

Réponses des plantes aux cations métalliques à travers l'exemple du cadmium chez *Arabidopsis thaliana* et un mélèze hybride, *Larix x eurolepis*

Gaëlle Saladin

Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (UPRES EA 1069) - Université de Limoges – Faculté des Sciences et Techniques – 123 avenue Albert Thomas – 87060 Limoges Cedex(France).

Courriel: gaelle.saladin@unilim.fr

Résumé :

En fonction de leur concentration dans le sol, les cations métalliques peuvent entrer en compétition avec des cations essentiels au développement des végétaux (calcium, potassium, magnésium...). Ce phénomène est similaire pour d'autres éléments minéraux qui peuvent se révéler toxiques pour les plantes lorsque leur teneur est élevée dans les sols (phosphate, nitrate, sodium...). Il en résulte donc un certain nombre de réponses communes des végétaux.

Nos travaux portent pour l'instant sur une espèce herbacée (*Arabidopsis thaliana*) et une espèce ligneuse (un mélèze hybride, *Larix x eurolepis*) cultivées in vitro. Nous avons montré qu'en présence de cadmium, les plantes peuvent développer une réponse morphogénique induite par le stress (RMIS). La RMIS a été observée en réponse à d'autres stress et notamment des carences minérales (phosphates, sulfates). Elle se traduit par un raccourcissement de la racine principale et une initiation plus importante des poils absorbants et de racines latérales. Cette accommodation aurait pour but d'échapper au stress et/ou d'aller rechercher des éléments minéraux indispensables mais en faible concentration dans le sol.

L'autre stratégie de défense est la stimulation de la voie de synthèse des phytochélatines, oligopeptides synthétisés à partir du glutathion et pouvant piéger les métaux pour les transporter vers la vacuole. Nous avons ainsi montré une augmentation de l'activité des enzymes de cette voie de synthèse ainsi qu'une production de phytochélatines dans les racines ainsi que dans les parties aériennes. Cette voie est davantage induite dans les racines que les

premiers organes en contact avec le cadmium. Les racines constituent d'ailleurs le lieu d'accumulation le plus important du métal (1,5 à 2 fois plus que dans les parties aériennes).

Lorsque la concentration en cadmium augmente, les défenses ne sont plus suffisamment efficaces. En effet, un excès de cadmium provoque la formation d'espèces réactives de l'oxygène, lesquelles sont à l'origine d'une forte oxydation du contenu cellulaire. Il en résulte au final une réduction de la biomasse souterraine et aérienne. La tolérance des plantes aux cations métalliques implique donc la capacité 1) de stocker les métaux dans certains compartiments cellulaires (vacuole mais aussi paroi), et 2) de maintenir leur état d'oxydoréduction à travers l'induction de défenses anti-oxydantes (catalase, peroxydases, glutathion réductase...).

Introduction

La présence de cations métalliques dans l'environnement peut avoir des origines naturelles (activités volcaniques, érosion, lessivage...) mais les pollutions métalliques sont le plus souvent liées aux activités humaines (industries, agriculture, transports...). Par exemple, le cadmium (Cd^{2+}) est présent dans certains fertilisants, produits phytosanitaires et piles et peut être aussi libéré dans l'environnement par les incinérateurs et raffineries (Sanita di Toppi et Gabbrielli, 1999). Certains cations métalliques (zinc, cuivre, fer...) sont essentiels en faible quantité aux plantes car ils participent à de nombreuses voies métaboliques (Hänsch et Mendel, 2009). D'autres en revanche, ne sont pas indispensables aux végétaux et se révèlent toxiques à de très faibles concentrations comme le cadmium, le mercure ou le plomb.

La dangerosité de ces cations non essentiels vient du fait qu'ils entrent en compétition avec d'autres cations au niveau des transporteurs membranaires, générant ainsi une carence en certains minéraux. D'autre part, ils engendrent très souvent une oxydation de nombreuses molécules dont les enzymes. C'est le cas du Cd qui se lie aux groupes sulfhydryles d'enzymes antioxydantes, empêchant ainsi leur activité (Schützendübel et al., 2002).

De plus, il a été montré que le Cd entraîne l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène dont l' H_2O_2 (Cho et Seo, 2005). La photosynthèse peut être également affectée à travers l'altération de la synthèse de chlorophylle, des photosystèmes ainsi que de nombreuses enzymes du cycle de Calvin ou encore des thioredoxines (Chrestensen et al., 2000). La conséquence est une diminution de croissance et de rendement, à la fois au niveau des parties végétatives (feuilles, racines, production d'huiles essentielles) mais aussi au niveau des graines et des fruits (Ernst et Nelissen, 2000 ; Katanda et al., 2007).

Les végétaux peuvent cependant mettre en place différents mécanismes pour lutter contre ces cations métalliques. Certains correspondent à des défenses non spécifiques de lutte contre l'oxydation comme certaines enzymes (catalase, superoxyde dismutases, peroxydases...), des molécules à propriété anti-oxydante (ascorbate, glutathion...) ou encore l'accumulation de proline (Tamás et al., 2008). D'autres en revanche, sont plus spécifiques et permettent de piéger les cations métalliques comme certains acides organiques (malate, citrate), l'histidine (connue pour piéger le nickel chez certaines espèces), les métallothionéines ou encore les phytochélatines, ces dernières pouvant fixer les cations métalliques, les transporter et les stocker dans la vacuole (Fig. 1) (Grill et al., 1989).

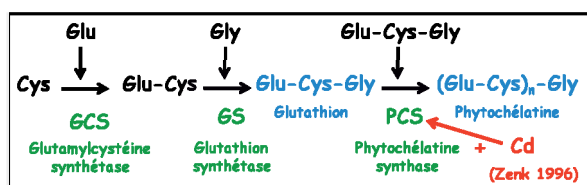


Figure 1. Voie de synthèse des phytochélatines. La PCS est présente à un niveau constitutif dans les cellules mais n'est activée qu'en présence de cations métalliques comme le Cd par exemple (Zenk, 1996).

Objectif et méthodologie

L'objectif de ce travail est de pouvoir proposer des espèces pour la phytoremédiation (procédé de décontamination écologique des sols pollués) en fonction de la nature du sol et du type de polluant présent.

Nous avons débuté ces travaux sur le Cd car c'est un des cations métalliques les plus toxiques pour les plantes et il existe pour l'instant très peu d'espèces résistantes connues. Les modèles végétaux utilisés pour initier cette étude sont d'une part *Arabidopsis thaliana* (écotype Wassilewskija ou Ws), et d'autre part un mélèze hybride, *Larix x eurolepis*. *A. thaliana* présente l'intérêt d'avoir un génome entièrement séquencé, ce qui permet d'étudier la régulation des mécanismes de défenses au niveau de l'expression des gènes et de pouvoir utiliser des mutants pour mettre en évidence l'importance de certaines voies de défense. Le mélèze hybride a, quant à lui, été choisi car c'est une espèce qui tend à être de plus en plus utilisée dans le reboisement pour plusieurs raisons : il a une croissance rapide, il est plus résistant que ses parents (aux intempéries et au chancre du mélèze) et il présente une plus forte amplitude écologique. De plus, l'intérêt des mélèzes est qu'ils ont des aiguilles caduques, ce qui permet de récolter chaque année les cations métalliques qui se seraient accumulés dans ces organes. L'avantage des arbres en phytoremédiation est la possibilité de stocker de plus grandes quantités d'ions métalliques et de pouvoir dépolluer davantage en profondeur que les espèces herbacées.

Les plants d'*A. thaliana* ont été obtenus in vitro : les graines stériles ont été mises à germer puis les jeunes plantules âgées d'une semaine ont été transférées pendant une semaine sur les milieux contenant ou non du Cd. Les mélèzes ont été obtenus in vitro par embryogenèse somatique et les embryons ont été mis à germer pendant 1 mois avant que les plantules soient transférées pendant une semaine sur des milieux contenant du Cd. L'effet du Cd a été testé sur la croissance et le développement ainsi que sur des métabolites de stress (proline, protéines solubles totales), sur la régulation de la voie de synthèse des phytochélatines et sur l'accumulation de Cd.

Résultats et discussion

Différentes concentrations en Cd ont été testées afin de déterminer la concentration maximale tolérable par les plantes. *A. thaliana* peut supporter un traitement à 100 μM de Cd (soit environ 10 mg. L⁻¹) sans que sa masse fraîche aérienne ou racinaire soit affectée de manière significative (Fig. 2). Le mélèze hybride, quant à lui, peut supporter une concentration bien plus forte car la biomasse n'est pas réduite jusqu'à 1,5 mM (Fig. 3).

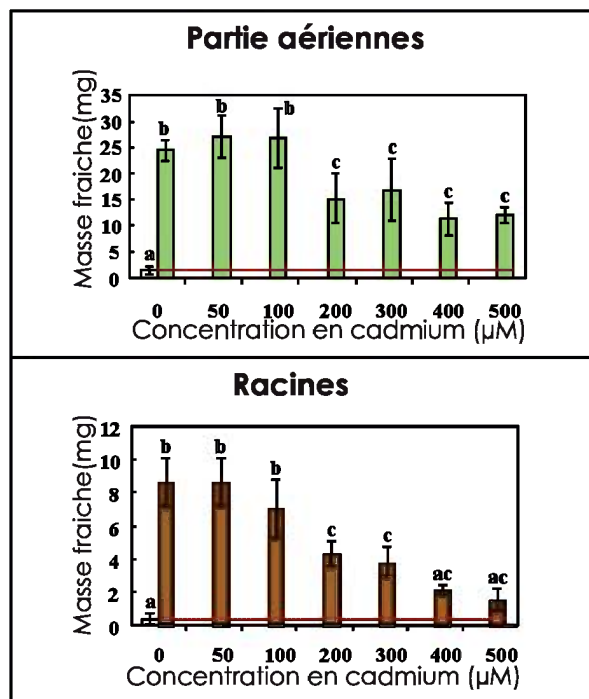


Figure 2. Masse fraîche des parties aériennes et racinaires chez *A. thaliana* après une semaine d'exposition à différentes concentrations pour des plantes âgées d'une semaine au début de l'expérience.

En présence de 100 μM de Cd, la teneur en protéines totales solubles et en proline libre n'est pas modifiée chez *A. thaliana*, ce qui indique que les plantes ne subissent pas de stress important (Fig. 4). En effet, un stress de grande intensité peut entraîner une protéolyse ainsi qu'une accumulation de proline (Dinakar et al., 2008 ; Tamás et al., 2008). En revanche, chez le mélèze, la teneur en protéines commence à diminuer dans les racines (d'environ 15%) et en parallèle, la teneur en proline est multipliée par 4 alors qu'elle reste assez proche des valeurs des témoins pour les racines (résultats

non montrés). Ces résultats suggèrent que le stress est plus important au niveau racinaire (ce qui n'est pas étonnant car ces organes sont en contact direct avec le métal) avec un début de protéolyse mais que les feuilles parviennent encore à se défendre, notamment en synthétisant de la proline.

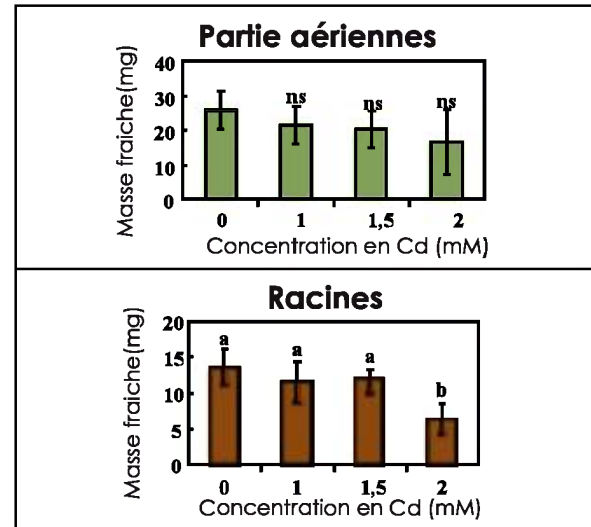


Figure 3. Masse fraîche des parties aériennes et racinaires chez le mélèze après une semaine d'exposition à différentes concentrations pour des plantes âgées d'un mois au début de l'expérience.

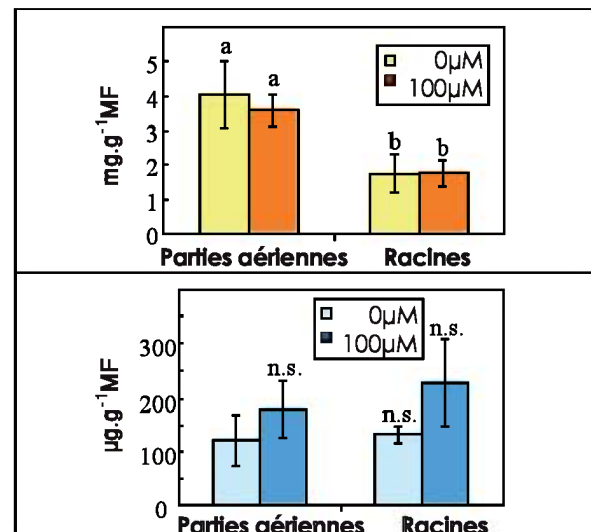


Figure 4. Teneurs en protéines solubles totales (à gauche) et en proline libre (à droite) chez *A. thaliana* après une semaine de traitement à 100 μM de cadmium de plantes âgées au départ d'une semaine.

Par ailleurs, la quantification du Cd dans les plantes montre bien que les racines sont probablement plus sensibles au stress car elles accumulent davantage de métal : environ 1,5 fois pour *A. thaliana* et 1,8 pour le mélèze (tableau 1). Les espèces hyperaccumulatrices de Cd doivent stocker au moins 100 µg de Cd par g de matière sèche (Verbruggen et al., 2009). Les résultats du tableau 1 indiquent que le mélèze est potentiellement classable parmi les espèces très tolérantes au Cd. Cependant, le début de protéolyse tend à montrer que cette résistance n'est que temporaire, peut-être parce que la concentration appliquée est trop importante (elle correspond à un sol très fortement pollué d'après Daud et al., 2008).

	Cd (µg. g ⁻¹ MS)	
	<i>A. thaliana</i>	Mélèze
Parties aériennes	113 ± 28	208 ± 86
Racines	166 ± 21 a	386 ± 34 a

Tableau 1. Teneur en cadmium dans les plantes après une semaine d'exposition à 100 µM de cadmium pour *A. thaliana* et 1,5 mM pour le mélèze.

L'étude de la voie de synthèse des phytochélatines a montré globalement une augmentation de l'activité des 3 enzymes intervenant dans cette voie en réponse au Cd (tableau 2). De plus, les activités racinaires sont généralement davantage stimulées par rapport aux parties aériennes, ce qui est en accord avec l'augmentation des phytochélatines et du glutathion qui est plus forte pour les racines chez *A. thaliana* (Fig. 5) et le mélèze (résultats non montrés). La teneur en glutathion et l'activité GS n'étant pas modifiées dans les parties aériennes d'*A. thaliana*, l'augmentation de l'activité PCS ainsi que la production de phytochélatines peuvent s'expliquer par le transport de glutathion et de phytochélatines depuis les racines vers les parties aériennes (Köstner et al., 1998 ; Gong et al., 2003 ; Herbette et al., 2006).

En revanche pour le mélèze, l'activité GS étant stimulée et la teneur en glutathion et phytochélatines étant stables dans les parties aériennes, un transport dans l'autre sens (c'est-à-dire vers les racines) de ces composés

est possible pour permettre une défense plus efficace dans les organes souterrains en contact direct avec une forte teneur en ions métalliques.

Tableau 2. Facteurs d'induction des activités enzymatiques spécifiques des 3 enzymes de la voie de synthèse des phytochélatines en réponse au cadmium. GCS : glutamylcystéine synthétase ; GS : glutathion synthétase ; PCS : phytochélatine synthase ; PA : parties aériennes.

Enzyme	Facteur d'induction			
	<i>A. thaliana</i>		Mélèze	
	Racines	PA	Racines	PA
GCS	2,3	1,9	2,4	1,5
GS	1,8	0,9	1,8	1,5
PCS	3,3	1,7	1,6	1,7

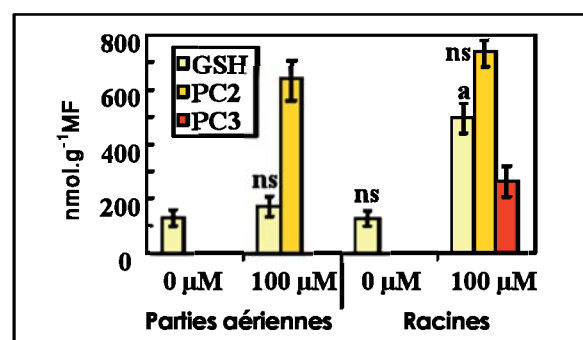


Figure 5. Teneurs en glutathion (GSH) et en phytochélatines (PC2 et PC3) chez *A. thaliana* après une semaine de traitement à 100 µM de cadmium de plantes âgées au départ d'une semaine.

Chez le mélèze, des études préliminaires ont été réalisées pour déterminer s'il existe un stress oxydant et si les plantes sont capables de se défendre en stimulant certaines activités enzymatiques. Les résultats indiquent que le stress est plus important au niveau des racines que des parties aériennes (Fig. 6). En effet, la teneur en Cd est plus forte et un début de protéolyse se produit ainsi qu'un début d'oxydation (augmentation des teneurs en H₂O₂ et MDA). Les défenses mises en place dans ces organes sont une stimulation de l'activité catalase pour combattre l'oxydation et une surproduction de glutathion et phytochélatines pour piéger le Cd. Au niveau des parties aériennes, les défenses sont plutôt focalisées sur la lutte anti-oxydante avec une forte augmentation de proline ainsi que de l'activité peroxydase.

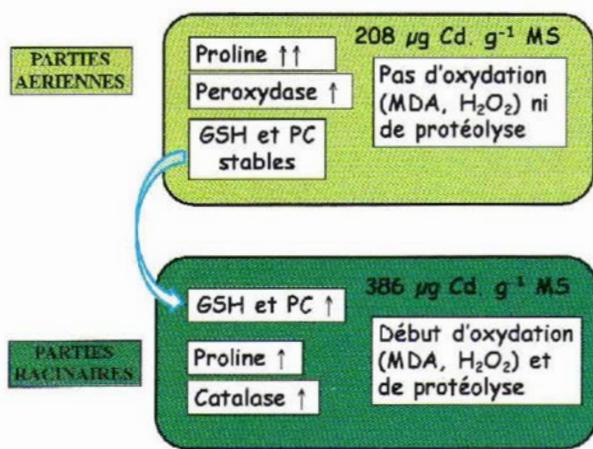


Figure 6. Réponses différentes du mélèze au cadmium au niveau des parties aériennes et des racines.

GSH : glutathion ; PC : phytochélatines ; MDA : malondialdéhyde.

Conclusions et perspectives

Chez *A. thaliana*

En comparant nos données avec celles de la littérature, nous avons mis en évidence chez *A. thaliana* que *Ws* serait plus résistant au Cd que l'écotype *Col* qui est le plus souvent utilisé en recherche : 1) sa biomasse est moins affectée pour des concentrations similaires voire supérieures en Cd, 2) le transport du Cd depuis les racines vers les parties aériennes est plus important, ce qui limite la concentration en métal dans les parties souterraines, 3) la production de phytochélatines semble plus importante.

Des travaux restent à faire notamment sur une localisation plus précise du Cd au niveau des compartiments cellulaires afin de savoir si l'accumulation est majoritairement pariétale ou vacuolaire. De plus, une localisation au niveau des tissus ou de cellules spécialisées serait nécessaire. En effet, il a été montré chez *Col* qu'une partie du Cd stocké dans les feuilles se fait au niveau des trichomes (Isaure et al., 2006). Or *Ws* possède 3,5 à 4 fois plus de trichomes que *Col*, ce qui pourrait expliquer sa plus grande capacité de transport (Passardi et al., 2007).

Par ailleurs, nous avons pu mettre en évidence une surexpression du gène *PCS2* codant pour une phytochélatine synthase (résultats non montrés) en réponse au métal donc il serait intéressant de savoir s'il existe bien une corrélation entre cette surexpression et la production de phytochélatines.

L'utilisation de mutants permettrait de répondre à cette question.

Chez le mélèze hybride

Les résultats sont prometteurs dans la mesure où la teneur en Cd dans les jeunes plantes est supérieure au seuil de validation d'espèces hyperaccumulatrices. Cependant les travaux sont à entreprendre sur des temps d'exposition plus longs et dans des conditions qui se rapprochent davantage des conditions naturelles (travaux en serre puis sur sites).

Là aussi, une localisation plus précise du stockage de Cd sera réalisée. De plus, les gènes du mélèze n'étant pas connus, une utilisation d'amorces dégénérées permettra dans un premier temps d'identifier les gènes d'intérêt (notamment ceux codant les phytochélatines synthases) puis de déterminer si leur expression évolue en réponse à une exposition au Cd.

Références bibliographiques

- Cho, U.H., Seo, N.H., 2005. *Plant Sci.* 168, 113-120.
- Chrestensen C.A., Starke D.W., Mielay J.J., 2000. *J. Biol. Chem.* 275, 26556-26565.
- Daud M.K., Suna Y., Dawooda M., Hayat Y., Variatha M.T., Wua Y.X., Raziuddin M.U., Salahuddin N.U., Zhua S. (2008). *J. Hazard. Materials* 161, 463-473.
- Dinakar N., Nagajyothi P.C., Suresh S., Udaykiran Y., Damodharam T., 2008. *J. Environ. Sci.* 20, 199-206.
- Ernst W.H.O., Nelissen H.J.M., 2000. *Environn. Pollut.* 107, 329-338.
- Gong, J.M., Lee, D.A., Schroeder, J.I., 2003. *PNAS* 100, 10118-10123.
- Grill E., Löffler S., Winnacker E.L., Zenk M.H., 1989. *PNAS* 86, 6838-6842.
- Hänsch, R., Mendel, R.R., 2009. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 259-266.
- Herbette, S., Taconnat, L., Hugouvieux, V., Piette, L., Magniette, M.L.M., Cuine, S., Auroy, P., Richaud, P., Forestier, C., Bourguignon, J., Renou, J.P., Vavasseur, A., Leonhardt, N., 2006. *Biochimie* 88, 1751-1765.
- Isaure, M.P., Fayard, B., Sarret, G., Poiris, S., Bourguignon, J., 2006. *Spectrochimica Acta* 61, 1242-1252.
- Katanda Y., Mushonga C., Banganayi F., Nyamangara J., 2007. *Physics. Chem. Earth* 32, 1185-1194.
- Köstner B., Schupp R., Schulze E.D., Rennenberg H., 1998. *Tree Physiol.* 18, 1-9.
- Passardi, F., Dobias, J., Valério, L., Guimil, S., Penel, C., Dunand, C., 2007. *J. Plant Physiol.* 164, 980-992.
- Sanita di Toppì et Gabrielli, 1999. *Environ. Exp. Bot.* 41, 105-130.
- Schützendübel A., Nikolova P., Rudolf C., Polle A., 2002. *Plant Physiol. Biochem.* 40, 577-584.
- Tamás L., Dudíková J., Juráková K., Halušková L., Huttová J., Mistrík I., Olle M., 2008. *J. Plant Physiol.* 165, 1193-1203.
- Verbruggen N., Hermans C., Schat H., 2009. *New Phytol.* 181, 759-776.
- Zenk M.H., 1996. *Gene* 179, 21-30.