

*Université de Perpignan Via Domitia*

Master 1ère année BIMoPoDD

Spécialité professionnelle "Biodiversité et Développement Durable"

**Caractérisation d'une Glutarédoxine à cœur Fer-Soufre impliquée  
dans le  
développement méristématique.**



Par Jonathan SAGAN

Année universitaire 2011-2012

Sous la direction de : M. Christophe RIONDET et M. Jean-Philippe REICHHELD

Laboratoire Génome et Développement des Plantes – UMR 5096

58, avenue Paul Alduy

66860 PERPIGNAN

Tel : +33(0)4.68.66.21.19 / Fax : +33(0)4.68.66.84.99



**UPVD**  
Université de Perpignan Via Domitia



AGENCE NATIONALE DE LA RECHERCHE  
**ANR**

# Sommaire

|                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I Introduction :                                                                            | 1  |
| II Généralités :                                                                            | 2  |
| II.A L'organisme d'étude : <i>Arabidopsis thaliana</i>                                      | 2  |
| II. B Les glutarédoxines :                                                                  | 2  |
| II.B.1 Classification :                                                                     | 2  |
| II.B.2 Les fonctions des Grx :                                                              | 3  |
| II.B.3 Les cœurs Fer-Soufre chez les glutarédoxines :                                       | 4  |
| II.B.3.a Les types de cœurs Fer-Soufre :                                                    | 4  |
| II.B.3.b Assemblage des cœurs Fer-Soufre et implication des Grx :                           | 5  |
| II.C Grx S17 :                                                                              | 6  |
| III Matériel et méthodes :                                                                  | 7  |
| III.A Milieux de culture :                                                                  | 7  |
| III.A.1 Culture en terre :                                                                  | 7  |
| III.A.2 Culture in vitro :                                                                  | 8  |
| III.B Microscopie :                                                                         | 8  |
| III.C Gel de protéine et Western-Blot :                                                     | 9  |
| III.C.1 Extraction des protéines                                                            | 9  |
| III.C.2 Dosage des protéines                                                                | 9  |
| III.C.3 Gel SDS de protéine et Western Blot                                                 | 10 |
| III.D PCR (Polymerase Chain Reaction) :                                                     | 11 |
| III.D.1 Extraction de l'ADN                                                                 | 11 |
| III.D.2 Mix PCR et cycle d'amplification                                                    | 11 |
| III.D.3 Gel, migration et lecture                                                           | 12 |
| IV Résultats :                                                                              | 12 |
| IV.A Vérification de la complémentation et de la localisation des différentes constructions | 12 |
| IV.A.1 Génotypage : vérification du fond génétique grxs17                                   | 12 |
| IV.A.2 Western-Blot :                                                                       | 13 |
| IV.A.3 Microscopie confocale :                                                              | 14 |
| IV.B Le facteur lumière impliqué dans le développement du méristème racinaire :             | 15 |
| IV.B.1 Influence de l'intensité lumineuse :                                                 | 15 |
| IV.B.2 Influence de la photopériode :                                                       | 17 |
| IV.C Cytologie :                                                                            | 19 |
| IV.C.1 Mise en évidence des espèces oxygénées réactives :                                   | 19 |
| IV.C.2 Mise en évidence de la mort cellulaire et de la taille des méristèmes racinaires :   | 20 |
| V Discussion et conclusion :                                                                | 21 |
| Références :                                                                                | 24 |

1

## **II Généralités :**

### **II.A L'organisme d'étude : *Arabidopsis thaliana***

*Arabidopsis thaliana* plus communément nommée « arabette des Dames » est une angiosperme faisant partie de la famille des *brassicaceae*. Elle est hermaphrodite et se reproduit principalement par auto-fécondation : l'autogamie. Son cycle de développement est d'environ trois mois (de la graine à la graine dure). Elle est devenue l'organisme modèle pour les études de génétique mais aussi de biologie moléculaire et de physiologie. En effet, c'est en 2000 que son génome (l'un des plus petit des plantes supérieures) est séquencé (Theologis *et al.* 2000). Il est réparti sur cinq chromosomes qui contiennent environ vingt six mille gènes pour une taille totale de 157 millions de paires de bases (Bennett *et al.* 2003). Son intérêt pour la communauté scientifique est multiple. En effet, c'est une plante de taille réduite, avec un petit génome, un cycle de vie rapide et un seul plant produit des milliers de graines.

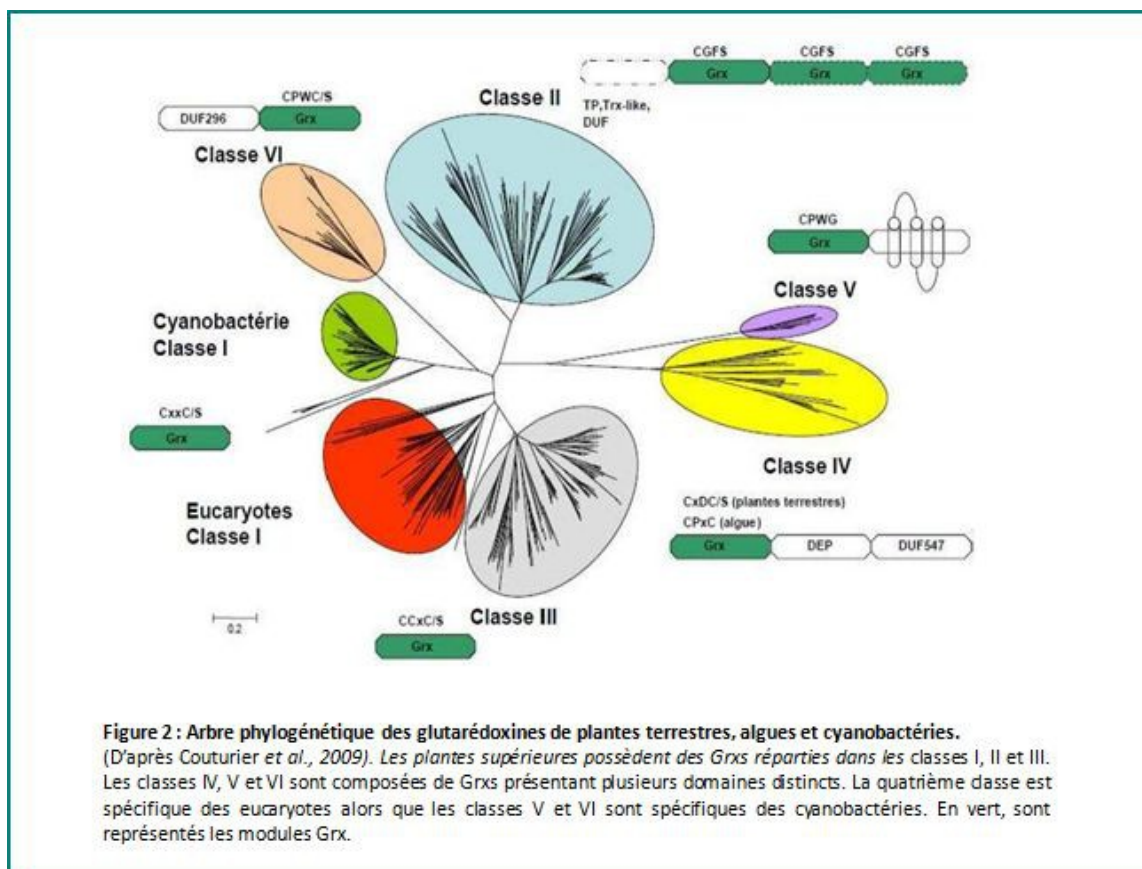
### **II.B Les glutarédoxines :**

Les glutarédoxines sont majoritairement des oxydoréductases de petites tailles (10 à 25 kDA). Elles possèdent un ou plusieurs sites actifs de type CxxC ou CxxS. On distingue les monothiols des dithiols par la présence d'une ou deux cystéines au niveau de leur site actif. D'un point de vue biochimique, elles ont à ce jour deux rôles démontrés : la réduction de ponts disulfures (inter et/ou intramoléculaire) (Dietz, 2003), et l'assemblage de cœurs Fer-Soufre (Muhlenhoff *et al.* 2003 ; Rodriguez-Manzanque *et al.* 2002). D'un point de vue physiologique, elles ont un nombre important de fonctions démontrées chez les procaryotes, eucaryotes inférieurs et non photosynthétiques (rôle majeur dans la réponse directe ou indirecte au stress oxydatif (Rodriguez-Manzanque *et al.* 1999), mais très peu d'études mettent en lumière la fonction de ces protéines chez les plantes.

#### **II.B.1 Classification :**

La première Grx découverte possédait un site actif de type CPYC lui conférant une activité réductase. Mais une multitude de variété de sites furent découverts par analyses génomiques (CGYC, CSY[C/S], CGFS, Cx[C/S]). Les dernières études phylogénomiques effectuées sur 58 organismes photosynthétiques ont démontré que la majorité des plantes supérieures possédaient une trentaine gènes codant des Grx, au lieu de quatre à sept chez les autres eucaryotes non photosynthétiques (Morel *et al.* 2008 ; Couturier *et al.* 2009). Elles ont été classées selon la nature de leur site actif, et notamment grâce à la sérine ou la cystéine de la quatrième position du site actif. Chez *Arabidopsis thaliana*, notre organisme d'étude, on trouve 14 Grx ayant pour motif CxxC

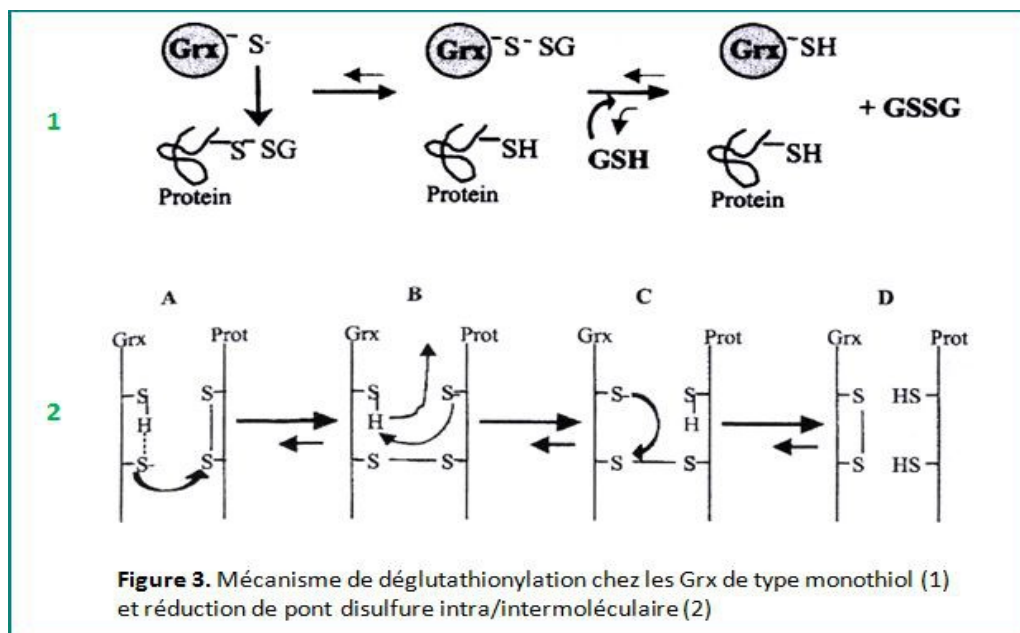
nommées Grx C1 à C14. On trouve 17 Grx dont le motif est CxxS, nommées par conséquent Grx S1 à S17 (Rouhier *et al.* 2004 ). Ces Grx sont regroupées dans trois classes I, II et III, parmi les cinq présentes chez les organismes photosynthétiques ( Fig. 2).



### **II.B.2 Les fonctions des Grx :**

Les Grx sont des protéines agissant par échange dithiol-disulfure. Elles présentent deux mécanismes distincts. Un premier de réduction d'un pont disulfure entre une protéine et le glutathion (GSH) commun aux Grx mono et dithiols, c'est ce qu'on appelle la réaction de déglutathionylation (Fig. 3.1). Une fois cette réaction effectuée, la Grx se retrouve à son tour glutathionylée (oxydée). Afin d'être régénérée, elle sera réduite par une autre molécule de GSH ce qui libérera une Grx active et une molécule de glutathion oxydée (GSSG). Le deuxième mécanisme est la réduction d'un pont disulfure intra ou intermoléculaire (Fig. 3.2). Dans ce mécanisme, la première cystéine du site actif va effectuer une attaque nucléophile du pont disulfure de la protéine cible, ce qui va aboutir à la formation d'un pont disulfure intermoléculaire. Ce nouveau pont sera ensuite réduit par l'attaque de la deuxième cystéine catalytique. Si on associe la grande diversité des Grx au fait que le GSH soit le composé thiol rédox le plus abondant chez les plantes (Meyer, 2008),

de nombreuses études suggèrent qu'elles ont plusieurs rôles majeurs au sein de la plante (Lemaire, 2004 ; Rouhier *et al.* 2004).



Ainsi, après diverses études sur *Arabidopsis thaliana* il est apparu que certaines de ces protéines étaient impliquées dans le développement des pétales (Xing *et al.* 2005), dans la protection contre les attaques oxydatives (Cheng *et al.* 2006), qu'elles interagissaient avec des facteurs TGA (facteurs de transcription) (Ndamunkong *et al.* 2007) et CAX1 (Cheng & Hirschi, 2003).

### **II.B.3 Les cœurs Fer-Soufre chez les glutarédoxines :**

Les cellules végétales effectuent à la fois la photosynthèse et la respiration. Ces deux réactions nécessitent une quantité importante de protéines à cœur Fer-Soufre (Jonhson and Smith, 2005). Chez les eucaryotes, on retrouve trois systèmes d'assemblage des centres Fer-Soufre : ISC, SUF et CIA (Balk *et al.* 2005) dans lesquels les Grx sont ou seraient impliquées

#### **II.B.3.a Les types de cœurs Fer-Soufre :**

On retrouve chez tous les organismes vivants des centres Fer-Soufre. Ce sont des cofacteurs protéiques constitués d'atomes de fer et de soufre. Il en existe de plusieurs sortes dont les principaux sont : [2Fe-2S], [3Fe-4S] et [4Fe-4S]



| <b>Protein</b>                                                        | <b>Fe-S cluster</b>                          | <b>Localization<sup>a</sup></b> |
|-----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------|
| Aconitase                                                             | [4Fe-4S]                                     | Mitochondrion, cytosol          |
| Adenosine 5'-phosphosulfate reductase (APS reductase)                 | [4Fe-4S]                                     | Plastid                         |
| Adrenodoxin (mitochondrial ferredoxin)                                | [2Fe-2S]                                     | Mitochondrion                   |
| Aldehyde oxidase                                                      | 2[2Fe-2S]                                    | Cytosol                         |
| Amidophosphoribosyltransferase                                        | [4Fe-4S]                                     | Plastid                         |
| Biotin synthase                                                       | [2Fe-2S], [4Fe-4S]                           | Mitochondrion                   |
| Chlorophyll <i>a</i> oxygenase                                        | [2Fe-2S] (Rieske-type)                       | Plastid                         |
| Choline monooxygenase                                                 | [2Fe-2S] (Rieske-type)                       | Plastid                         |
| Cnx2 (molybdopterin synthesis)                                        | <sup>b</sup>                                 | Cytosol (P)                     |
| Dihydroxy-acid dehydratase                                            | [4Fe-4S]                                     | Plastid                         |
| DNA glycosylase (ROS1, DME and DME-like proteins)                     | [4Fe-4S]                                     | Nucleus                         |
| Endonuclease III (NTH1)                                               | [4Fe-4S]                                     | Nucleus                         |
| Ferredoxin                                                            | [2Fe-2S]                                     | Plastid                         |
| Ferredoxin-thioredoxin reductase                                      | [4Fe-4S]                                     | Plastid                         |
| Glutamate synthase (Fd-GOGAT)                                         | [3Fe-4S]                                     | Plastid                         |
| Lipoate synthase (related to Biotin synthase)                         | [2Fe-2S], [4Fe-4S]?                          | Mitochondrion, plastid          |
| NADH-plastoquinone oxidoreductase subunits K, I, H (PsbG, NdhI, NdhH) | <sup>b</sup>                                 | Plastid                         |
| NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I)                            | <sup>b</sup>                                 | Mitochondrion                   |
| NBP35 homologue (P-loop NTPase)                                       | <sup>b</sup>                                 | Cytosol (P)                     |
| NAR1 (hydrogenase-like)                                               | <sup>b</sup>                                 | Cytosol (P)                     |
| Nitrite reductase                                                     | [4Fe-4S]                                     | Plastid                         |
| Pheophorbide <i>a</i> oxygenase (LLS1)                                | [2Fe-2S] (Rieske-type)                       | Plastid                         |
| Photosystem I subunits PsaA and PsbB                                  | [4Fe-4S] (F <sub>x</sub> )                   | Plastid                         |
| Photosystem I subunit PsbC                                            | 2[4Fe-4S] (F <sub>A</sub> , F <sub>B</sub> ) | Plastid                         |
| Rieske protein (PetC) (cytochrome <i>b<sub>6</sub>f</i> complex)      | [2Fe-2S] (Rieske-type)                       | Plastid                         |
| Rieske protein (ubiquinol-cytochrome <i>c</i> reductase)              | [2Fe-2S] (Rieske-type)                       | Mitochondrion                   |
| RNaseL inhibitor-like                                                 | <sup>b</sup>                                 | Cytosol (P)                     |
| Sirohydrochlorin ferrochelatase                                       | [2Fe-2S]                                     | Plastid                         |
| Succinate dehydrogenase subunit 2                                     | [2Fe-2S], [3Fe-4S], [4Fe-4S]                 | Mitochondrion                   |
| Sulfite reductase                                                     | [4Fe-4S]                                     | Plastid                         |
| Tic55, plastid protein import machinery                               | [2Fe-2S] (Rieske-type)                       | Plastid                         |
| Xanthine dehydrogenase                                                | 2[2Fe-2S]                                    | Cytosol                         |

<sup>a</sup>Fe-S proteins are important in many metabolic pathways in plants, including photosynthesis, respiration, nitrogen and sulfur assimilation, DNA repair and co-factor biosynthesis. Most Fe-S proteins are found in chloroplasts (plastid) and mitochondria. This list is far from complete because more Fe-S proteins continue to be discovered. (P) predicted based on sequence or other information.

<sup>b</sup>Type of cluster not yet determined.

Une liste non exhaustive de ces métalloprotéines a d'ailleurs été dressée par Balk J. et Lobréaux S. en 2005 (Table 1). Une de leurs fonctions principales serait de transférer des électrons de part le degré d'oxydation du Fer ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ). D'autres rôles leur sont attribués, comme servant de site actif chez certaines enzymes catalytiques (aconitases) ou encore comme étant des capteurs de stress oxydatif liés à des facteurs de transcription chez les bactéries (Beinert *et al.* 1999). Enfin il a été suggéré que chez certaines protéines, dont le centre Fer-Soufre avait une fonction inconnue, que ce complexe était simplement d'ordre structural. C'est par exemple le cas d'une hélicase impliquée dans la réparation de l'ADN (Pugh *et al.* 2008) : la Rad3.

### II.B.3.b Assemblage des cœurs Fer-Soufre et implication des Grx :

Que se soit chez les procaryotes ou chez les eucaryotes, les protéines sont d'abord synthétisées sous la forme d'apoprotéines (protéines non fonctionnelles). Le groupe prosthétique n'est inséré qu'après. On distingue quatre systèmes principaux chez les Grx intervenants dans la machinerie d'assemblage des centres Fer-Soufre (Figure 4). Ce sont les opérons ISC (Iron-Sulfur Cluster) pour les mitochondries, SUF (Sulfur mobilization) pour les plastes, NIF (Nitrogen Fixation) et CIA (Cytosolic Iron-sulfur Cluster Assembly) pour le cytosol (Balk *et al.* 2005). Le premier opéron mitochondrial fut d'abord caractérisé chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, mais on sait dorénavant qu'il est également présent chez les plantes (Balk *et al.* 2005). Ces trois systèmes nécessitent une cystéine désulfurase nommée respectivement IscS, SufS et NifS. Ces dernières permettraient un apport de soufre, tandis que la source en fer reste méconnue. La fonction première

de ces machineries est d'établir un centre Fer-Soufre sur des protéines dites « scaffold ». Ces protéines scaffold sont dites « U » (IscU, SufU, NifU). Elles transféreraient ainsi leurs cœurs Fer-Soufre aux apoprotéines (protéines non fonctionnelles) devenant ainsi des holoprotéines (protéines matures).

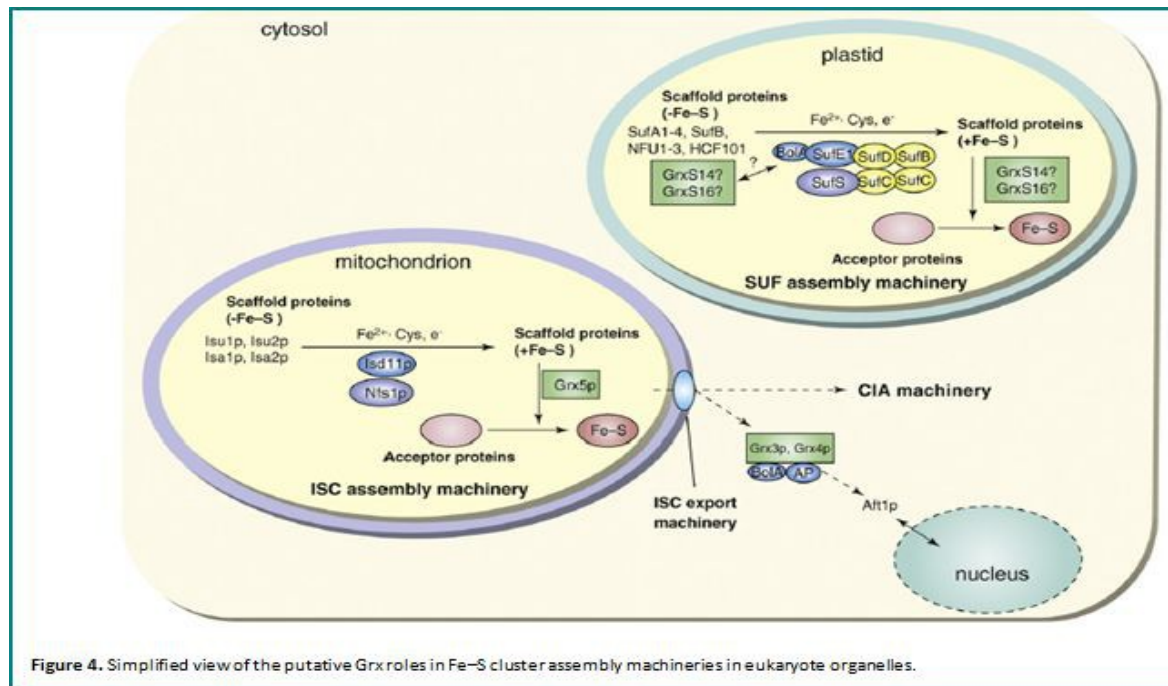


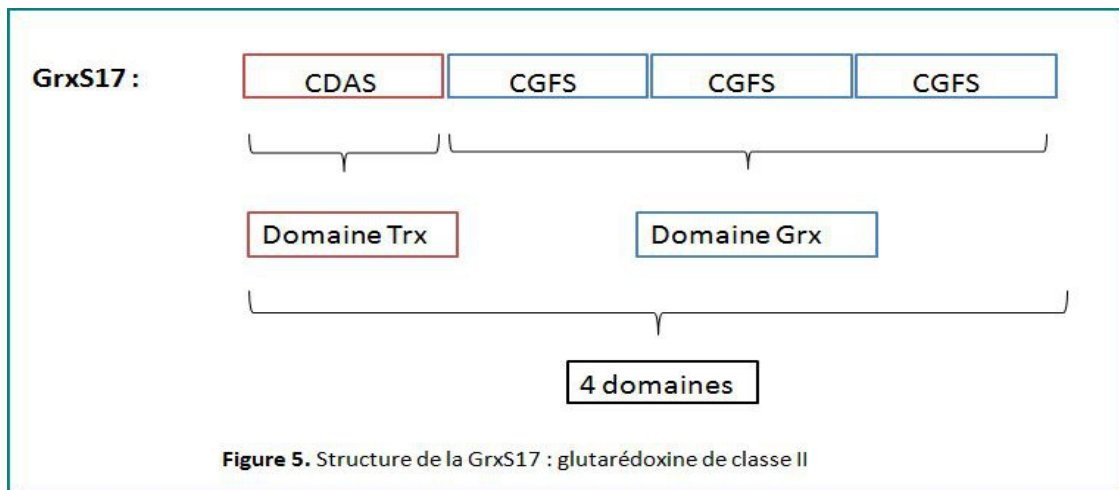
Figure 4. Simplified view of the putative Grx roles in Fe-S cluster assembly machineries in eukaryote organelles.

Des études ont démontré que la Grx5 de la levure est impliquée dans l'assemblage au niveau mitochondrial des centres Fer-Soufre (Rodriguez Manzanque *et al.* 2002). En effet, l'activité des protéines contenant un centre Fer-Soufre serait nettement diminuée, voir inexistante dans le mutant *grx5*. De plus dans ce même mutant, une protéine scaffold Isu1 présenterait une accumulation de liaisons avec des centres Fer-Soufre. La Grx5 serait donc impliquée dans le transfert des cœurs Fer-Soufre. Enfin de récentes études ont prouvé que les glutarédoxines chloroplastiques de types CGFS (GrxS14 et GrxS16) pouvaient remplacer l'activité de la Grx5 dans le mutant *grx5*. (Bandyopadhyay *et al.* 2008)

## II.C Grx S17 :

La protéine GrxS17 est une glutarédoxine multi-domaines faisant partie de la classe II. Elle possède quatre domaines, un thiorédoxine (Trx) et trois domaines Grx avec des sites actifs de type « CGFS ».





Une étude récente sur cette protéine a ainsi démontré chez *Arabidopsis thaliana* que cette Grx était surexprimée par une élévation de la température (Cheng *et al.* 2010). Elle serait donc exprimée en réponse à un stress thermique. Il apparaît qu'à température élevée (28°C) elle soit moins exprimée dans les feuilles, mais plus exprimée dans les racines et les fleurs (Cheng *et al.* 2010). D'un point de vue phénotypique, les auteurs ont observé un raccourcissement de la racine primaire chez une plante dépourvue de GrxS17 comparé à l'individu sauvage. Ce phénotype est accentué avec une forte température (75%). Cette étude de Cheng *et al.* a aussi mis en évidence que la suppression de cette protéine entraîne également une perturbation de la signalisation de l'auxine qui engendre une anomalie dans le développement de la plantule. Cette perte de sensibilité à l'auxine serait dû à une accumulation d'EOR (espèces oxygénées réactives) dans les tissus. Malgré cela, aucun phénotype visible n'a été vu sur la germination de la graine, stade de développement particulièrement sensible aux variations des EOR.

L'équipe de Perpignan travaille en collaboration avec différents acteurs du projet Fires dont l'équipe du laboratoire Biologie Végétale et Microbiologie Environnementale de Cadarache. Ces derniers ont remarqué une différence de longueur racinaire chez le mutant *grxs17*. Ainsi le travail présenté ici aura pour but de mettre en évidence, ou du moins d'apporter des éléments de réponse quant au rôle de la glutarédoxine S17 dans le développement du méristème racinaire.

### **III Matériel et méthodes :**

#### **III.A Milieux de culture :**

##### **III.A.1 Culture en terre :**

Les lignées sauvages (Wt), le mutant pour la GrxS17( $\Delta$ S17), 1, 12, 18, 20, 22, 25 et 29 seront utilisées (voir Figure 1 pour le détail des constructions). Les plantes sont cultivées sur un

milieu composé d'un quart de vermiculite et de trois quarts de terreau dans les conditions suivantes : température 22°C, hygrométrie 80%, photopériode longue 16h/8h (J/N), intensité lumineuse : 100µE. Elles sont ensemencées directement sur le milieu, puis passées au froid (7°C) pendant 48h. Après cette vernalisation, elles sont mises en chambre de culture.

### ***III.A.2 Culture in vitro :***

Les lignées sauvage, ΔS17, 1, 2, 3, 9, 11, 12, 13, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 25 et 29 sont utilisées. Elles sont mises en culture sur gel nutritif MS/2 : 2,2g de milieu Murashige & Skoog, 0,5 M de MES, 8 g de plant-agar + ajout de KOH pour un pH = 5,8, QSP 1L avec de l'eau. Pour le milieu MS/2 avec saccharose, celui-ci est ajouté à la concentration de 10g/L. Pour le milieu MS/2 avec hygromycine, celui-ci est ajouté à la concentration de 30 µg/mL. Avant d'être ensemencées les graines sont préalablement stérilisées pendant 15 minutes dans 0,5 mL d'éthanol 70%. Elles sont ensuite séchées en condition stérile sur du papier buvard. Une fois la gélose nutritive coulée et refroidie dans les boîtes de Pétri, une dizaine de graines de chaque lignée sont déposées sur celui-ci. Deux lignées sont mises par boîte. Les semis sont ensuite mis au froid (7°C) pendant 2 jours. Le retour à la chaleur déclenchera la germination. Après le deuxième jour de mise à 22°C des cultures, les graines commencent à germer. Les mesures de la longueur racinaire sont mesurées à 10 jours de croissance en sortant les plantules des boites et en étirant la racine principale pour obtenir une mesure précise de la longueur. Les valeurs présentées dans chaque graphique sont la moyenne des mesures sur dix plantules différentes. Plusieurs conditions de lumière sont testées :

| Conditions lumineuses           |                               |                                  |                               |           |
|---------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|-----------|
| Photopériode longue 16/8h (D/N) |                               | Photopériode courte 8h/16h (D/N) | Jour continu                  | Obscurité |
| <i>Forte lumière (500µE)</i>    | <i>Faible lumière (150µE)</i> | <i>Faible lumière (150µE)</i>    | <i>faible lumière (150µE)</i> | /         |
| <b>A</b>                        | <b>B</b>                      | <b>C</b>                         | <b>D</b>                      | <b>E</b>  |

Au total, cinq conditions de lumière ont été mises en place pour une même température de 22°C.

### **III.B Microscopie :**

Pour vérifier la localisation des protéines d'intérêts ainsi que la mort cellulaire au sein du tissus végétal, un microscope confocal Zeiss LSM700 est utilisé. Pour vérifier les complémentations qui portent une GFP fusionnée aux protéines d'intérêt, des plantules âgées de 10 jours sont montées entre lame et lamelle en milieu aqueux et observées.

Pour observer la mort cellulaire, des racines sont prélevées sur des plantules âgées de 10 jours (souche sauvage, la complémentée pleine longueur (lignée 18) et la plantule mutée ΔgrxS17) et colorées à l'iodure de propidium. Les racines sont immergées dans une solution aqueuse d'iodure de propidium (5µg/mL) pendant une minute, rincées trois fois dans de l'eau et montées entre lame et

lamelle dans de l'eau.

Pour visualiser la présence de deux types d'EOR : les  $H_2O_2$  et les superoxydes, un microscope à fluorescence plein champ est utilisé. Pour cela deux plantules de chaque lignées (cultivées à faible lumière) sont récoltées et mises en présence de réactifs. Le DAB : 700 $\mu$ L de DAB + 1mL de tampon phosphate pH=7 + 1mL d'azide de sodium + 6,7mL d'eau extra pure. Ce réactif met en évidence le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Après coloration des tissus, la plantule est décolorée dans de l'éthanol 95%, puis observée entre lame et lamelle dans l'eau. Le même protocole est suivi pour un autre réactif, mettant en évidence cette fois-ci les superoxydes : le NBT : 1 tablette de NBT (10mg) + 1mL de tampon phosphate + 1 mL d'azide de sodium + 7 mL d'eau.

### III.C Gel de protéine et Western-Blot :

#### ***III.C.1 Extraction des protéines***

Des jeunes feuilles des lignées suivantes sont échantillonnées : sauvage,  $\Delta S17$ , 1, 12, 18, 20, 22, 25 et 29 . Une fois échantillonnées dans des tubes Eppendorfs, ceux ci sont plongés dans de l'azote liquide afin de les geler. Les feuilles sont ensuite broyées à froid (bains fréquents dans l'azote liquide) grâce au broyeur « silamat S6 » (fréquence de malaxage 4500 T/min) pendant deux fois 10 secondes en présence de billes de verres de 2mm (une dizaine par tube), puis mises en présence de tampon d'extraction et vortexées. Le tampon est composé de : 500 $\mu$ L de solution Hepes (pH = 8, 100mM) + 25 $\mu$ L de SDS (0,5%) + 0,01g de PVP (Polyvinylpyrrolidone, 1g/100mL) + 475 $\mu$ L d'eau milli-Q (eau extra pure). Les volumes en tampon d'extraction dépendent du poids en tissus frais selon le ratio suivant 50 $\mu$ L de tampon pour 75mg de tissus frais.

| Lignée                              | Wt   | $\Delta S17$ | 1    | 12   | 18   | 20   | 22   | 25 | 29 |
|-------------------------------------|------|--------------|------|------|------|------|------|----|----|
| Poids de tissu frais (mg)           | 77   | 75           | 76   | 77   | 77   | 77   | 82   | 75 | 78 |
| Volume tampon extraction ( $\mu$ L) | 51.3 | 50           | 50.6 | 51.3 | 51.3 | 51.3 | 54.6 | 50 | 52 |

Le mélange est ensuite centrifugé 2 minutes à 13000 rpm. Le surnageant contenant les protéines est récupéré et conservé sur glace.

#### ***III.C.2 Dosage des protéines***

Afin de doser les protéines, une courbe d'étalonnage est réalisée avec quatre points de calibration : 0, 2, 4 et 6  $\mu$ g d'albumine de bœuf par mL + 200  $\mu$ L de réactif de Bradford, QSP 800  $\mu$ L d'eau par spectrophotométrie à 595nm. Les protéines des échantillons sont dosées selon le protocole suivant: 1  $\mu$ L d'extrait total + 200  $\mu$ L de réactif de Bradford, QSP 800  $\mu$ L d'eau. Les échantillons sont mélangés et incubés 10 min avant la mesure.

### III.C.3 Gel SDS de protéine et Western Blot

Une fois dosées, les protéines vont migrer sur un gel de polyacrylamide. Pour cela, un premier gel est coulé le Resolving gel (10%) : 3,3mL d'acrylamide 30% + 3,74mL Tris HCl 1M ; pH = 8,8 + 2,9mL d'eau + 50μL SDS (20%) + 32μL persulfate NH<sub>4</sub> (10%) + 3,75μL de TEMED. Celui-ci est recouvert d'une solution d'éthanol à 70%. Après polymérisation, l'éthanol est retiré, et le deuxième gel : le Stacking gel (3,3%) est coulé : 0,55mL d'acrylamide 30% + 0,625 mL Tris HCl 1M; pH = 6,8 + 3,85mL d'eau + 25μL SDS (20%) + 50μL persulfate NH<sub>4</sub> (10%) + 10μL TEMED. Le peigne est mis en place et le gel prend en masse pendant une heure et demie.

Après plusieurs essais de mise au point, une quantité de 5 μg de protéine totale a été choisie pour réaliser les gels pour la détection par l'anticorps anti-S17 (Ac.S17) et 25 μg pour l'anticorps anti-GFP (Ac.GFP) (voir tableau ci-dessous).

| gel S17                      |     |      |     |     |     |      |      |    |     |
|------------------------------|-----|------|-----|-----|-----|------|------|----|-----|
| Lignée                       | Wt  | ΔS17 | 1   | 12  | 18  | 20   | 22   | 25 | 29  |
| Volume d'extrait (μL)        | 1.6 | 2.3  | 1.6 | 1.1 | 2.7 | 1.14 | 2.05 | 1  | 1.2 |
| Volume tampon de charge (μl) | 8.4 | 7.7  | 8.4 | 8.9 | 7.3 | 8.86 | 7.95 | 9  | 8.8 |

| gel GFP                      |       |      |    |      |    |      |       |    |       |
|------------------------------|-------|------|----|------|----|------|-------|----|-------|
| Lignée                       | Wt    | ΔS17 | 1  | 12   | 18 | 20   | 22    | 25 | 29    |
| Volume d'extrait (μL)        | 8.05  | 11.5 | 8  | 5.5  | 14 | 5.7  | 10.25 | 5  | 6.15  |
| Volume tampon de charge (μl) | 13.95 | 10.5 | 14 | 16.5 | 8  | 16.3 | 11.75 | 17 | 15.85 |

Un marqueur de poids moléculaire est déposé dans l'un des puits du gel afin de vérifier le poids moléculaire des protéines. Il est capable d'indiquer des poids allant de 250 à 10 kDa. La migration débute à 100V jusqu'à ce que les protéines passent le Stacking gel, puis continue à 150V. Une fois terminée, elles sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. Le transfert s'effectue pendant une heure et demie à 160 mA en milieu liquide. Le transfert s'effectue grâce au tampon de transfert composé de : 3 g de Tris 20 mM + 14,4g de glycine 192 mM et 200 mL d'éthanol 70% le tout est complété à 1L par de l'eau milli-Q.

Les membranes sont ensuite saturées par des protéines de lait. Pour cela les membranes sont mises à incuber dans la solution de blocking toute une nuit. Cette solution est composée de TBS-T (Tris Base Sodium Tween) et de lait en poudre. La composition du TBS-T est : 2,42g de Tris + 15ml d' HCl 1M + 8g NaCl + 1mL de Tween20, le tout est complété à 1L avec de l'eau. Enfin 5% de lait en poudre sont ajoutés (2,5g de lait pour 50 mL de TBS-T).

La nuit passée, les membranes sont rincées au TBS-T (quatre fois dix minutes) et sont mises en présence des anticorps primaires spécifiques Ac.S17 et Ac.GFP pendant une demi-journée. Pour cela, l'Ac.S17 vont être préalablement nettoyés grâce à un extrait protéique d'une plantule délétée de la protéine GrxS17 (1μL d'extrait pour 1μL d'anticorps pendant une heure). La composition de la solution d'incubation sera différente selon que ce soit la membrane destinée à l'Ac.S17 ou Ac.GFP.

Ainsi pour la membrane destinée à recevoir l'Ac.S17, 0,1% de lait en poudre est ajouté (0,02g pour 20mL de TBS-T) et 5% pour celle recevant l'Ac.GFP (1g pour 20mL de TBS-T).

Une fois les membranes incubées, elles sont rincées quatre fois dix minutes au TBS-T. Elles seront ensuite baignées pendant une heure dans une solution contenant les anticorps secondaires : 50 mL de TBS-T + 5% lait + 2µL d'anticorps anti-souris pour la GFP et 50mL de TBS-T + 0,1% de lait + 2µL d'anticorps anti-lapin pour la S17. Enfin elles sont révélées grâce à un kit de chimioluminescence.

### III.D PCR (Polymerase Chain Reaction) :

#### ***III.D.1 Extraction de l'ADN***

L'ADN est extrait à partir d'une feuille de plante appartenant aux lignées Wt, ΔS17, 1, 12, 18, 20, 22, 25, 29, avec deux plantes différentes testées pour chaque lignées. Dans chaque tube, se trouve 200 µL du tampon d'extraction suivant : 2mL de Tris HCl 1M + 2,1mL NaCl + 0,5mL EDTA 0,5M + 250µL de SDS + 4,75mL d'eau extra pure. Les feuilles sont broyées à l'aide du broyeur Silamat S6 par des billes de verres de 2mm (une dizaine par tube) pendant 2 fois 10 secondes à 4500 T/min, le mélange est ensuite chauffé à 65°C dans un bain sec pendant une minute et vortexé. Les tubes sont ensuite centrifugés deux minutes à 13000 rpm afin de récupérer 150µL de surnageant. 200µL d'isopropanol 100% sont rajoutés. Le mélange est incubé pendant une minute. Il est ensuite centrifugé cinq minutes à 13000 rpm et le surnageant est éliminé. Le culot est lavé dans 500µL d'éthanol 70% et repassé à la centrifugeuse une minute à 13000 rpm. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot séché par le vide. Enfin il est resuspendu dans 50µL de T.E. (Tris 10mM + EDTA 1mM).

#### ***III.D.2 Mix PCR et cycle d'amplification***

2 types de couples de primers vont être préparés. L'un contiendra 0,2µL d'amorce S17-5' + 0,2µL d'amorce S17-3' (Mix1) par tube. L'autre sera composé de 0,2µL d'amorce S17-5' + 0,2µL d'amorce LBA1 (amorce spécifique du T-DNA) (Mix2) par tube. Les deux mix ont une base commune (pour une PCR) : 8,1µL d'eau milli-Q + 2,5µL de tampon + 0,25µL DNTP + 0,25µL de TAQ + 1µL d'extrait. Le cycle d'amplification par PCR est le suivant : 95°C pendant 3 min, suivi de 41 cycles composés de 3 phases, 95°C pendant 30s, puis 55°C pendant 45s et 72°C pendant 45s, puis deux cycles 5 min chacun à 72°C et 25°C respectivement.



### **III.D.3 Gel, migration et lecture**

Les échantillons (7µL) sont déposés sur un gel d'agarose à 1% W/V dans du TBE : 10,78 g de Tris + 5,5 g d'acide borique + 0,58 g d'EDTA QSP 1L d'eau. Le GelRed (10mM) est incorporé dans le gel fondu. La migration s'effectue jusqu'à la sortie du gel du colorant, puis la lecture est réalisée sur un banc U.V. avec une caméra d'acquisition.

## **IV Résultats :**

### **IV.A Vérification de la complémentation et de la localisation des différentes constructions**

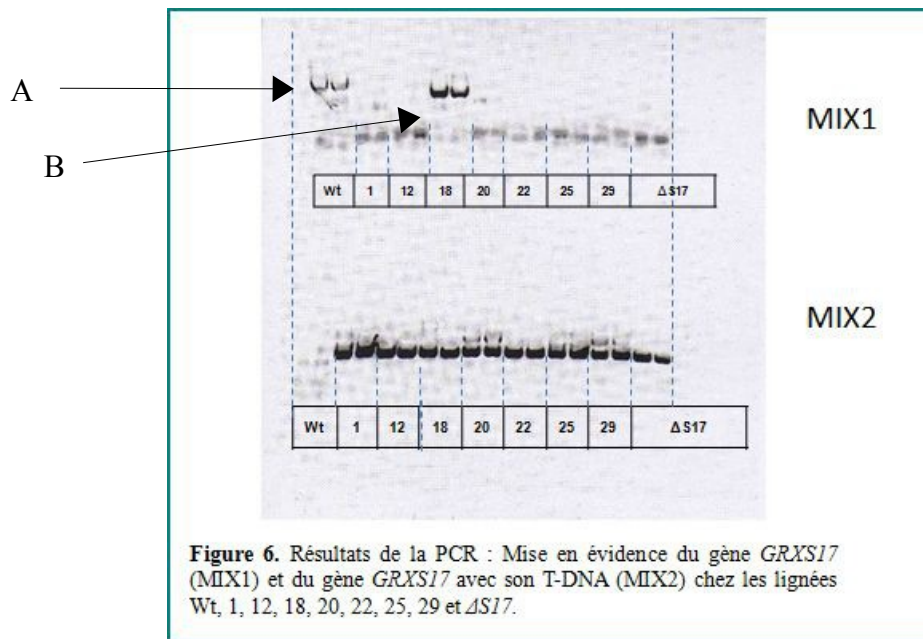
Toutes les lignées complémentées sont hétérozygotes et de ce fait toutes les plantes utilisées proviennent de graines sélectionnées sur milieu hygromycine pour éliminer les graines non transformées.

#### **IV.A.1 Génotypage : vérification du fond génétique *grxs17***

Le schéma suivant présente les couples d'amorces utilisés pour l'amplification de la GrxS17.



Le couple d'amorces MIX1 permet de mettre en évidence la présence du gène *GRXS17*. Celui-ci est logiquement présent (Figure 6. bande A) dans la lignée sauvage (WT) et absent dans les autres lignées puisqu'elles sont homozygotes. Dans la lignée 18, une bande de taille inférieure (Figure 6. bande B) apparaît, elle représente la présence du gène *GRXS17* apporté lors de la complémentation. Le couple d'amorces MIX2 permet de mettre en évidence le gène *GRXS17* avec son T-DNA c'est à dire le gène K.O. Ici toutes les lignées sauf celle sauvage présentent normalement cette amplification. La lignée WT est donc bien sauvage et les autres sont K.O. homozygotes pour *grxs17*.

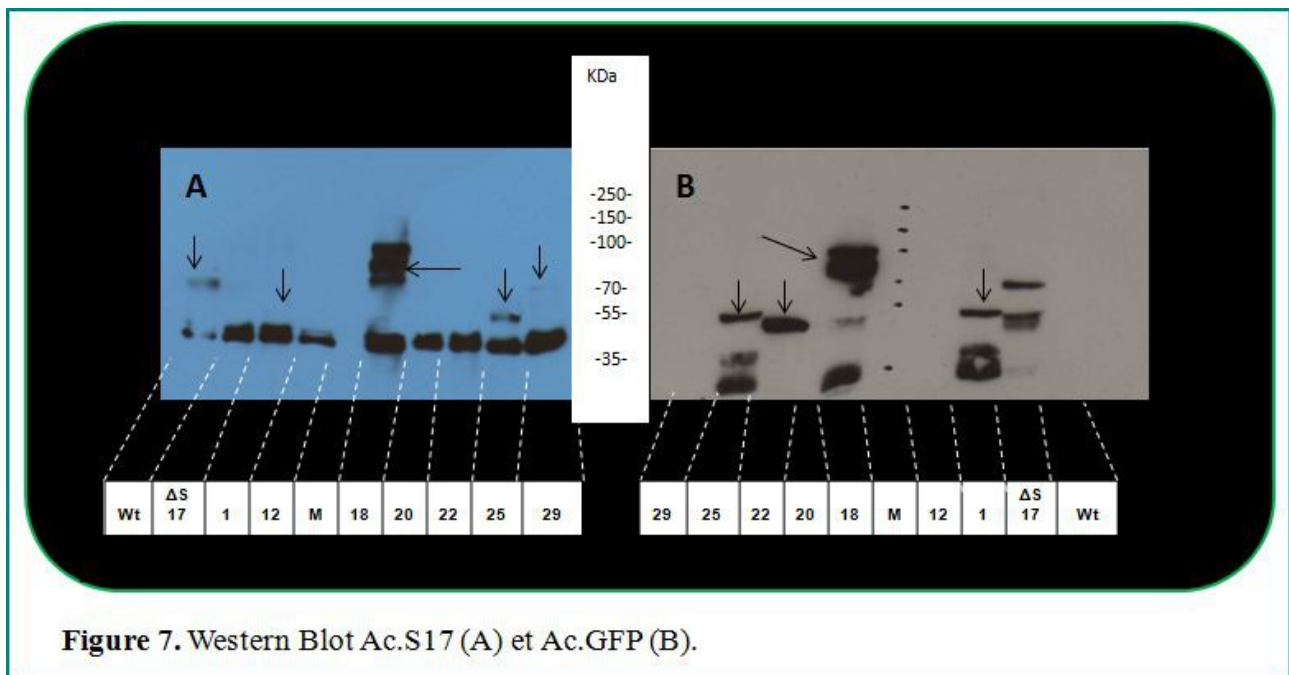


#### IV.A.2 Western-Blot :

Grâce à cette technique, une vérification des poids des protéines attendues pourra être réalisé. En effet, on attend les poids suivants :

| Lignées                 | Wt | 1  | 12 | 18 | 20 | 22 | 25 | 29 | $\Delta S17$   |
|-------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----------------|
| Poids moléculaire (Kda) | 53 | 56 | 39 | 80 | 56 | 39 | 44 | 56 | Témoin négatif |

Nous obtenons donc deux Western Blot présentés en figure 7.



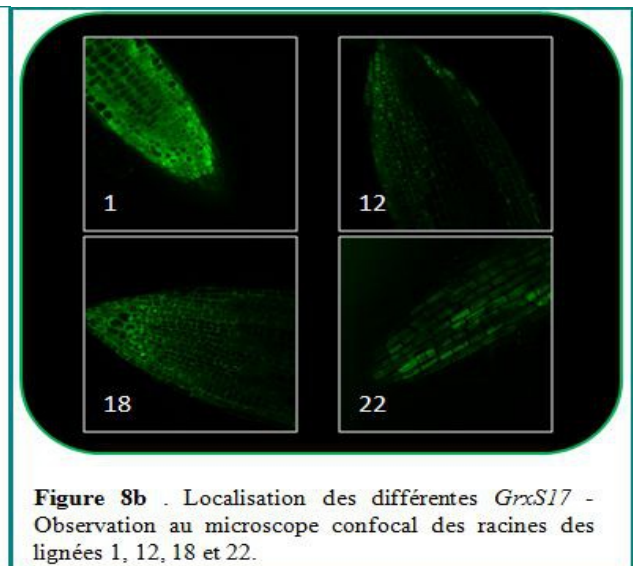
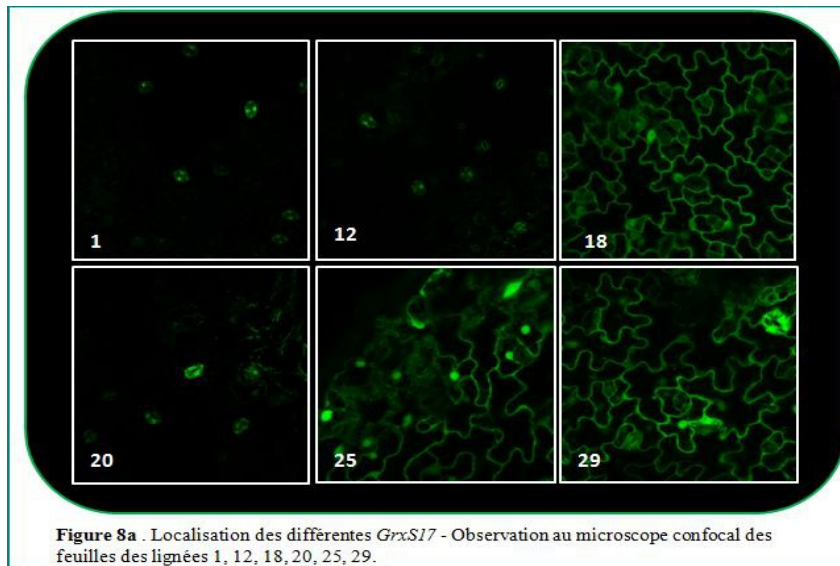
Le tableau suivant est un récapitulatif des résultats des deux Western Blot.

| Lignées      | Ac.S17 | Normalité | Ac.GFP | Normalité |
|--------------|--------|-----------|--------|-----------|
| Wt           | +      | ok        | -      | ok        |
| $\Delta$ S17 | -      | ok        | -      | ok        |
| 1            | +      | ok        | +      | ok        |
| 12           | -      | ok        | -      | non       |
| 18           | +      | ok        | +      | ok        |
| 20           | -      | non       | -      | non       |
| 22           | -      | ok        | +      | ok        |
| 25           | +      | ok        | +      | ok        |
| 29           | +      | ok        | -      | non       |

On peut voir qu'il y a des anomalies. En effet la protéine de la lignée 12 n'est pas reconnue par les deux anticorps. Ceci est normal pour l'Ac.S17 vu que cette protéine est absente de la plante, mais c'est anormal qu'elle ne soit pas reconnue par l'Ac.GFP car la grxs14 est couplée à la GFP. De même la protéine de la lignée 20 n'est reconnue par aucun anticorps. La protéine de la lignée 29 n'est reconnue qu'avec l'Ac.S17 et pas avec l'Ac.GFP ce qui est anormal. Ces erreurs sont vraisemblablement dues à une trop faible expression de ces protéines dans la plante ou à des erreurs de manipulation. Concernant la lignée 18, il apparaît suivant les anticorps 2 à 3 bandes ce qui n'est pas normal. En effet, seule la deuxième bande en partant du haut (80kDa) correspond à la protéine. Les autres sont vraisemblablement des détections aspécifiques, de même que toutes les bandes en bas des deux gels (aux alentours de 40kDa).

#### ***IV.A.3 Microscopie confocale :***

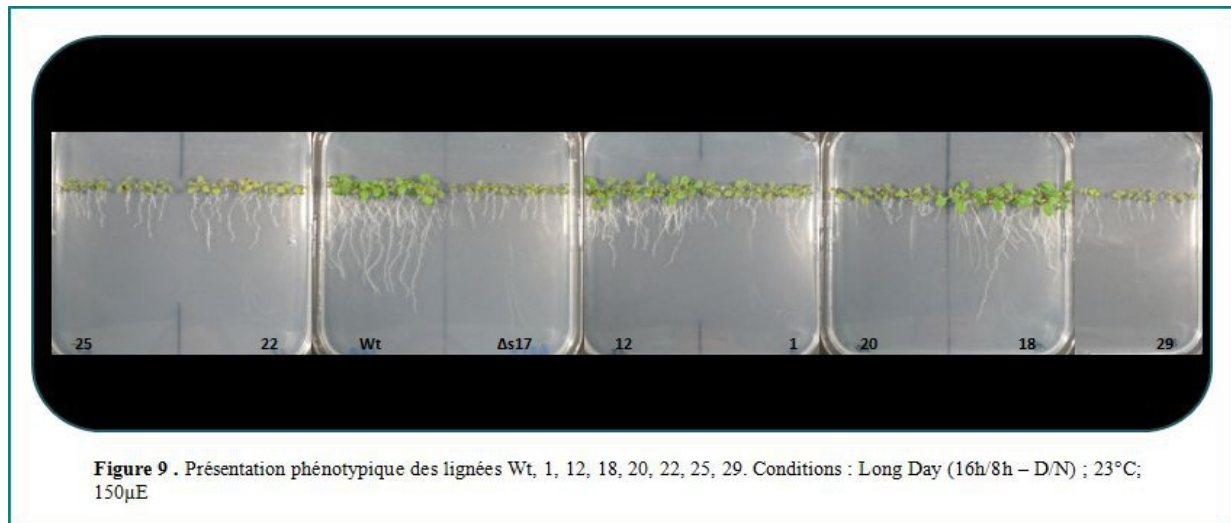
Cette technique permet de révéler la localisation cellulaire des protéines d'intérêts fusionnées à la GFP. Les résultats sont visibles sur la figure 8a et b. La glutarédoxine S14 tronquée de son peptide d'adressage (lignées 12) est visible dans le noyau et vraisemblablement dans le cytosol bien que le signal soit très faible. Ce résultat semble cohérent pour la localisation cytosolique puisque le fait de ne plus posséder son peptide d'adressage fait qu'elle n'est plus reconnue par la cellule comme protéine chloroplastique mais cytosolique. Par contre la localisation nucléaire est plus surprenante puisque cette protéine ne possède pas a priori ce type de localisation avec son peptide d'adressage qui est chloroplastique (Bandyopadhyay *et al.* 2008). Les grxS17 mutées et tronquées sont quant à elles trouvées dans le cytosol et le noyau comme la protéine pleine longueur.



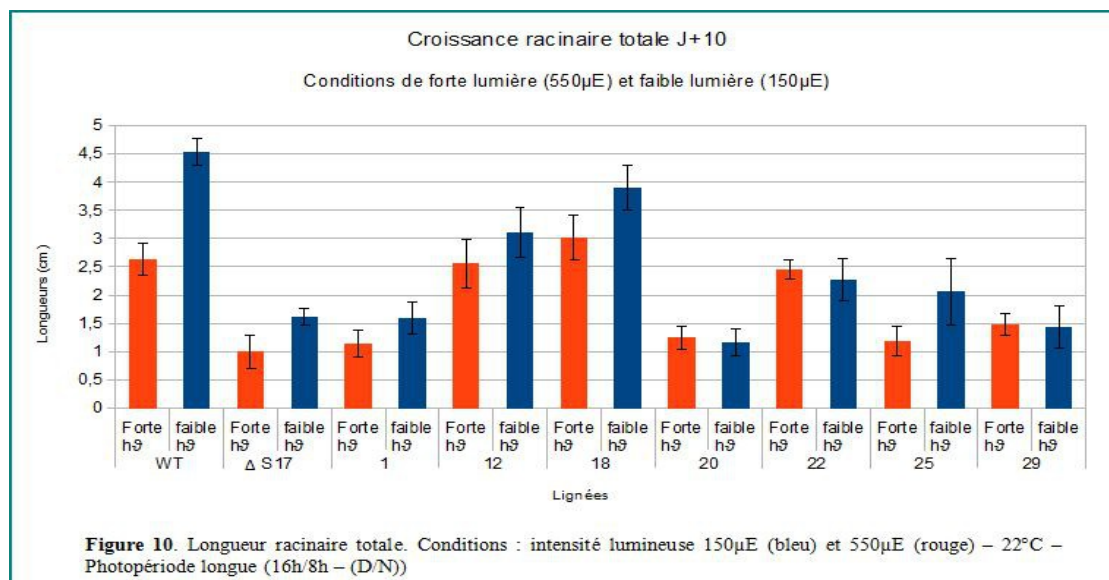
#### IV.B Le facteur lumière impliqué dans le développement du méristème racinaire :

##### *IV.B.1 Influence de l'intensité lumineuse :*

Les phénotypes obtenus en faible intensité 150  $\mu$ E, intensité favorable à la croissance d'*Arabidopsis thaliana*, sont présentés en Figure 9.



C'est en mesurant au dixième jours la longueur de la racine de chaque plantules que l'on obtient les graphiques présentés en Figure 10.

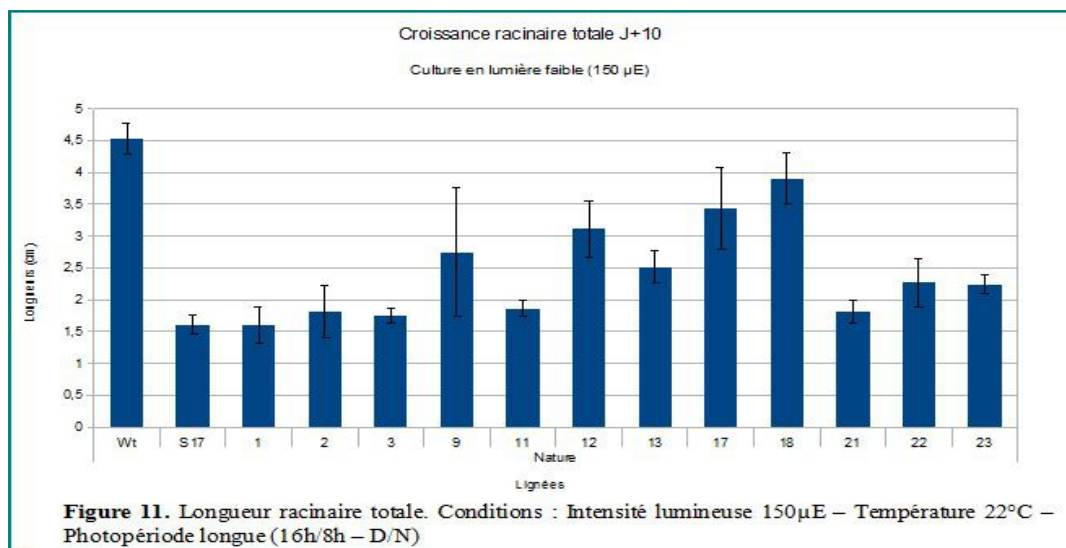


Le tableau ci-dessous présente les ratios entre les longueurs des racines du mutant  $\Delta$ S17 par rapport au sauvage en condition de faible et forte lumière.

| Tableau 2. Ratios des longueurs racinaires en forte et faible lumière de $\Delta$ S17/Wt |          |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----------|
|                                                                                          | Forte h9 | faible h9 |
| <b>Ratio longueur racinaire <math>\Delta</math>S17/Wt</b>                                | 0.38     | 0.31      |

Ainsi, on peut remarquer que plusieurs lignées (Wt, S17, 18 et 25) sont significativement sensibles à la différence d'intensité lumineuse. En effet, la plante présente une racine 40% plus grande en faible lumière qu'en forte lumière pour le Wt, 37% pour le mutant, 25% pour la lignée 18 et 45% pour la lignée 25 (condition stressante). Cette différence n'est pas observée pour les lignées 1, 12, 20, 22 et 29. De plus, on remarque qu'à forte intensité lumineuse, la lignée 12 (GrxS14 sans peptide d'adressage), la 22 (GrxS14 mutée) et la 18 (pleine longueur) complètent bien l'absence de la protéine sauvage. Par contre en faible lumière, seule la lignée 18 complémente totalement le phénotype racinaire, les complémentations 12 et 22 sont partielles, et les autres sont inefficaces. De ce fait, il apparaît que les domaines 1 et 2 de la GrxS17 ne jouent pas ou peu de rôle dans la fonction racinaire de la protéine. Par contre, le quatrième domaine présent sur la protéine pleine longueur et son équivalent sur la GrxS14 joue un rôle important dans la complémentation.

A la vue de cette première série d'expérience, nous avons choisi la condition où les différences sont les plus importantes entre sauvage et mutant c'est à dire à faible intensité lumineuse. Afin de vérifier ces résultats, la même expérience a été menée, mais avec cette fois trois lignées indépendamment obtenues pour chaque construction (Figure 11). Ainsi, les lignées 1-2-3 possèdent la même construction, de même que 9-11-12, 13-17-18 et 21-22-23.



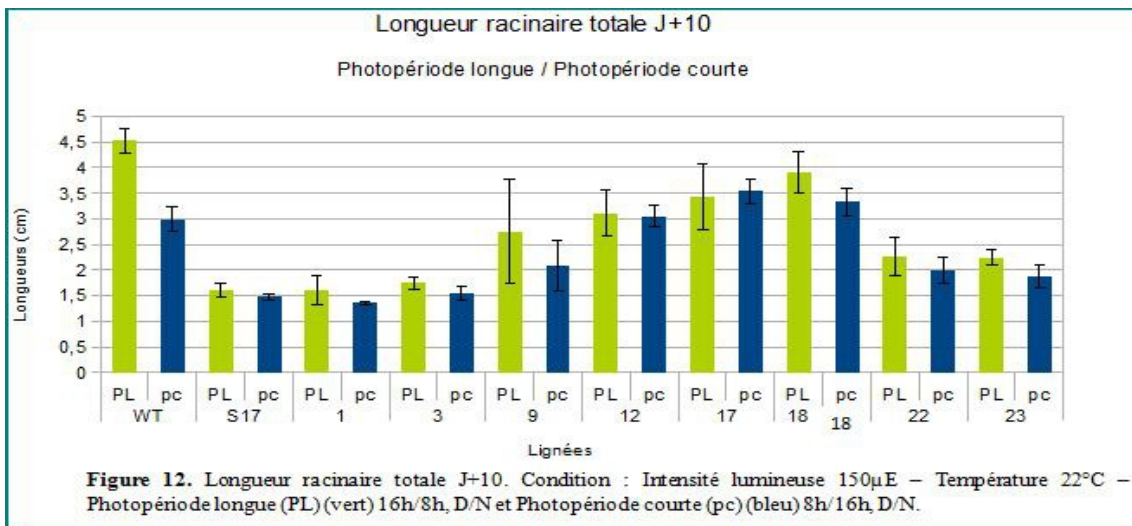
On s'aperçoit tout d'abord que les lignées présentant la même construction sont hétérogènes entre elles. En effet, on s'aperçoit que la construction GrxS14 sans peptide d'adressage (lignées 9, 11 et 12) présente des longueurs racinaires différentes, ce qui permet de dire qu'elles ne sont pas équivalentes en terme de niveau de complémentation. Les mêmes observations sont faites pour les constructions de la GrxS17 pleine longueur (lignées 13, 17 et 18). On pourrait supposer que la protéine est moins bien exprimée chez certaines plantes. Concernant les lignées 1, 2 et 3 (constructions GrxS17 tronquée, domaine 1 et 2) et les constructions GrxS14 mutées (lignées 21, 22 et 23) elles apparaissent plus homogènes. Cette expérience nous montre qu'en fonction des lignées l'hétérogénéité de complémentation est présente, nous avons donc choisi 2 lignées sur les trois testées pour chaque construction pour la suite des expérimentations.

Ce graphique semble confirmer l'ensemble des résultats précédents pour les lignées qui complémentent le mieux.

#### ***IV.B.2 Influence de la photopériode :***

La figure 12 présente la comparaison de la longueur racinaire totale à J+10 entre la photopériode longue et courte à faible intensité lumineuse.





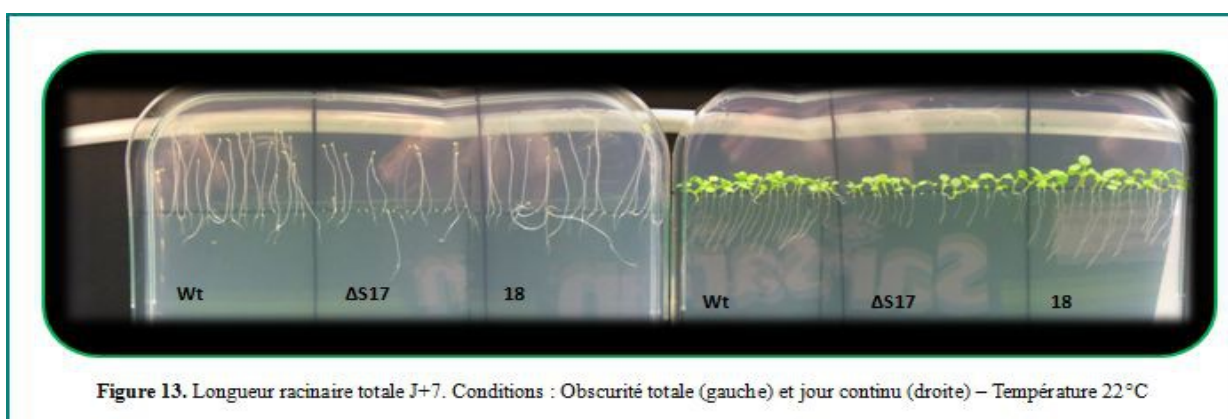
Le tableau ci-dessous présente les rapports entre les longueurs racinaires à photopériode courte et longue du Wt sur  $\Delta S17$  :

| Tableau 3. Ratio des longueurs de $\Delta S17$ /Wt en photopériode longue et courte |      |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------|-----|
|                                                                                     | PL   | pc  |
| <b>Ratio longueur racinaire <math>\Delta S17</math>/Wt</b>                          | 0.35 | 0.5 |

Dans cette manipulation deux lignées de chaque complémentation qui semblaient compléter le mieux l'absence de la protéine sauvage dans l'expérience précédente sont utilisées. On s'aperçoit que la photopériode courte est un facteur limitant pour la plante sauvage puisque la croissance racinaire diminue de 33%. Pour les autres lignées, cette condition n'a pas d'impact significatif sur le développement racinaire.

D'après le tableau des ratios, on s'aperçoit qu'il y a une différence de rapport entre le mutant et le sauvage qu'ils soient à photopériode longue (0,35) ou courte (0,5). On pourrait en déduire que la photopériode est impliquée dans la régulation de la protéine grxS17. De plus, nous observons que la lignée 18 ne semble pas répondre à la photopériode contrairement au sauvage. Ces deux observations tendent à démontrer que l'expression de la protéine GrxS17 est régulée par la photopériode et d'autant plus que celle-ci est longue.

La figure 13 présente quant à elle, les lignées sauvages,  $\Delta S17$  et la lignée 18 dans deux conditions différentes : l'une à l'obscurité totale, l'autre en jour continu (éclairé 24h/24 à 60μE). Seule la lignée 18 a été choisie car c'est celle qui présentait à la fois un phénotype visible lors du changement de photopériode et complétait d'autre part le sauvage.



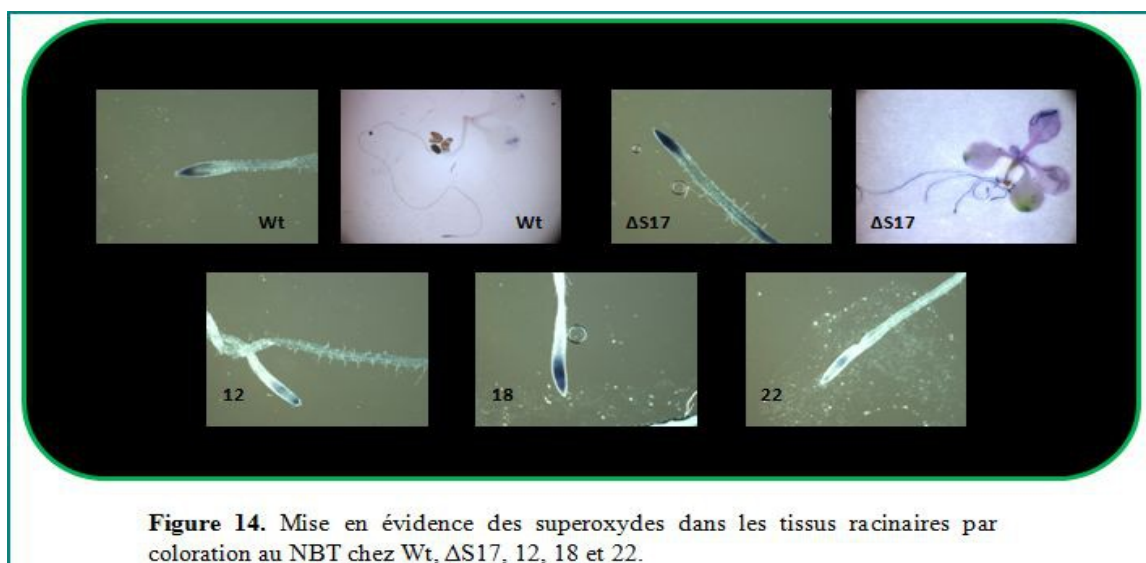


On s'aperçoit que l'hypocotyle est démesuré chez les plantes poussant à l'obscurité comparé à ceux cultivés en jour continu. La longueur racinaire est en moyenne identique quelque soit la lignée pour les plantes ayant germées en condition obscure. Les plantules cultivées en lumière continue, quant à elles présentent le même phénotype que les résultats précédents.

#### IV.C Cytologie :

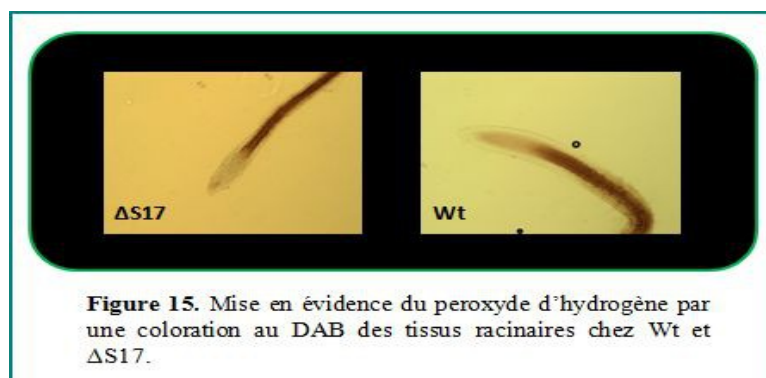
##### ***IV.C.1 Mise en évidence des espèces oxygénées réactives :***

La figure 14 présente les lignées sauvages,  $\Delta S17$ , 12, 18 et 22 cultivées à faibles lumière, soumises à une coloration au NBT. Ces lignées ont été sélectionnées car elles présentent les complémentations les plus efficaces (Figure 11). On observe peu de différences entre les lignées au niveau du méristème racinaire principal. Cependant une différence plus nette est observée au niveau de la racine elle même, où le mutant présente une coloration plus intense que pour toutes les autres lignées. Ceci tendrait à démontrer que les complémentations 12, 18 et 22 jouent un rôle dans la détoxification des superoxydes.



**Figure 14.** Mise en évidence des superoxydes dans les tissus racinaires par coloration au NBT chez Wt,  $\Delta S17$ , 12, 18 et 22.

La figure 15 présente la coloration des plantules Wt et  $\Delta S17$  au DAB mettant ainsi en évidence la présence d'  $H_2O_2$ . Seules ces plantes ont été colorées, car elles ne présentaient pas de différences de coloration et donc pas de différences d'accumulation de  $H_2O_2$  dans les tissus.

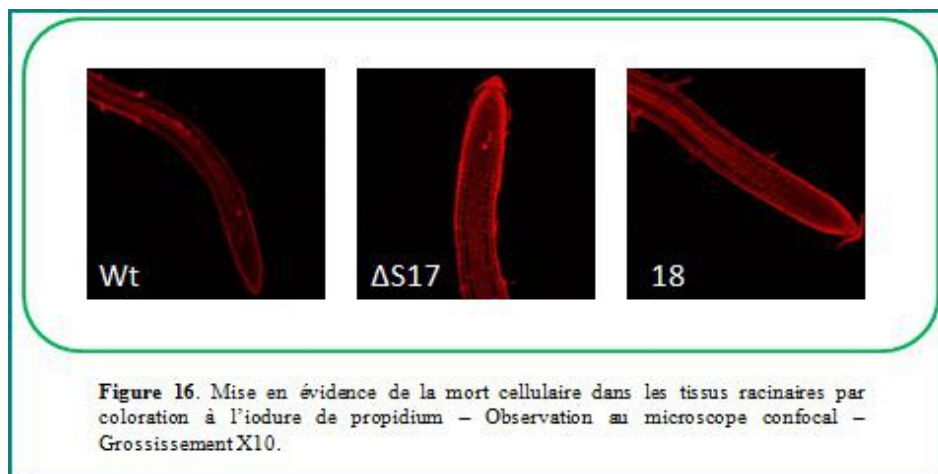


**Figure 15.** Mise en évidence du peroxyde d'hydrogène par une coloration au DAB des tissus racinaires chez Wt et  $\Delta S17$ .

#### **IV.C.2 Mise en évidence de la mort cellulaire et de la taille des méristèmes**

##### **racinaires :**

C'est par une coloration à l'iodure de propidium que la mort cellulaire au niveau du méristème cellulaire a pu être mise en évidence (Figure 16).



Les cellules mortes sont révélées par la présence d'une tâche rouge intense. Elles ont été comptées chez 6 individus par lignée pour environ une centaine de cellule présentes dans chaque méristèmes. Le nombre moyen de cellules mortes par méristème est donné dans le tableau qui suit :

| Lignées                                             | Wt              | $\Delta S17$    | 18 |
|-----------------------------------------------------|-----------------|-----------------|----|
| <b>Nombre moyen de cellules morte par méristème</b> | $0,66 \pm 1,21$ | $0,83 \pm 0,75$ | 0  |

Les mesures ne montrent pas de différences significatives entre les lignées. Cependant, de part une manipulation très délicate du matériel (tissus fragiles où le moindre choc endommage et fait entrer le colorant dans les cellules, ce qui fausse les résultats) il est possible qu'une différence soit observable. Il aurait fallu être plus prudent quant à la mise en place des lames et prendre plus de plantules.

Les longueurs moyennes des méristèmes racinaires pour les lignées sauvages,  $\Delta S17$  et 18 sont données dans le tableau suivant :

|                                                                    |               |               |               |
|--------------------------------------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>Longueur de la zone d'élongation (<math>\mu\text{m}</math>)</b> | $767 \pm 111$ | $835 \pm 213$ | $761 \pm 226$ |
| <b>Longueur du méristème apical (<math>\mu\text{m}</math>)</b>     | $321 \pm 31$  | $275 \pm 22$  | $299 \pm 36$  |

On s'aperçoit que les plantes sauvages ainsi que la lignée 18 (pleine longueur) paraissent avoir une zone d'élongation plus faible (de la pointe du méristème jusqu'au niveau de la zone d'apparition des racines secondaires) que le mutant, ainsi qu'un méristème racinaire (zone de cellules souches indifférenciées) plus long. Or nous ne pouvons pas le confirmer du fait du recoupement des écarts types entre eux. Pour vérifier ces observations cette manipulation serait à refaire avec une nombre plus important de plantes.

## **V Discussion et conclusion :**

Le but de ce stage était d'étudier les fonctions d'une glutarédoxine GrxS17 à cœur Fe-S sur le développement racinaire. Pour cela, un mutant d'*Arabidopsis* (*grxs17*) dans lequel la protéine GrxS17 est inactive a été étudié. Grxs17 est une protéine à multidomaines: un domaine Trx et trois domaines Grx. Nous avons tenté de comprendre le rôle de ces différents domaines dans la fonction racinaire de la protéine en réalisant différentes constructions permettant d'exprimer des versions tronquées de GrxS17. Des versions de GrxS17 mutées dans son site actif ont également été étudiées. Enfin, la capacité d'une protéine analogue à GrxS17 (GrxS14) à compléter la fonction de GrxS17 dans le mutant *grxs17* a également été étudiée.

La première partie de ce travail a consisté à vérifier les différentes constructions complémentées. Trois niveaux de vérification ont été effectués : génomique, expression protéique et localisation intracellulaire. Nous avons commencé par vérifier le génotype de chacune des lignées.

L'approche de vérification par PCR confirme que le mutant  $\Delta S17$  et toutes les lignées complémentées sont dans un fond mutant KO pour GRXS17 et seule la lignée sauvage présente une copie du gène (Figure 8, MIX1). De plus seules les lignées sauvages et 18 (complémentée par la Grx pleine longueur) possèdent une copie du gène de la GRXS17. La taille diffère légèrement dans les deux cas puisque nous avons dans le cas de la lignée sauvage une copie du gène version ADN génomique et dans l'autre cas une copie du gène version ADNc fusionné au gène de la GFP. Nous avons ensuite vérifié au niveau de l'expression par Western Blot. Nous pouvons remarquer tout d'abord que la lignée Wt est détectée par l'Ac.S17 ce qui est normal. En effet, la plante sauvage possède cette protéine. Au contraire dans le mutant  $\Delta S17$ , la protéine n'est pas reconnue par l'Ac.S17 ce qui confirme les résultats de la PCR. Ces deux lignées (Wt et  $\Delta S17$ ) ne sont pas reconnues par l'AcGFP. Là encore c'est logique puisque la protéine sauvage n'est pas couplée à la GFP et  $\Delta S17$  ne possède pas de GFP. Plusieurs protéines ont été reconnues par les deux anticorps ce qui est normal (lignées 1, 18 et 25). En effet ces trois lignées possèdent une version tronquée ou complète de la protéine GrxS17 et sont toutes couplées à la GFP. Par contre les lignées 12 et 20 n'apparaissent sur aucun western blot. On pourrait l'expliquer par une absence ou une faible expression de ces deux protéines qui ne sont pas détectées par l'Ac.GFP. La protéine de la lignée 22 est normalement détectée par l'anticorps Ac.GFP et non par celui de la Ac.S17 ce qui peut paraître logique puisque c'est une GRXS14 qui est ici exprimée. La protéine de la lignée 29 est reconnue par l'Ac.S17 ce qui est normal, mais n'est pas reconnue par l'Ac.GFP ce qui n'est pas logique vu qu'elle est couplée à la GFP. Ainsi il apparaît nécessaire de répéter ces expériences pour vérifier ces résultats. Nous avons ensuite étudié l'expression des protéines de fusion GrxS17:GFP par imagerie confocale. L'approche

par microscopie confocale a permis de confirmer l'expression des différentes constructions et de localiser les protéines dans les compartiments cellulaires végétaux. Toutes les protéines de fusion dérivées de Grx17 sont localisées dans les deux compartiments cytosoliques et nucléaires comme la protéine pleine longueur. Il ne semble pas que cette double localisation soient altérées dans les versions tronquées de la protéine ou dans les versions mutées. Pour les constructions avec la GrxS14 (tronquées du peptide d'adressage) nous observons la même chose avec une double localisation cytosol et noyau, bien que l'expression soit relativement faible. Cela pourrait expliquer les résultats du Western Blot où elle n'étaient pas visibles avec l'Ac.GFP. On peut donc affirmer au travers des résultats précédents que les lignées 1, 12, 18, 22, 25 et 29 présentent une expression correcte (plus ou moins importante) et également une localisation identique à celle de la protéine sauvage. Seule l'expression de la GFP dans la lignée 20 n'a pas pu être confirmée. Cependant, nous sommes conscients que du fait de la petite taille des protéines exprimées dans les différentes constructions (39 à 54 kDa) hormis la lignée 18 (GrxS17 pleine longueur = 80 kDa), ces protéines peuvent librement diffuser dans le noyau.

Les mesures de croissance racinaire effectuées sur les plantes mutantes montrent clairement le rôle de GrxS17 dans la croissance de la racine primaire. L'analyse des méristèmes racinaires ont permis de prendre de mesures de longueurs du méristème racinaire et de la zone d'élongation. Il en ressort que le mutant *ΔS17* possède en moyenne un méristème plus petit que les plantes sauvages. Ceci suggère qu'une étape de la division cellulaire est perturbée dans le mutant. Pour confirmer ces résultats, il serait intéressant d'effectuer une analyse plus poussée de la structure du méristème du mutant *ΔS17*, ainsi qu'une analyse de l'activité mitotique du méristème primaire. De plus, nos mesures de la taille de la zone d'élongation suggèrent que celle-ci est légèrement plus grande dans le mutant *ΔS17*, bien que les différences ne soient pas très significatives au regard des écarts types observés.

Par ailleurs, un effet de la mutation *ΔS17* a également été observé sur le méristème apical. Comme nous l'avons observé pour le méristème racinaire, le méristème apical est plus petit et présente une division cellulaire amoindrie. Le développement des ébauches de feuilles se fait également plus lentement. Il semblerait donc que la mutation *ΔS17* a un effet analogue sur les deux méristèmes. De plus, des perturbations des méristèmes floraux ont également été observés. Néanmoins, les phénotypes de développement du méristème apical sont clairement dépendants de la lumière. Des plantes cultivées en photopériode courte ne présentent pas de phénotype alors que le phénotype est très clair en photopériode longue et forte lumière. Par contre, pour le développement racinaire, le phénotype est observé dans toutes les conditions de croissance étudiées, néanmoins à des niveaux plus ou moins marqués. Nos études phénotypiques à partir de différentes conditions

lumineuses permettent d'émettre des hypothèses quant au lien qui existe entre GrxS17 et la lumière. Premièrement, d'après la mesure des ratios entre les deux intensités lumineuses (Tableau 2) qui sont peu différentes, on peut émettre l'hypothèse que la fonction de la protéine GrxS17 n'est pas directement dépendante de l'intensité lumineuse. Deuxièmement, pour la photopériode (Figure 12), les ratios (Tableau3) sont relativement différents entre la photopériode longue (0,35) et celle courte (0,5). Nous pouvons en déduire que la photopériode est impliquée dans la régulation de la protéine GrxS17. Ceci est corroboré par les croissances en jour continu où le phénotype est toujours observé et en absence de lumière où le phénotype disparaît. De plus, nous observons que la lignée 18 ne semble pas répondre à la photopériode contrairement au sauvage (Figure 12). Ces observations tendent à démontrer que l'expression de la protéine GrxS17 est régulée par la photopériode.

Concernant le rôle des différents domaines de la protéine GrxS17, il apparaît que les domaines 1 et 2 de la GrxS17 ne jouent pas ou peu de rôle dans la fonction racinaire de la protéine. En effet, que l'on soit à faible ou forte intensité lumineuse et à courte ou longue photopériode, seules les lignées 12 (GrxS14 tronqué) et 18 (GrxS17 pleine longueur) sont capables de compléter le mutant. Seul, le quatrième domaine présent sur la protéine pleine longueur et son équivalent sur la GrxS14 semble jouer un rôle dans la complémentation. Pour confirmer cela, il aurait fallu pouvoir faire d'autres complémentations avec des plantes contenant le quatrième domaine uniquement de GrxS17 ou couplées avec l'un des trois autres domaines.

Concernant le rôle éventuel des cœurs fer-soufre, les lignées 12 et 22 ne nous permettent pas d'émettre une hypothèse quant au rôle éventuel du cœur. En effet, en fonction des conditions d'intensité lumineuse ou de photopériode les différents niveaux de complémentation du phénotype ne sont pas retrouvés.

Les études cytologiques ont permis de mettre en évidence la présence d'EOR dans la racine. Les analyses au DAB ne montrent pas de différence entre la lignée sauvage et mutée. Celles faites au NBT révèlent par contre une accumulation de superoxydes dans toute la racine chez le mutant, contrairement aux autres plantes où seule la pointe racinaire est colorée. Ainsi, on pourrait expliquer que la GrxS17 joue un rôle direct ou indirect dans la détoxification des radicaux libres dans les tissus. Par contre, la présence de ces EOR n'endommagerait pas les cellules du méristème. En effet, d'après la figure 16, qui met en évidence la mort cellulaire, il n'y a pas de différences entre les différentes lignées. Ce résultat est à confirmer. En effet, cette manipulation a été faite en fin de stage et les plantes pour cette étude n'étaient pas assez nombreuses pour tirer de telles conclusions. L'expérience est donc à renouveler sur un nombre important de plantes mais aussi sur plusieurs lignées.

Nous pouvons donc dire d'après le travail effectué que l'intensité lumineuse n'affecte pas la

fonction de la glutarédoxine S17, à l'inverse de la photopériode. Ces résultats apparaissent comme particulièrement intéressants puisque l'effet de la lumière n'est pas de même nature que celui observé sur le méristème apical. La protéine est donc nécessaire au développement de la racine. Une hypothèse se dégage quant à l'importance du quatrième domaine dans le bon fonctionnement de celle-ci. En effet sa seule présence tendrait à pallier l'absence de la protéine complète ce qui laisse à penser que les autres sites sont moins impliqués dans la fonction de la protéine au niveau du méristème racinaire. A l'inverse, les sites 1 et 2 apparaissent comme moins importants dans le rôle de la protéine. Pour vérifier ces hypothèses une conception de mutants *ΔS17* présentant les domaines (1-2-3), (1-2-4), (1-3), (1-4), (2-3), (2-4) et (3-4) serait judicieuse. Les travaux présentés ici ont donc permis de confirmer les observations préliminaires faites par le laboratoire de Cadarache quant au rôle de la protéine dans le développement racinaire. Ils auront permis d'apporter des éléments de réponse quant à sa caractérisation. Enfin les manipulations menées auront eu aussi pour but de trouver des conditions de culture optimales en lumière pour la mise en évidence du phénotype et pour la réalisation de futures recherches sur les fonctions de la glutarédoxine GrxS17.

## **Références :**

- Balk, J., and Lohréaux, S. (2005). Biogenesis of iron-sulfur proteins in plants. *Trends Plant Sci.* 10, 324–331.
- Bandyopadhyay, S., Gama, F., Molina-Navarro, M.M., Gualberto, J.M., Claxton, R., Naik, S.G., Huynh, B.H., Herrero, E., Jacquot, J.P., Johnson, M.K., et al. (2008). Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe–2S] clusters. *The EMBO Journal* 27, 1122–1133.
- Beinert, H., and Kiley, P.J. (1999). Fe-S proteins in sensing and regulatory functions. *Curr Opin Chem Biol* 3, 152–157.
- Bennett, M.D., Leitch, I.J., Price, H.J., and Johnston, J.S. (2003). Comparisons with *Caenorhabditis* (approximately 100 Mb) and *Drosophila* (approximately 175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be approximately 157 Mb and thus approximately 25% larger than the *Arabidopsis* genome initiative estimate of approximately 125 Mb. *Ann. Bot.* 91, 547–557.
- Cheng, N.-H., and Hirschi, K.D. (2003). Cloning and characterization of CXIP1, a novel PICOT domain-containing *Arabidopsis* protein that associates with CAX1. *J. Biol. Chem.* 278, 6503–6509.
- Cheng, N.-H., Liu, J.-Z., Brock, A., Nelson, R.S., and Hirschi, K.D. (2006). AtGRXcp, an *Arabidopsis* chloroplastic glutaredoxin, is critical for protection against protein oxidative damage. *J. Biol. Chem.* 281, 26280–26288.
- Cheng, N.-H., Liu, J.-Z., Liu, X., Wu, Q., Thompson, S.M., Lin, J., Chang, J., Whitham, S.A., Park, S., Cohen, J.D., et al. (2011). *Arabidopsis* monothiol glutaredoxin, AtGRXS17, is critical for temperature-dependent postembryonic growth and development via modulating auxin response. *J. Biol. Chem.* 286, 20398–20406.



- Couturier, J., Jacquot, J.-P., and Rouhier, N. (2009). Evolution and diversity of glutaredoxins in photosynthetic organisms. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 2539–2557.
- Dietz, K.-J. (2003). Plant peroxiredoxins. *Annu Rev Plant Biol* 54, 93–107.
- Johnson, D.C., Dean, D.R., Smith, A.D., and Johnson, M.K. (2005). Structure, Function, and Formation of Biological Iron-Sulfur Clusters. *Annual Review of Biochemistry* 74, 247–281.
- Lemaire, S.D. (2004). The glutaredoxin family in oxygenic photosynthetic organisms. *Photosyn. Res.* 79, 305–318.
- Meyer, A.J. (2008). The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *J. Plant Physiol.* 165, 1390–1403.
- Meyer, Y., Riondet, C., Constans, L., Abdelgawwad, M.R., Reichheld, J.P., and Vignols, F. (2006). Evolution of redoxin genes in the green lineage. *Photosyn. Res.* 89, 179–192.
- Morel, M., Kohler, A., Martin, F., Gelhaye, E., and Rouhier, N. (2008). Comparison of the thiol-dependent antioxidant systems in the ectomycorrhizal *Laccaria bicolor* and the saprotrophic *Phanerochaete chrysosporium*. *New Phytologist* 180, 391–407.
- Mühlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N., and Lill, R. (2003). Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *Embo J.* 22, 4815–4825.
- Pugh, R.A., Honda, M., Leesley, H., Thomas, A., Lin, Y., Nilges, M.J., Cann, I.K.O., and Spies, M. (2008). The iron-containing domain is essential in Rad3 helicases for coupling of ATP hydrolysis to DNA translocation and for targeting the helicase to the single-stranded DNA-double-stranded DNA junction. *J. Biol. Chem.* 283, 1732–1743.
- Rodríguez-Manzanique, M.T., Ros, J., Cabisco, E., Sorribas, A., and Herrero, E. (1999). Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 19, 8180–8190.
- Rodríguez-Manzanique, M.T., Tamarit, J., Bellí, G., Ros, J., and Herrero, E. (2002). Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol. Biol. Cell* 13, 1109–1121.
- Rouhier, N. (2010). Plant glutaredoxins: pivotal players in redox biology and iron-sulphur centre assembly. *New Phytologist* 186, 365–372.
- Rouhier, N., Gelhaye, E., and Jacquot, J.-P. (2004). Plant glutaredoxins: still mysterious reducing systems. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 1266–1277.
- Theologis, A., Ecker, J.R., Palm, C.J., Federspiel, N.A., Kaul, S., White, O., Alonso, J., Altafi, H., Araujo, R., Bowman, C.L., et al. (2000). Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 816–820.
- Xing, S., Rosso, M.G., and Zachgo, S. (2005). ROXY1, a member of the plant glutaredoxin family, is required for petal development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 132, 1555–1565.

## **Résumé**

Les glutarédoxines sont majoritairement de petites oxydoréductases. Elles ont à ce jour deux rôles démontrés : la réduction de ponts disulfures intra ou intermoléculaires et l'assemblage de cœurs Fer-Soufre. Le travail présenté ici a pour but de caractériser le rôle d'une famille de glutarédoxines de type CGFS chez les plantes et plus précisément le rôle de la GRXS17 chez *Arabidopsis thaliana*. Plus précisément, le présent sujet d'étude porte sur l'analyse du rôle de cette protéine dans le développement du méristème racinaire dans des conditions de la variabilité du facteur lumière. Pour répondre à cette problématique, différentes approches sont utilisées. En effet, dans un premier temps des plantes comportant des protéines mutées couplées à la GFP sont créées par mutagenèse dirigée. Elles seront ensuite analysées par des techniques de biologie moléculaire (PCR, Western-Blot) et de microscopie confocale afin de vérifier l'expression des protéines. Enfin des études phénotypiques et cytologiques (mise en évidence des espèces oxygénées réactives et de la mort cellulaire) de plantes (cultivées *in vitro* sur milieu MS/2 et *in vivo* dans différentes conditions lumineuses) permettront de faire une analyse et donc de caractériser la protéine d'intérêt. Ces manipulations ont permis d'aboutir à plusieurs résultats. En effet, les techniques moléculaires et d'imagerie confocale ont permis de vérifier la bonne expression des protéines mutées. Enfin les études phénotypiques couplées aux études cytologiques démontrent que la lumière n'influence pas directement le rôle de la GRXS17.