Les plants servant de témoins ont poussé dans le même terreau qui avait été préalablement autoclavé. Après 6 semaines de croissance, les racines ont été lavées à l'eau distillée pour en retirer la terre. Les nodules formés par les nématodes sur les racines de tomate infectées ont été excisés puis récoltés pour une analyse subséquente. Pour certaines expériences, nous avons également récolté les masses d'œufs de nématodes contenues dans les nodules. Pour cela, nous avons disséqué les nodules à l'aide d'un scalpel sous une loupe binoculaire (objectif 16 x) pour séparer le tissu animal (les œufs) du tissu végétal (la racine). Lors de ces expériences, des fragments de racines saines ont également été récoltés sur les plants contrôles afin de servir de témoin.

2.6 Extraction, dosage et analyse des protéines par SDS-PAGE

Toutes les extractions de protéines ont été réalisées le plus rapidement possible et à 4°C de façon à limiter la possibilité de protéolyse. Tous les tissus végétaux, à l'exception des cultures cellulaires, ont été broyés dans un mortier à l'aide d'un pilon ou dans un tube eppendorf avec un micropilon. Les protéines ont été extraites dans un tampon d'extraction Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,1% (v/v), glycérol 10% (v/v), PVPP 5% (p/v), DTT 5 mM et PMSF 1 mM) avec un ratio de 2 ml de tampon/g de poids frais. Les protéines des cellules de pomme de terre ont été extraites au polytron (Brinkmann Instruments, Mississauga, ON, Canada) (3 x 10 sec. à vitesse intermédiaire) dans le tampon d'extraction décrit ci-dessus avec le même ratio mL tampon/g tissu. Les extraits protéiques homogénéisés ont ensuite été centrifugés 15 min à 15000 x g. Pour l'analyse par SDS-PAGE subséquente, une partie aliquote du surnageant de chaque extrait a été immédiatement dénaturée pendant 5 min à 95°C dans un tampon composé de glycérol 32% (v/v), Tris-HCl pH 6.8 0,2 M, SDS 8% (p/v), bleu de bromophénol 0.0032% (p/v) et DTT 0.1 M. Le reste du surnageant a été utilisé pour la quantification des protéines par la méthode de Bradford (Bradford 1976) avec le «protein assay reagent» de Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada) et une courbe étalon établie à partir de l'albumine de sérum bovin. Les extraits protéiques dénaturés ont été séparés selon leurs poids moléculaires par électrophorèse en faisant migrer 12 µg de protéines selon la méthode décrite (Laemmli 1970). Les concentrations finales de monomère d'acrylamide étaient de 15% (p/v) pour le gel de séparation et de 4.8% (p/v) pour le gel d'empilement. La migration des protéines s'est déroulée pendant 90 min à 100 V à température ambiante. Les poids moléculaires ont été estimés à l'aide d'une échelle standard (Bio-Rad) : phosphorylase b (97.4 kDa), BSA (66.2 kDa), ovalbumine (45 kDa), anhydrase carbonique (31 kDa), inhibiteur de trypsine (21.5 kDa) et lysozyme (14.4 kDa).

2.7 Mesure de l'activité enzymatique de la peroxyrédoxine

La réduction du H_2O_2 par la peroxyrédoxine a été mesurée en suivant l'oxydation de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ par le H_2O_2 en présence de xylénol orange et de triphénylphosphine (réactif FOX2) en utilisant une méthode colorimétrique (Sodergren et al. 1998). Pour la réalisation de ces essais enzymatiques, 500 μl de peroxyrédoxine purifiée comme indiqué ci-dessus a été préalablement réduite en présence de 1 mM DTT pendant 24 h. L'enzyme a ensuite été dialysée pendant 2 h contre 2 l de tampon 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM de MgCl_2 de façon à éliminer le DTT résiduel. L'enzyme dialysée (2.64 μg protéines) a été incubée à 30°C en présence de 200 μM H_2O_2 et pour des durées allant de 0 à 30 min dans un tampon 100 mM Hepes-KOH (pH7,5) et dans un volume total de 250 μl . La réaction a été arrêtée par dénaturation thermique de l'enzyme (5 min à 95°C). Les tubes ont été refroidis sur la glace pendant 2 min puis centrifugés 1 min à 13000 x g. Un aliquot de 100 μl a été prélevé à chaque réaction pour être ensuite mélangé avec 900 μl de réactif FOX2. Après 30 min d'incubation, la quantité de H_2O_2 résiduelle a été déterminée sur un aliquot de 250 μl de cette solution par lecture de l'absorbance à 560 nm et en utilisant une courbe étalon de 0 à 100 nmol en H_2O_2 réalisée simultanément.

2.8 Production d'un sérum polyclonal anti-PRX

La protéine (6×His)ScPRX1 a été purifiée par affinité comme décrit ci-dessus. La protéine purifiée a été soumise à une SDS-PAGE préparatoire. Suite à l'électrophorèse, les polypeptides ont été colorés au bleu de Coomassie durant 5 min puis décolorés 15 min. La bande correspondant à (6×His)ScPRX1 a été excisée puis électroéluée du gel avec l'appareil d'électroélution de Bio-Rad selon les informations du fabricant. La solution contenant la protéine éluée (environ 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a été conservée à -20°C jusqu'à la

production de l'antisérum. Des anticorps polyclonaux ont été générés chez un lapin New-Zealand de 2 kg. Suite à la prise du sérum pré-immun, la (6×His)ScPRX1 (100 µg émulsifiée dans de l'adjuvant de Freund) a été introduite dans le dos du lapin par des injections sous-cutanées. Des injections supplémentaires de rappel ont été effectuées aux jours 14, 21 et 35 à raison de 50 µg de (6×His)ScPRX1 émulsifiée dans de l'adjuvant de Freund. Quinze jours suivant la dernière injection, le sang a été récupéré par ponction cardiaque. Suite à une centrifugation à $1500 \times g$, le sérum a été séparé en parties aliquotes congelées à l'azote liquide puis conservées à -80°C .

2.9 Analyse des protéines par transfert Western et immunodétection

Après séparation par SDS-PAGE, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant 60 min sous un voltage constant de 70 V dans un tampon de transfert constitué de glycine 0.192M, Tris-base 0.025M et méthanol 20% (v/v). Le transfert des protéines a été vérifié visuellement par une coloration de la membrane au rouge Ponceau. Cette coloration permet également de visualiser sur la membrane la position des marqueurs de poids moléculaires. Après avoir tracé l'emplacement des marqueurs avec un crayon à mine, la membrane est décolorée par des bains successifs dans l'eau. Pour l'analyse par immunodétection, les membranes ont été incubées 1 h à température ambiante avec le sérum anti-PRX1 (dilution $1/2500$) ou avec l'anticorps anti-NDPK1 qui reconnaît spécifiquement la NDPK cytosolique (Dorion et al. 2006). Une bande mineure est quelquefois visible en dessous de la bande NDPK1 de 16.2 kDa. Ceci est attribué à une dégradation protéolytique limitée de la NDPK1 lors de l'extraction. Les complexes antigène/anticorps primaires ont été détectés par l'utilisation d'IgGs de chèvre anti-IgG de lapin couplés à la phosphatase alcaline (dilution $1/10000$) (Promega, Nepean, ON,

Canada). La réaction de la phosphatase a été visualisée avec du BCIP et du NBT et les temps de développement de la coloration variaient de 5 à 30 minutes selon les expériences.

2.10 Étude des ARN par hybridation Northern

Les ARN totaux des tissus végétaux ont été extraits au réactif TRIzol[®] (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. La pureté et le dosage des ARN obtenus ont été déterminés par spectrométrie à 260 nm et 280 nm. Pour vérifier la qualité des ARN et valider la quantification, 300 ng d'ARN ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% à raison de 5V/cm pendant 45 minutes. Les ARN ont ensuite été visualisés aux UV par la présence de bromure d'éthidium. Pour chaque échantillon, 10 µg d'ARN totaux ont été séparés sur gel de formaldéhyde/MOPS. Les ARN ont ensuite été transférés sur membrane Hybond N⁺ (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Qc, Canada) et fixés aux UV avec l'appareil Hoefer (120 mJ cm⁻²).

Pour l'analyse des ARN extraits, une sonde a été préparée dans la région 3' UTR de la séquence ScPRX1. Une analyse comparative de séquences a révélé que cette région permettrait une meilleure discrimination des isoformes de PRXs et réduirait les appariements de la sonde avec les autres isoformes. L'ADN plasmidique de la PRX1 dans le vecteur pBSII a donc été digéré aux sites de restriction *HindIII* et *XhoI* (positions 877 et 669, Figure 3 (C), p.40). Pour confirmer la quantité d'ARN qui ont été chargés dans le gel, un fragment d'ARN 18S de 1 kb a été utilisé pour la fabrication d'une sonde contrôle. Les sondes ont été synthétisées avec le DecaLabel[™] DNA Labelling kit (Fermentas, Burlington, ON) en présence de 50 µCi de [α -³²P]-dATP.

La préhybridation des membranes a été effectuée durant 2 h à 68°C dans une solution de phosphate de sodium de 0,5 M, de SDS 7% (P/v) et de EDTA 1 mM. Les sondes d'ADN de la PRX ont ensuite été dénaturées 5 min à 100°C puis l'hybridation des membranes avec les sondes a été accomplie durant 16 h à 68°C dans la solution précédente.

Suite à l'hybridation, les membranes ont été lavées dans une solution de SSC 1× et 0,1% de SDS pendant 10 min à température ambiante. Trois étapes de lavage dans une solution de SSC 0,5× et de SDS 0,1% à 68°C et durant 10 min ont ensuite été effectuées. Les membranes hybridées ont ensuite été exposées à température ambiante à un écran de Phosphorimager (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Qc, Canada) durant une nuit et les images des membranes ont été visualisées au Phosphorimager Typhoon 9200 (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Qc, Canada). Les sondes PRX ont alors été déshybridées des membranes par lavage dans une solution de Tris-HCl 10 mM (pH 7.4) et de SDS 0,2% préchauffé à 75°C durant 2 h. Les membranes ont ensuite été trempées dans la solution de préhybridation, puis hybridées avec la sonde 18S selon les conditions précédentes pour valider l'homogénéité des quantités d'ARN se retrouvant sur les membranes. L'exposition des membranes hybridées avec la sonde 18S a été réalisée durant 1 h.

Résultats

3.1 Clonage, analyse et identification de la séquence de la PRX1

La recherche de séquences homologues à la séquence protéique NH₂-APIAVGDVIPDGTVSYFD appartenant à la protéine phosphorylée in vitro par NDPK1 a mené à l'identification d'un ADNc PRX1 de *S. chacoense*. Ce clone a été nommé ScPRX1. Après séquençage, la traduction conceptuelle a permis d'identifier une séquence codante de 162 acide aminés (Figure 5, p.52) générant une protéine ayant un poids moléculaire de 17500 Da et un point isoélectrique de 5.17.

```
atggctcggatcgccgctcgggtgacgtcatccccgatggtaccgtatcttacttcgacgag
M A R I A V G D V I P D G T V S Y F D E
caagatcagatgcagaccgtctcagtacactcacttgctaagggcaagaaggtcattatc
Q D Q M Q T V S V H S L A K G K K V I I
ttcgccgttcttgagctttcactcccacttgacagcatgaagcatgtgcttgctttatt
F A V P G A F T P T C S M K H V P G F I
gaaaaggctgacgagttgaagtcaaaggggtgctgatgaaatcctctgcatcagtgcaat
E K A D E L K S K G V D E I L C I S V N
gaccctttgtgatgaatgcctggggcaaaaacttaccctgagaacaacatgtaaaattt
D P F V M N A W A K T Y P E N K H V K F
cttgctgatggagctggaaaatacacccatgcccttggttggagcttgatctgtcagat
L A D G A G K Y T H A L G L E L D L S D
aaggggcttggtgttcgatcacgaaggatgctcttttggttgatgaccttgagggtgaaa
K G L G V R S R R Y A L L V D D L E V K
gcagccaacattgaatctggaggggagttcacaatctccggtgctgatgaaatcctcaat
A A N I E S G G E F T I S G A D E I L N
gctctt
A L
```

Figure 5 : Séquences nucléotidique et protéique de la protéine codée par ScPRX1. La protéine ScPRX1 prédite est d'une longueur de 162 acides aminés et code un polypeptide de 17,5 kDa selon l'outil ProtParam de la base de données Expasy Proteomics Server (www.expasy.org).

Nous avons ensuite utilisé l'outil BLASTP (Altschul et al. 1997) disponible sur la base données ExPasy Proteomics Server pour évaluer le degré de similarité de ScPRX1 avec d'autres séquences protéiques. Dans un premier temps, la séquence ScPRX1 a été alignée avec la séquence peptidique obtenue par séquençage de la protéine phosphorylée par NDPK1. Nous avons ainsi pu déterminer une identité de séquences de 94% entre la séquence de ScPRX1 (positions 2 à 18) et celle de la protéine phosphorylée par NDPK1. Seul le résidu Arg en position 3 de ScPRX1 était substitué par un résidu Pro dans la séquence de la cible de NDPK1. Nous avons ensuite recherché des homologies de séquences entre ScPRX1 et les séquences protéiques connues. Ceci nous a permis de confirmer que ScPRX1 appartient bien à la famille des peroxyrédoxines selon une homologie de séquences de 57 à 97% selon les isoformes. L'homologie la plus forte a été retrouvée avec des PRXs de solanacées telles que de *Solanum lycopersicum* ou *Capsicum annuum*. Les plus hautes homologies de séquence (>80%) ont été observées avec des PRXs de type II. La figure 6 (p.54) montre les alignements de séquence entre ScPRX1 et certaines de ces protéines. On peut noter dans ces alignements la conservation stricte des deux résidus Cys caractéristiques des PRXs de type II (résidus en positions 50 et 75 chez ScPRX1). Il est également intéressant de remarquer que toutes ces protéines comportent un résidu Pro en position 3 (ce résidu était présent dans la séquence de la protéine phosphorylée par la NDPK1) alors qu'il est remplacé par un Arg chez ScPRX1. On retrouve également ce résidu Arg en position 3 chez *Solanum tarijense* et *S. gandarillas* mais par contre, chez *S. tuberosum*, la position 3 est occupé par une Pro (espèces non montrées dans la figure 6).

Une analyse de la séquence ScPRX1 à l'aide du logiciel WOLFPSORT disponible sur le site (<http://wolfpsort.org/>) prédit une localisation cytoplasmique pour la protéine (résultats non montrés). Nous avons cherché à corroborer cette prédiction à l'aide d'une étude phylogénétique. Nous avons donc construit un arbre phylogénétique avec la séquence ScPRX1 et des séquences végétales identifiées comme PRX de type II disponibles dans la

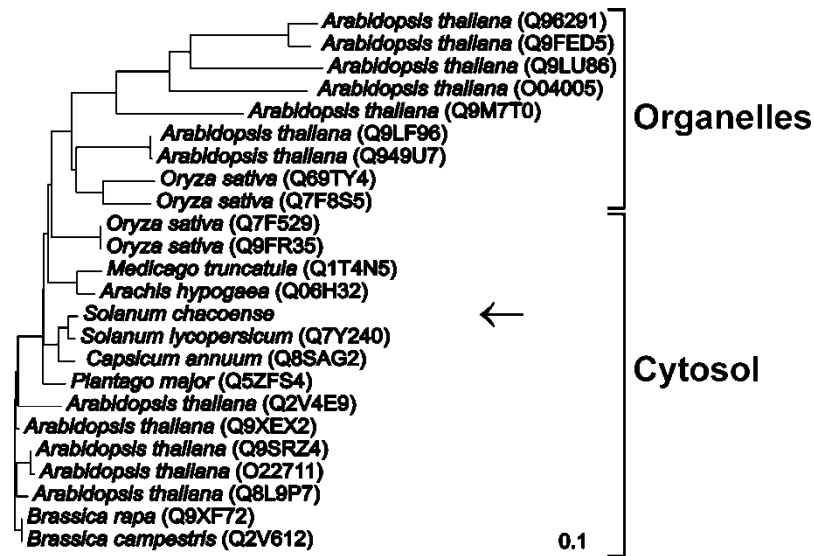


Figure 7 : Arbre phylogénique de ScPRX1 avec des séquences PRX de type II d'origines végétales. Les séquences protéiques ont été alignées comme indiqué dans la figure 6 (p.54) et l'arbre a été ensuite visualisé avec le programme TreeView 1.6.6. La barre d'échelle au bas de la figure représente 0.1 substitution par site. La position de la séquence de ScPRX1 est marquée par une flèche. Le numéro d'accèsion SwissProt des séquences utilisées est indiqué après le nom de l'espèce. Les séquences sont regroupées d'après les informations disponibles dans la banque de données SwissProt et suivant leur localisation dans des organelles ou dans le cytosol.

3.2 Génération de la (6xHis)ScPRX1, purification de la protéine recombinante et démonstration de son activité peroxydase

La protéine (6xHis)PRX1 a été construite dans le vecteur pProEx HT. La construction a été validée par séquençage et a ensuite été introduite dans la bactérie *E. coli*. La séquence de la protéine recombinante est donnée à la figure 8 (p.56). La protéine prédite possède bien un motif (6xHis) en position N-terminale et fait au total 186 acides aminés de long. Elle contient la séquence codante complète de ScPRX1. Le polypeptide possède un poids moléculaire de 20,525 kDa et un point isoélectrique de 5.49.

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
<u>MSYYHHHHHH</u>	DYDIPTTENL	YFQGMARIAV	GDVIPDGTVS	YFDEQDQMQT	VSVHSLAKGK
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
KVIIFAVPGA	FTPTCSMKHV	PGFIEKADEL	KSKGVDEILC	ISVNDFVMN	AWAKTYPENK
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
HVKFLADGAG	KYTHALGLEL	DLSDKGLGVR	SRRYALLVDD	LEVKAANIES	GGEFTISGAD
EILNAL					

Figure 8 : Séquence protéique déduite de la protéine (6xHis)ScPRX1. La séquence de la construction a été traduite avec l’outil Translate de la base de données Expsy Proteomics Server (www.expasy.org). La séquence soulignée dérive du vecteur pProEx HT et contient un motif (6xHis) permettant la purification par affinité sur colonne de Ni²⁺ immobilisé. La protéine prédite est d’une longueur de 186 acides aminés et code un polypeptide de 20,525 kDa selon l’outil ProtParam de la base de données Expsy Proteomics Server.

La synthèse de la protéine recombinante a par la suite été induite. La protéine a été purifiée selon les indications données dans la section Matériels et Méthodes. Des extraits de culture bactérienne induite par l’IPTG ainsi que les extraits brut et purifié de la protéine ont été analysés par électrophorèse dénaturante suivie d’une coloration du gel au bleu de Coomassie (fig. 3.5). Sur ce gel on peut voir que la protéine recombinante migre à un poids moléculaire d’environ 25 kD, ce qui correspond à une position différente que celle prédite à partir de la séquence donnée dans la figure 9 (p.57).

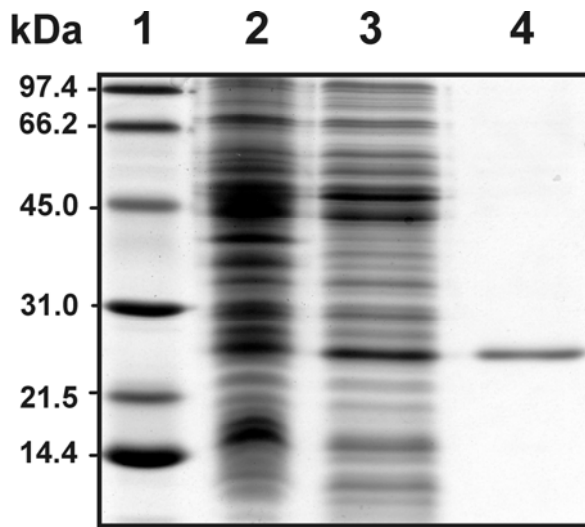


Figure 9 : Analyse par SDS-PAGE de la purification de la protéine recombinante (6xHis)ScPRX1. Les pistes représentent (1) Marqueurs de poids moléculaires, (2) Extrait brut de *E.coli* induite par l'IPTG équivalent à 0,25 mL de culture bactérienne, (3) Surnageant clarifié préparé à partir de l'extrait brut et équivalent à 0,25 mL de culture bactérienne, (4) Fraction contenant 1,2 μg de(6xHis)ScPrx1 purifiée. Les protéines ont été visualisées par coloration au bleu de Coomassie.

Des mesures d'activité enzymatiques ont ensuite été réalisées pour déterminer si (6xHis)ScPRX1 était capable de réduire le H_2O_2 . Lors de ces réactions, la disparition de H_2O_2 était suivie au cours du temps à l'aide d'un dosage colorimétrique. En présence de (6xHis)ScPRX1 réduite par du DTT, on a mis en évidence une disparition du H_2O_2 dépendante du temps d'incubation (Figure 10, p.58). La vitesse de la réaction était maximale au début de l'expérimentation. Des réactions contrôles ont été menées en absence d'enzyme, sans réduction préalable de (6xHis)ScPRX1 avec le DTT et en absence de substrat. Dans ces trois cas, aucune activité n'a été détectée. L'activité spécifique de l'enzyme recombinante, déterminée à partir de la vitesse maximale (entre 0 et 10 min), est de $1,73 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. En considérant un poids moléculaire de 20.5 kDa pour la protéine recombinante, ceci correspond à une k_{cat} de 0.59 s^{-1} .

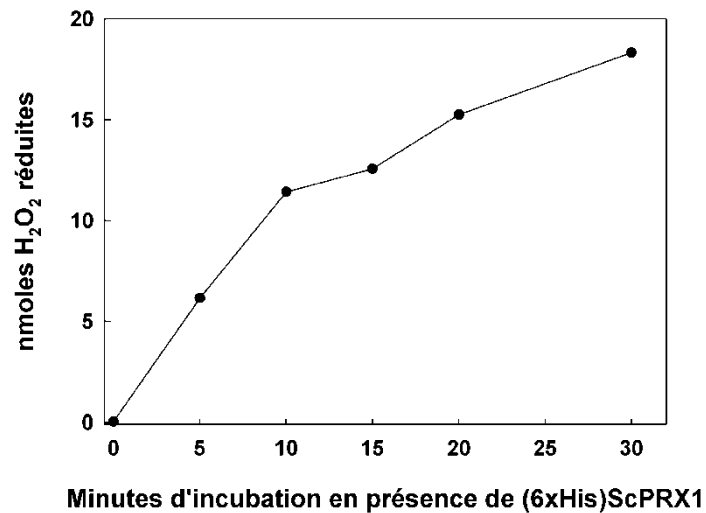


Figure 10 : Mise en évidence de l'activité de peroxydase de la (6xHis)ScPRX1. La disparition de H₂O₂ au cours du temps dans le mélange réactionnel a été mesurée à l'aide d'une méthode colorimétrique. Les points illustrés sont une moyenne représentative des réplicats dont l'erreur standard est inférieure à 5%.

3.3 Expression de PRX1 dans différents tissus chez *S. lycopersicum*

Plusieurs isoformes de PRXs sont présentes dans les différents compartiments de la cellule et ce, chez tous les organismes vivants (Dietz et al. 2002). Les différentes isoformes démontrent une diversité considérable quant à leur localisation subcellulaire et à leur spécificité tissulaire de par leur rôle de modulateur des signaux redox lors des stades de développement (Tripathi et al. 2009). Pour caractériser le patron d'expression de la PRX1 lors de la croissance normale de la plante, des immunodétections de cette protéine ont été effectuées sur plusieurs tissus de *S. lycopersicum* prélevés selon des stades de développement distincts. L'étude d'expression spatio-temporelle de la PRX1 a également été comparée avec le patron d'expression de la NDPK cytosolique afin de déterminer dans

quelles conditions les deux protéines étaient co-exprimées. La NDPK cytosolique a été détectée avec des anticorps spécifiques à cette isoforme (Dorion et al. 2006).

Il a été préalablement déterminé que la NDPK1 est exprimée dans tous les tissus chez la pomme de terre (Dorion et al. 2006). On la retrouve notamment dans les feuilles, les tissus reproducteurs et les racines. Dans les tissus photosynthétiques et les racines, l'expression de la NDPK1 était prépondérante dans les extrémités apicales (Dorion et al. 2006). L'analyse de l'expression de la PRX1 dans les racines disséquées de *S. lycopersicum* a été faite à l'aide d'un anticorps généré contre (6xHis)ScPRX1. Les analyses par immunoblot (Figures 11 et les suivantes, à partir de la p.60) révèlent que la protéine reconnue par les anticorps anti-PRX1 migre avec un poids moléculaire apparent d'environ 25 kDa, tout comme la protéine recombinante. Ces analyses ont tout d'abord démontré la présence de la protéine PRX1 dans l'apex racinaire ainsi que dans des segments s'éloignant progressivement de l'apex (Figure 11 (A), p.60). Une expression plus importante de la PRX1 a été observée au niveau de l'apex et du segment 4 alors que son expression dans les segments consécutifs est un peu plus faible.

La présence de la PRX1 a également été observée dans les tissus photosynthétiques de *S. lycopersicum* (Figure 11 (B), p.60). La PRX1 est exprimée à un niveau similaire dans les feuilles juvéniles, en croissance et matures. Dans les feuilles sénescentes, son expression est toutefois légèrement plus importante.

Dans les tissus reproducteurs, on observe des signaux d'intensités relativement égales dans les pétales et les sépales disséqués de fleurs de tomate de 2 jours et une expression moins prononcée dans les parties reproductrices, soit les étamines et le pistil (Figure 11 (C), p.60).

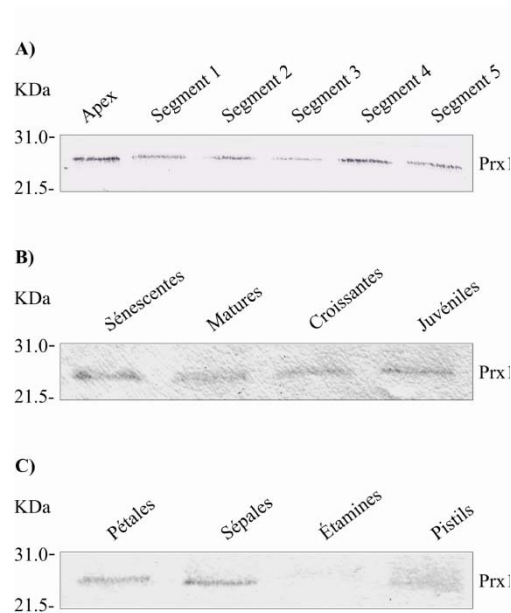


Figure 11 : Patron d'expression de la PRX1 de *S. lycopersicum*. Les protéines totales ont été extraites à partir de différents tissus. 12 µg de protéines ont été séparés par électrophorèse et transférés sur membrane pour procéder à l'immunodétection de la PRX1. (A) Expression de la PRX1 dans les racines. Des semences stérilisées de *S. lycopersicum* ont germé durant 3 jours. Les radicelles ont été récoltées et coupées en segments de 0,5 cm représentant l'apex et les segments racinaires 1 à 5 (le segment 5 étant le plus éloigné de l'apex). (B) Expression de la PRX1 dans les tissus photosynthétiques. Des feuilles juvéniles, en croissance, matures et sénescentes ont été prélevées sur des plants de *S. lycopersicum* âgés de 7 semaines. (C) Expression de la PRX1 dans les parties florales. Des fleurs âgées de deux jours ont été prélevées sur des plants de *S. lycopersicum* matures et ont été disséquées en pétales, sépales, étamines et pistils.

3.4 Étude de la modulation de l'expression de la PRX1 et de la NDPK1 par des stress abiotiques dans les cultures cellulaires de pomme de terre

Les stress abiotiques tels que la toxicité chimique, les températures extrêmes et la salinité représentent tous des menaces sérieuses pour la croissance et la survie des plantes (Wang et al. 2003). Le stress par oxydation est une composante sous-jacente d'un grand

nombre de stress abiotiques (Cramer et al. 2011). Par l'intermédiaire des ROS, il peut mener à des événements de signalisation et à une perturbation de l'équilibre redox de la cellule, conduisant à des dommages sur des biomolécules clés (Cramer et al. 2011). Dans cette section, nous avons évalué l'expression de la PRX1 et de la NDPK1 lors de situations de stress abiotiques. Ces expériences ont été réalisées sur des cultures cellulaires de pomme de terre car ce système permet un contrôle précis des conditions de stress.

3.4.1 Expression de la PRX1 et de la NDPK1 suite à un stress par des agents oxydants dans les cultures cellulaires de pomme de terre

Le stress par oxydation fait partie intégrante de la vie des cellules végétales. Les plantes génèrent des peroxydes et autres ROS en sous-produits de réactions métaboliques via les chaînes de transport d'électrons du chloroplaste, de la mitochondrie, ainsi que dans le peroxysome et la paroi cellulaire (Dat et al. 2000). L'espèce réactive produite ainsi que son site de production subcellulaire déterminent les changements moléculaires qui s'opèreront dans la cellule. Les isoformes de PRXs, sensibles au potentiel redox intracellulaire, sont modulées spécifiquement par les peroxydes simples (H_2O_2) ou les peroxydes complexes (tBOOH, COOH, LOOH et PLOOH). Nous avons donc émis l'hypothèse que la PRX1 pourrait être induite par du H_2O_2 exogène. Nous avons alors observé l'expression de la PRX1 et de la NDPK1 en fonction de la concentration en H_2O_2 ainsi que différents autres agents chimiques causant un stress par oxydation.

3.4.1.1 La PRX1, mais pas la NDPK1, est induite par le H₂O₂ dans les cultures cellulaires de pomme de terre

Des cellules ou des tissus végétaux exposés au H₂O₂ se retrouvent en situation de stress par oxydation (Mittler 2002). Cette molécule est impliquée dans plusieurs voies de signalisation cellulaire et module l'expression génique en interagissant notamment avec les protéines thiols (Hancock et al. 2006). Des résultats d'études consultées dans la littérature nous ont démontré que la présence en H₂O₂ dans des concentrations allant jusqu'à 100 mM pouvait être utilisée expérimentalement pour causer un stress par oxydation dans des cultures cellulaires d'*A. thaliana* et de *Nicotiana tabacum* et entraîner des réponses liées au stress allant de changements dans le protéome et pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire programmée (Desikan et al. 1998; Houot et al. 2001). Nous avons donc observé l'expression de la PRX1 et de la NDPK1 en présence de H₂O₂ dans des concentrations allant de 0 à 100 mM dans des cultures cellulaires de pomme de terre. Dans un premier temps, il s'est avéré que la PRX1 n'est pas induite par des concentrations exogènes en H₂O₂ allant jusqu'à 50 mM (Figure 12 (A), p.63). Nous avons toutefois observé une induction marquée de la PRX1 en réponse à 100 mM de H₂O₂ (Figure 12 (B), p.63). Dans ces mêmes conditions, l'analyse de la NDPK1 par immunoblot n'a pas permis de démontrer que cette protéine variait quantitativement (Figure 12 (B), p.63). Un traitement à l'aide de 100 mM de H₂O₂ sur une échelle de temps allant jusqu'à 15 h a donc été effectué. Cette expérience a démontré une induction maximale pour la PRX1 pour des temps entre 3 et 9 h. L'intensité de la bande PRX1 décroissait au temps 15 h (Figure 12 (C), p.63). Une quantification des ARN par Northern blot pour ces échantillons a ensuite été réalisée (Figure 12 (D), p.63). Curieusement, l'observation des ARN n'a pas révélé une augmentation d'expression de *PRXI*, on assiste plutôt à une constance d'expression en période de stress par oxydation par rapport au contrôle effectué avec la sonde ARN18S.

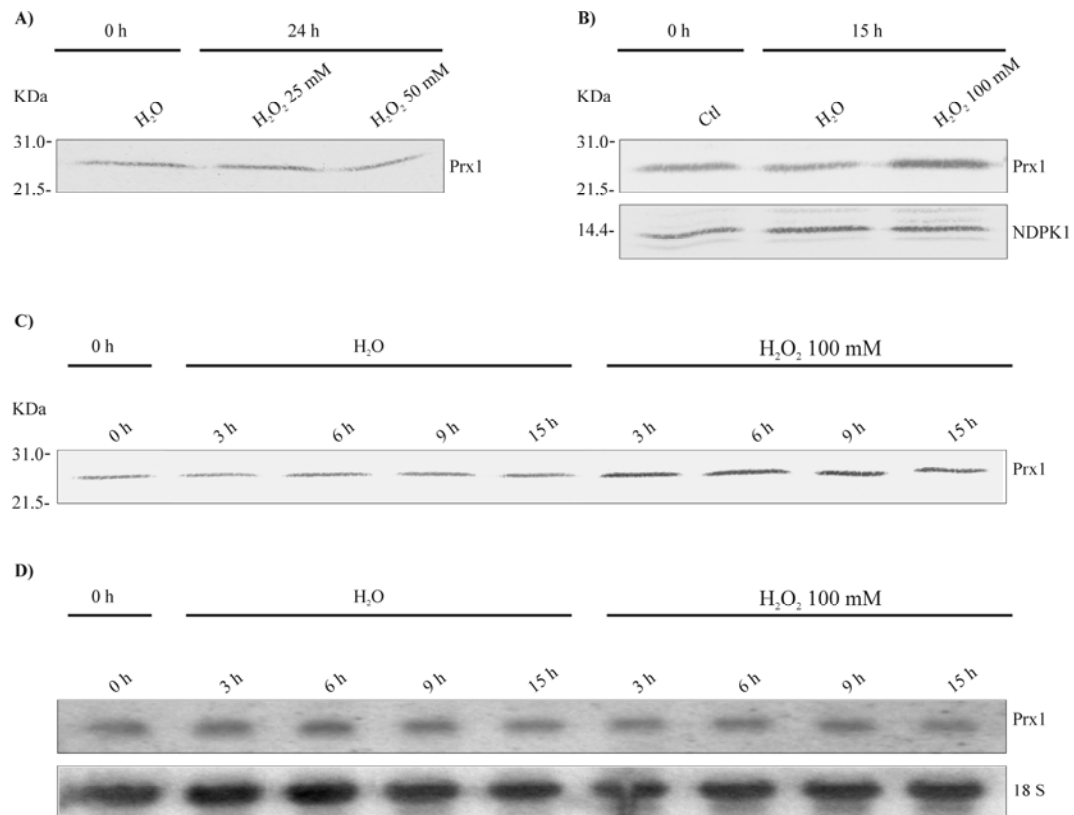


Figure 12 : Effets des traitements de cultures cellulaires de pomme de terre avec du H₂O₂. (A, B et C) Analyses par immunoblot suite à des traitements de différentes durées avec du H₂O₂ 25 mM, 50 mM et 100 mM. Ces immunodétections ont été réalisées sur 12 µg de protéines totales. (D) Analyse par Northern blot des ARN totaux des cellules ayant subi les mêmes traitements qu'en (C). Une sonde d'ADN construite à partir de la région 3'UTR de la PRX1 a été utilisée pour observer *PRX1* et une sonde d'ARN 18S a servi à titre de contrôle de la quantité d'ARN chargé par piste.

3.4.1.2 Le tBOOH n'induit pas l'expression de la PRX1 ou de la NDPK1 dans une culture cellulaire de pomme de terre

Le tBOOH est un composé qui a des propriétés oxydantes sur les cellules vivantes en causant la peroxydation des lipides (Horling et al. 2003). Des expérimentations exécutées sur des plants d'*A. thaliana* ont démontré que la présence de tBOOH à une concentration de 0,1 mM dans le milieu de culture des semences était suffisante pour