

Notes Académiques de l'Académie d'agriculture de France

Academic Notes of the French Academy of agriculture

Authors

Zongo C, Villegente M, Le Pessot L, Job C, Strub J-M, Van Dorsselaer A, Schaeffer-Reiss C, Bernier F, Berna A, Belghazi M, Jacques MA, Amir H, Burtet-Sarramégna V, Rabier J, Fogliani B, Job D

Title of the work


Analyse protéomique des graines de *Psychotria gabriellae* (Baill.) Guillaumin, une plante endémique de la Nouvelle-Calédonie, en relation avec la tolérance au nickel

Year 2016, Volume 2, Number 7, pp. 1-37

Published online:

29 October 2016,

<https://www.academie-agriculture.fr/publications/notes-academiques/n3af-note-de-recherche-protéomique-de-psychotria-gabriellae-espece>

[Analyse protéomique des graines de *Psychotria gabriellae* \(Baill.\) Guillaumin, une plante endémique de la Nouvelle-Calédonie, en relation avec la tolérance au nickel](#) © 2016 by Zongo C, Villegente M, Le Pessot L, Job C, Strub J-M, Van Dorsselaer A, Schaeffer-Reiss C, Bernier F, Berna A, Belghazi M, Jacques MA, Amir H, Burtet-Sarramégna V, Rabier J, Fogliani B, Job D is licensed under [Attribution 4.0 International](#) 

Note de recherche

Analyse protéomique des graines de *Psychotria gabriellae* (Baill.) Guillaumin, une plante endémique de la Nouvelle-Calédonie, en relation avec la tolérance au nickel

Charly Zongo^{1,§,‡}, Matthieu Villegente^{1,§}, Laurence Le Pessot², Claudette Job², Jean-Marc Strub^{3,4}, Alain Van Dorselaer^{3,4}, Christine Schaeffer-Reiss^{3,4}, François Bernier⁵, Anne Berna⁵, Maya Belghazi⁶, Marie-Agnès Jacques⁷, Hamid Amir¹, Valérie Burtet-Sarramégn^{1,*}, Jacques Rabier⁸, Bruno Fogliani^{1,9,*}, Dominique Job^{2,*}

¹ Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement (LIVE – EA 4243), Université de la Nouvelle-Calédonie, Nouvelle-Calédonie

² Laboratoire mixte CNRS / Université Claude Bernard Lyon 1 / INSA / Bayer CropScience (UMR CNRS 5240), Lyon, France

³ Université de Strasbourg, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC – UMR CNRS 7178), Strasbourg, France

⁴ ProFI: Proteomic French Infrastructure, Strasbourg site (<http://www.profi-proteomics.fr/>)

⁵ Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (UPR CNRS 2357), Strasbourg, France

⁶ Centre d'Analyse Protéomique de Marseille (CAPM), Faculté de Médecine, Marseille, France

⁷ Institut de Recherche en Horticulture et Semences (UMR 1345 IRHS), INRA, AGROCAMPUS-Ouest, Université d'Angers, SFR 4207 QUASAV Beaucauzé, France

⁸ Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale (IMBE, UMR Université Aix Marseille / CNRS 7263 / IRD 237 / Avignon Université), Marseille, France

⁹ Institut Agronomique néo-Calédonien (IAC), « Diversités biologique et fonctionnelle des écosystèmes terrestres », Païta, Nouvelle-Calédonie.

§ Contributions égales

‡ Cet article est dédié à la mémoire de Charly Zongo

* Correspondance : job.dominique@gmail.com ; vandors@unistra.fr ; valerie.sarramegna@univ-nc.nc ; fogliani@iac.nc

Contributions des auteurs :

Conception de l'étude : DJ, BF, VS, AVD

Réalisation des expériences : CZ, MV, LP, CJ, HA, MAJ, JR

Spectrométrie de masse : JMS, AVD, CSR, MB

Production des anticorps : AB, FB

Rédaction de l'article : tous les auteurs, coordination DJ

Abréviations :

ABC, ATP Binding Cassette, cassette de fixation à l'ATP ; BLAST, basic local alignment search tool ; CHAPS, (3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate) ; DTT, 1,4-dithiothréitol ; GLP, Germin-like protein ; HIV, human immunodeficiency virus, virus de

Note de recherche

l'immunodéficience humaine ; HPBP, Human phosphate binding protein ; LC, chromatographie liquide ; Ma, million d'années ; MS, spectrométrie de masse ; ORF, Open Reading Frame, cadre de lecture ouvert ; PCR, Polymerase Chain Reaction, Réaction en chaîne par polymérase ; protéines LEA, Late Embryogenesis Abundant proteins, protéines abondantes de l'embryogenèse tardive ; ROS, reactive oxygen species, espèces réactives oxygénées ; TCA, acide trichloracétique

Résumé

La Nouvelle-Calédonie possède une flore riche et diverse. Sa forte endémicité en plantes vasculaires (75,1 %) résulte en partie de l'origine gondwanienne de la flore et de la forte pression de sélection exercée par les sols ultramafiques, riches en éléments traces métalliques, dont le nickel. Si cet élément fait la richesse de l'archipel par son exploitation minière, cette dernière, ainsi que l'anthropisation du territoire, engendrent une détérioration des écosystèmes. Dans le cadre de la dynamique mondiale de conservation, de protection et de restauration de la biodiversité, il convient de caractériser au mieux la flore néo-calédonienne. Cette caractérisation passe notamment par l'étude des graines de cette flore, puisque ces dernières sont à la fois un des points clés du succès de la conquête de la planète par les plantes et un outil indispensable à la restauration écologique. Notre étude s'est attachée à caractériser par une approche biochimique la biologie des graines d'une plante endémique exceptionnelle, *Psychotria gabriellae*, une des plantes au monde contenant le plus de nickel dans ses feuilles.

L'étude du protéome des graines de *P. gabriellae* (Baill.) Guillaumin a révélé la présence de protéines particulières nommées DING, notamment impliquées dans l'homéostasie d'éléments minéraux via leur interaction avec des transporteurs de type ABC (*ATP-binding cassette*) ou encore par séquestration du phosphore. Leur identification est corrélée avec l'observation d'un gradient de

nickel dans la graine, et une co-localisation du nickel et du phosphore dans la partie externe de l'albumen, visant probablement à protéger l'embryon du caractère toxique de ce dernier (Zongo, 2010). Toutefois l'origine eucaryotique des protéines DING reste mystérieuse du fait de l'absence de gènes codant de telles protéines dans les génomes séquencés d'eucaryotes. Pour répondre à cette question, nous avons cherché à identifier la présence de bactéries dans la graine mature sèche. Plusieurs bactéries endophytes de graine ont été identifiées, mais aucune d'entre elles ne semble produire de protéines DING. Le rôle de ces protéines DING dans la physiologie de la graine de *P. gabriellae* et dans l'adaptation au nickel est discuté. Ces résultats permettent d'approfondir les mécanismes impliqués dans la mise en place de l'hyper-accumulation de nickel dans les plantes, mécanismes qui pourront un jour se révéler utiles pour répondre à des questions de phytoremédiation ou de phytoextraction d'éléments-traces métalliques.

Abstract

New Caledonia possesses one of the world's richest, diverse and unique flora, and it is recognized as a biodiversity hotspot. Its high endemism in vascular plants (75.1 %) is partly due to the Gondwanan origins of its flora and to the high speciation induced by the ultramafic soils, which are rich in heavy metals, including nickel (and poor in essential nutrients, especially N, P, K). If this element is the source of the country richness, its mining exploitation and human colonization of the land induce ecosystems degradation. For these two main reasons, the study and comprehension of the new Caledonian flora is essential to be able to preserve, protect and restore its rich biodiversity. Preservation and restoration both depend on seeds. They are the unit of dispersal of higher plants, and are hence probably responsible of their world domination on flora. In the present work, we focused our study on the biochemical

Note de recherche

characterization of the seeds of *Psychotria gabriellae* (Baill.) Guillaumin, one of the world most nickel hyperaccumulating plant.

A proteomics characterization of the seed revealed a high representation of DING proteins that are known to be involved with ABC (ATP-binding cassette) type transporters or to bind phosphorus. This observation was associated with the presence of a nickel gradient inside the seed, presumably being established in order to protect the embryo from its toxicity. However, the existence of genes encoding these proteins remains a subject of discussions. To address this question we assessed the existence of bacteria in the dry mature seeds of *Psychotria gabriellae*. Endophytic bacteria were identified but none of them seems to produce such proteins.

This work will allow a better understanding of the mechanisms involved in nickel hyperaccumulation, and may highlight novel tools for phytoremediation or phytoextraction of heavy metals..

Keywords

seeds, proteomics, nickel, hyperaccumulation, *Psychotria gabriellae*, New Caledonia, DINGGG

Mots clefs

graines, protéomique, nickel, hyperaccumulation, *Psychotria gabriellae* (Baill.) Guillaumin, Nouvelle-Calédonie, DINGGG

Introduction

Dans l'archipel de Nouvelle-Calédonie, la plus grande île, la Grande-Terre (Figure 1), s'est détachée du Gondwana il y a environ 83 millions d'années (Ma) suite à l'ouverture de la Mer de Tasman. Ce mouvement, lié à la tectonique des plaques, et qui a abouti à la position actuelle de l'archipel a été marqué par



Figure 1. Répartition des populations de *Psychotria gabriellae* étudiées sur la Grande-Terre de Nouvelle-Calédonie. Monts Koghi - Dumbéa (longitude, 166.508 ; latitude - 22.176), Forêt Desmazures - Mont-Dore (longitude, 166.624 ; latitude, -22.192), Nétéa - Poya (longitude, 165.200 ; latitude, - 21.231).

des événements géologiques prédominants. Au cours de cette dérive, la Grande-Terre a subi une période d'immersion d'environ 20 Ma (65-45 Ma), provoquant l'accumulation de nombreux sédiments (Grandcolas *et al.*, 2008) notamment pélagiques, ce qui témoigne des fortes profondeurs de l'immersion (Cluzel *et al.*, 2012).

La subduction de la Grande-Terre sous la plaque Pacifique a ensuite été associée à un événement majeur d'obduction. L'orogénèse a donc commencé par le charriage d'une partie de la lithosphère océanique sur la Grande-Terre. La Nouvelle-Calédonie est ainsi un des complexes ophiolitiques les plus importants au monde (Pelletier, 2007). La mise en place de ce complexe est à l'origine

Note de recherche

des sols dits ultramafiques¹. Finalement l'émersion de la Grande-Terre, la situant dans sa position actuelle, est estimée à 37 Ma (Pelletier, 2007). L'érosion post-émersion a permis la réapparition de la multitude des sols de l'île, ainsi que son relief. Les roches ultramafiques recouvrent aujourd'hui un tiers de la surface de la Grande-Terre, sols peu propices au développement des plantes. En effet, les teneurs en azote, phosphore et potassium y sont faibles, alors que les teneurs en nickel, chrome, cobalt, manganèse, etc. y sont élevées et la biodisponibilité de l'eau est faible (L'Huillier *et al.*, 2010).

La nature de ces sols semble avoir joué un rôle primordial dans l'évolution de la flore de la Grande-Terre (Isnard *et al.*, 2016). D'une part, les espèces australasiennes présentes rapidement après l'émersion ont pu s'adapter à ces sols, leur créant ainsi une niche écologique et les séparant des autres espèces tropicales plus compétitives, mais non adaptées. D'autre part, l'induction d'une forte pression de sélection a abouti à la richesse actuelle (Jaffré *et al.*, 1994). La Nouvelle-Calédonie fait ainsi partie des dix plus importants hot-spots mondiaux en termes de biodiversité (Myers *et al.*, 2000 ; Mittermeier *et al.*, 2004 ; Wulff *et al.*, 2013 ; Gâteblé, 2015), avec en particulier un taux d'endémicité en plantes vasculaires de 75,1 % pour 3389 espèces répertoriées au total (Munzinger *et al.*, 2016).

Certains métaux de transition (Ni, Fe, Mn et Cu) sont des composants intrinsèques de certaines enzymes et protéines et sont ainsi essentiels à la survie des organismes vivants (Brown *et al.*, 1987). Le nickel peut en effet se

¹ Les roches ultramafiques ont pour origine la partie supérieure du manteau terrestre et contiennent de fortes quantités de Mg et de Fe. En effet, plus de 70 % de leurs minéraux sont ferromagnésiens, ce qui explique le terme d'ultra (beaucoup)-ma (magnésium)-f (fer)-ique. Les éléments minéraux sidérophiles tels Fe, Co, Cr et Ni sont en fortes quantités dans ces roches. En revanche, les éléments Ca, N, P et K sont en faibles quantités, peut-être en raison de leur faible affinité avec les minéraux ferromagnésiens.

lier à diverses enzymes comme cofacteur indispensable à leur activité (Vignais et Colbeau, 2004), comme c'est le cas avec l'uréase (EC 3.5.1.5) (Eskew *et al.*, 1984 ; Seregin et Kozhevnikova, 2006 ; Yusuf *et al.*, 2011 ; Sharma et Dhiman, 2013). Présente chez les bactéries, les levures et certaines plantes, cette enzyme est indispensable à la dégradation de l'urée, qui devient toxique quand elle n'est pas éliminée. En particulier, une forme de l'uréase des plantes est exprimée spécifiquement et abondamment dans l'embryon des graines (soja (*Glycine max*), *Arabidopsis*) (Sirko et Brodzik, 2000). D'autres observations indiquent, de surcroît, que le nickel appliqué à faible dose stimule la germination du riz, du blé, ou du soja, notamment en activant certaines enzymes. Cependant les mécanismes moléculaires de cette régulation germinative restent à éclaircir (Seregin et Kozhevnikova, 2006 ; Yusuf *et al.*, 2011).

Néanmoins les propriétés physicochimiques des métaux de transition en font également de redoutables ennemis moléculaires à forte concentration. En effet, en se fixant aux groupes carboxyles, imidazoles, sulfhydriles et aux amines aliphatiques des protéines, ils engendrent des modifications de la structure tridimensionnelle de ces macromolécules pouvant altérer, voire inhiber, leur activité biochimique (Seregin et Kozhevnikova, 2006 ; Yusuf *et al.*, 2011 ; Sharma et Dhiman, 2013). Dans ce cadre, il a été démontré que le nickel provoque une diminution de l'activité d'enzymes telles que la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (EC 4.1.1.39), la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (EC 1.2.1.12), ou encore l'aldolase (EC 4.1.2.13) pour n'en citer que quelques unes à titre illustratif, probablement via une interaction avec les groupes -SH ou les résidus d'histidine de ces protéines (Seregin et Kozhevnikova, 2006). L'inactivation d'enzymes impliquées dans les chaînes de transfert d'électrons peut notamment aboutir à la production d'espèces

Note de recherche

activées de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*) (Sharma et Dietz, 2009). Ainsi, lors d'un stress nickélique, la plupart des enzymes de détoxification cellulaire sont activées ou réprimées (Sirhindi *et al.*, 2016 ; Takur et Sharma, 2016).

Afin de faire face à ces contraintes édaphiques et, plus particulièrement, aux quantités importantes de nickel dans les sols, les espèces de la flore ultramaïque ont développé des mécanismes adaptatifs qui leur permettent de croître sur ces types de milieux. Gaspar *et al.* (2002) discutent l'existence de deux principaux types de réaction physiologique aux stress métallifères, une réaction de tolérance et une réaction d'exclusion.

Concernant la réaction de tolérance, Brooks *et al.* (1977) ont défini deux classes d'espèces selon leurs facultés à tolérer des concentrations importantes en nickel. Ainsi les espèces accumulatrices ont des concentrations en nickel comprises entre 100 et 1000 mg Ni/kg de matière sèche, alors que les espèces hyper-accumulatrices présentent des concentrations en nickel supérieures à 1000 mg Ni/kg de matière sèche. Une troisième classe fut en outre créée pour les plantes contenant plus de 10000 mg de nickel par kg dans leurs feuilles, les plantes hyper-nickelophores (Jaffré et Schmid, 1974 ; Sagner *et al.*, 1998 ; Boyd et Jaffré, 2009 ; Callahan *et al.*, 2012).

Les mécanismes physiologiques régissant l'hyper-accumulation de nickel sont encore mal compris. La plante doit être capable d'absorber l'ion métallique, de le transporter et de le stocker sous une forme non toxique pour la cellule, généralement sous une forme complexée à un ligand (Kersten *et al.*, 1980 ; Reeves et Baker, 1984 ; Callahan *et al.*, 2012). Les zones de stockage les plus probables sont la paroi végétale, le cytosol et la vacuole (Clemens *et al.*, 2002).

L'hyper-accumulation aurait une signification écologique importante, et plusieurs hypothèses ont été formulées pour l'expliquer. Elle permettrait de protéger la plante des herbivores et des attaques

fongiques (Davis *et al.*, 2001 ; Hanson *et al.*, 2004), bien que certains insectes semblent avoir développé des stratégies de tolérance au nickel (Boyd *et al.*, 2006).

L'hyper-accumulation dans les feuilles pourrait également provoquer un enrichissement localisé de l'élément métallique autour de la plante, lorsque les feuilles sénescentes chutent au sol. La plante augmenterait ainsi localement la concentration en nickel au niveau du sol, limitant la germination et le développement d'autres espèces moins tolérantes (Boyd, 2004 ; Zhang *et al.*, 2007).

Au plan moléculaire des progrès récents ont été enregistrés. Ainsi, il a été montré que chez l'hyper-accumulateur endémique des sols ultramaïques de Nouvelle-Calédonie, *Psychotria gabriellae* (Baill.) Guillaumin, antérieurement désigné *Psychotria douarrei* (*Rubiaceae*) (Barrabé *et al.*, 2013), le transporteur de métal tonoplastique PglREG1 était très vraisemblablement impliqué dans la très grande tolérance de cette plante envers le nickel. Cette étude a, en particulier démontré que l'expression ectopique de PglREG1 augmente la tolérance au nickel de la levure et de plantes transgéniques (Arabette des dames ou Arabette de Thalius ; *A. thaliana*) (Merlot *et al.*, 2014).

La Nouvelle-Calédonie possède, avec Cuba, la plus grande concentration au monde d'espèces hyperaccumulatrices de nickel (Reeves, 1992 ; Brooks *et al.*, 1998). Les deux cas les plus connus sont *Pycnantha acuminata* (*Sapotaceae*), dit arbre à sève bleue ou arbre à nickel, dont le latex de couleur bleu-vert peut contenir jusqu'à 25 % de son poids en nickel (Perrier *et al.*, 2004), et *P. gabriellae* dont les feuilles peuvent contenir jusqu'à 4,7 % (par rapport à la matière sèche) de nickel (Jaffré et Schmid, 1974 ; Callahan *et al.*, 2012), en accord avec d'autres résultats chez *P. grandis*, une espèce hyperaccumulatrice de nickel native de Puerto Rico (McAlister *et al.*, 2015).

La caractérisation minérale de plantes de *P.*

Note de recherche

gabriellae se développant sur un sol contenant environ 4000 mg Ni/kg a montré que les racines, tiges, feuilles et graines contiennent respectivement 3000, 9800, 18000 et 9300 mg Ni/kg, confirmant ainsi le caractère hypernickelophile de l'espèce (Zongo, 2010). Une approche de microscopie électronique a révélé l'existence d'un gradient de nickel dans la graine. Ce gradient semble concentrer le métal dans les parties externes de la graine, le nickel étant très peu présent au voisinage immédiat de l'embryon (Zongo, 2010), suggérant l'existence d'un mécanisme particulier de protection de l'embryon envers la toxicité du métal.

Grâce à la puissance des technologies post-génomiques actuelles, il est maintenant possible d'analyser finement, et de manière globale, les mécanismes moléculaires qui contrôlent les différentes étapes du développement de la plante. Dans le cas des graines, l'activité transcriptionnelle n'est pas nécessaire pour l'accomplissement de la germination des graines d'*A. thaliana*, alors que l'activité traductionnelle est essentielle, mettant en évidence l'importance des protéines stockées dans les graines matures ou synthétisées *de novo* à partir des ARNm stockés pour la germination (Rajjou *et al.*, 2004, 2012 ; Galland *et al.*, 2014).

Par conséquent, la protéomique (Wilkins, 2009) est particulièrement bien adaptée pour étudier les mécanismes des processus de développement des graines (Miernyk et Hajduch, 2011 ; Corbineau, 2012 ; Rajjou *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2015). En outre, le développement massif d'outils pour les approches protéomiques fournit une multitude de données permettant l'étude du protéome, même pour les espèces pour lesquelles la séquence du génome n'est pas encore établie (Bradshaw et Burlingame, 2005 ; Castellana *et al.*, 2008 ; Gallien *et al.*, 2009 ; Rabilloud *et al.*, 2010 ; Schulze et Usabel, 2010 ; Nesvizhskii, 2014 ; Faini *et al.*, 2016).

Pour ces raisons, une approche d'analyse protéomique a été développée au cours de ce

travail afin de mettre en évidence des protéines qui pouvaient être potentiellement impliquées dans un tel mécanisme de tolérance au nickel dans les graines.

Matériels et Méthodes

Matériel végétal et récolte des graines :

Le site d'étude principal des collectes de graines de *P. gabriellae* (Baill.) Guillaumin a été la forêt humide du Mont Koghi (Grande-Terre, Nouvelle-Calédonie), où ces plantes se développent sur un sol ultramafique (Figure 1).

Un suivi mensuel des plants a été réalisé afin de suivre le développement des fruits pour assurer une récolte des graines au meilleur moment, c'est-à-dire lorsqu'elles atteignent leur stade final de maturité. Les graines ont été récoltées à plusieurs stades de développement afin d'étudier l'évolution du protéome : le stade 1, pour lequel les téguments sont encore photosynthétiquement actifs (Nakajima *et al.*, 2012) ; le stade 2, montrant des graines dures et séparables du fruit et chez lesquelles les chlorophylles commencent à être dégradées (Johnson-Flanagan et McLachlan, 1990) ; le stade 3, où les graines sont capables de germer et où les chlorophylles sont complètement dégradées ; et le stade 4, pour lequel la pulpe est riche en pigments de type caroténoïdes ou flavonoïdes impliqués dans l'aptitude à la conservation et la survie à l'état sec des graines (Lepiniec *et al.*, 2006).

Par ailleurs, deux autres populations de *P. gabriellae* ont également été étudiées (Figure 1). Après récolte les fruits ont été placés dans des sachets en papier le temps du transport jusqu'au laboratoire. Ils ont ensuite été dépulpés manuellement et les graines ainsi obtenues ont été séchées à l'air ambiant et à la lumière pendant 3 à 4 h, le temps que

Note de recherche

l'endocarpe redevient sec. Les graines ont ensuite été conservées à + 4 °C dans des tubes hermétiques en plastique (Greiner Bio-One – CellStar – 227.261).

Des graines de *P. baillonii* Schltr. (famille des Rubiaceae) ont également été récoltées au Mont Koghi (Figure 1), dans les mêmes conditions que ci-dessus.

Bactéries endophytes de *Psychotria gabriellae* :

Pour caractériser les bactéries naturellement présentes chez les graines matures de *P. gabriellae*, les bactéries non endophytes, mais présentes à la surface des graines, ont été éliminées par incubation pendant 5 min dans une solution d'eau distillée stérile contenant 5 % d'hypochlorite de sodium sous agitation. Les graines ont ensuite été rincées trois fois pendant 5 min dans des bains d'eau distillée stérile. Les graines désinfectées ont ensuite été broyées à l'aide d'un pilon et d'un mortier stériles, sous hôte à flux laminaire vertical. Le broyat de cinq graines ainsi obtenu a alors été remis en suspension dans 10 mL d'eau distillée stérile. Puis le mélange a été agité avec un agitateur mécanique à bras (Bioblock Scientific, Agitest 86212) pendant 5 min à 7 Hz. Une dilution au dixième du mélange obtenu a ensuite été réalisée dans de l'eau distillée stérile.

Des milieux riches ont été utilisés pour isoler les micro-organismes, par exemple les milieux « viande-foie » (Bio-Rad – 64564) et « malt glucosé » (Panreac - 403690.1210) pH 6,0. Les bactéries ont été isolées à partir de 200 µL des deux dilutions étalées sur des boîtes de Pétri (diamètre 8 cm) remplies de milieu de culture puis incubées à 28 °C à l'obscurité.

L'apparition de colonies a été observée quotidiennement. Les souches bactériennes ainsi obtenues ont ensuite été conservées à – 80 °C dans des tubes Microbank™ (Pro-Lab diagnostic – PL.170/M).

Le séquençage du gène codant la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal a été réalisé chez les souches bactériennes isolées par l'entreprise

Macrogen en Corée (<http://www.macrogen.com/eng/>). Les colonies ont été récupérées avec un cure-dent stérile, et mises en suspension dans une solution saline stérile. Après centrifugation, les culots ont été repris dans la matrice InstaGene (Bio-Rad, USA), incubés à 56 °C pendant 30 min, puis chauffés à 100 °C pendant 10 min. Les amorces suivantes ont été utilisées pour la réaction de PCR (*Polymerase Chain Reaction* ; Réaction en chaîne par polymérase) : 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') et 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'). Les séquences obtenues ont ensuite été identifiées par alignement avec l'algorithme BLAST² (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Dans une autre approche, nous avons extrait l'ADN de graines matures sèches de *P. gabriellae* et directement recherché la présence de bactéries par séquençage de l'ARN 16S, comme décrit (Jacques *et al.*, 2012). Les graines de *P. gabriellae* ont été macérées pendant 12 h à 4 °C sous agitation puis le macérât a été porté à ébullition pendant 10 min où l'ADN a été extrait avec un kit commercial. L'ADN 16S a ensuite été amplifié par PCR à l'aide des amorces universelles A1 (5'-GAGTTTGATCATGGC TCAG-3') et B6 (5'-TTGCGGGACTTAACCC AACAT-3') puis séquencé.

Préparation des extraits protéiques :

L'endocarpe des graines (*P. gabriellae* et *P. Baillonii* ; environ 50 graines, trois réplicats) a été ôté, et les graines ont été placées à la température de – 80 °C pendant 20 min avant un broyage fin avec un broyeur à billes, chaque tube de broyage contenant deux billes

2 BLAST (acronyme de *basic local alignment search tool*) : méthode de recherche heuristique utilisée en bio-informatique permettant de trouver les régions similaires entre deux ou plusieurs séquences de nucléotides ou d'acides aminés et de réaliser un alignement de ces régions homologues.

Note de recherche

en acier inox (Retsch, MM 301) pendant 2 min à pleine puissance (30 Hz). Le broyat obtenu a ensuite été lyophilisé toute la nuit, placé dans des tubes scellés, pesé, puis mélangé avec de l'eau Milli-Q (Merck-Millipore) contenant des inhibiteurs de protéases (Roche complete – 1 pastille pour 10 mL) à raison de 1 mL pour 250 mg de broyat. Après agitation pendant 15 min en chambre froide, la suspension a été centrifugée (Sigma type 3K30) pendant 15 min à 15000 *g* à 4 °C, puis le surnageant contenant les albumines (Osborne, 1924) a été récupéré. Le culot a alors été de nouveau solubilisé avec du NaCl 0,5 M à raison de 1 mL de solution pour 250 mg de broyat, sous agitation pendant 15 min en chambre froide. Après centrifugation (15000 *g* ; 15 min ; 4 °C), le surnageant contenant les globulines (Osborne, 1924) a été recueilli.

La troisième extraction a été réalisée comme les deux précédentes, mais avec un mélange éthanol / eau (70 / 30). Le surnageant obtenu contenant les prolamines (Osborne, 1924) a été récupéré, le culot lavé trois fois avec de l'éthanol 70 % puis solubilisé dans une solution de NaOH à 0,2 % (p / v). Après centrifugation (15000 *g* ; 15 min ; 4 °C), le surnageant contenant les glutélines (Osborne, 1924) a été récupéré.

Pour concentrer les protéines et éliminer des contaminants pouvant interférer avec l'électrophorèse (par exemple, polyphénols, lipides) les quatre fractions protéiques obtenues ont été précipitées pendant la nuit à – 20 °C après ajout d'un volume d'un mélange contenant acide trichloracétique (TCA) 20 % / acétone 80 % et 1,4-dithiothréitol (DTT) à 1 mM final. Après précipitation, les échantillons ont été centrifugés (15000 *g* ; 15 min ; 4 °C) puis les culots ont été lavés deux fois avec 500 µL d'une solution d'acétone contenant 1 mM de DTT. Les culots ainsi lavés ont été séchés sous hotte, puis repris dans un volume de tampon de réhydratation permettant d'obtenir une concentration finale en protéine d'environ 5 µg/µL.

Le tampon de réhydratation contenait de l'urée (7 M), de la thio-urée (2 M), du CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propane -sulfonate) à 4 % (m / v), 0,5 mL d'ampholytes 1 % (m / v), 1 mL de Triton 100X et de quelques gouttes de bleu de bromophénol afin de suivre le front de migration. Le DTT a été ajouté extemporanément (1 g / 50 mL de tampon).

Electrophorèse bidimensionnelle et révélation des protéines :

Les analyses électrophorétiques (2D-SDS-PAGE) ont été réalisées comme décrit par Catusse *et al.*, (2008) en utilisant des échantillons correspondant à environ 100 µg de protéine. Après une première migration électrophorétique selon leur charge (isoélectrofocalisation), les protéines ont été séparées selon leur masse moléculaire par électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Pour chaque condition analysée, les gels 2D ont été réalisés en triplicata (réplications biologiques). Suite à la révélation des protéines par coloration au nitrate d'argent, l'analyse d'image des gels 2D numérisés a été réalisée avec le logiciel Image Master 2D Elite (Amersham Biosciences), comme décrit par Catusse *et al.* (2008).

Les protéines caractérisées dans ce travail ont été identifiées par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (nano LC-MS/MS). Les « spots » protéiques détectés sur les gels 2D (taches colorées sur les gels 2D) ont été excisés avec des embouts stériles et placés dans des tubes stériles de 1,5 mL. Chaque spot a été rincé, les protéines qu'ils contenaient réduites en présence de DTT (10 mM), alkylées en présence d'iodoacétamide (55 mM), et incubées pendant une nuit à 37 °C en présence de trypsine (12,5 ng / mL ; Promega V5111) comme décrit (Schevchenko *et al.*, 1996).

Les fragments tryptiques ont été extraits avec

Note de recherche

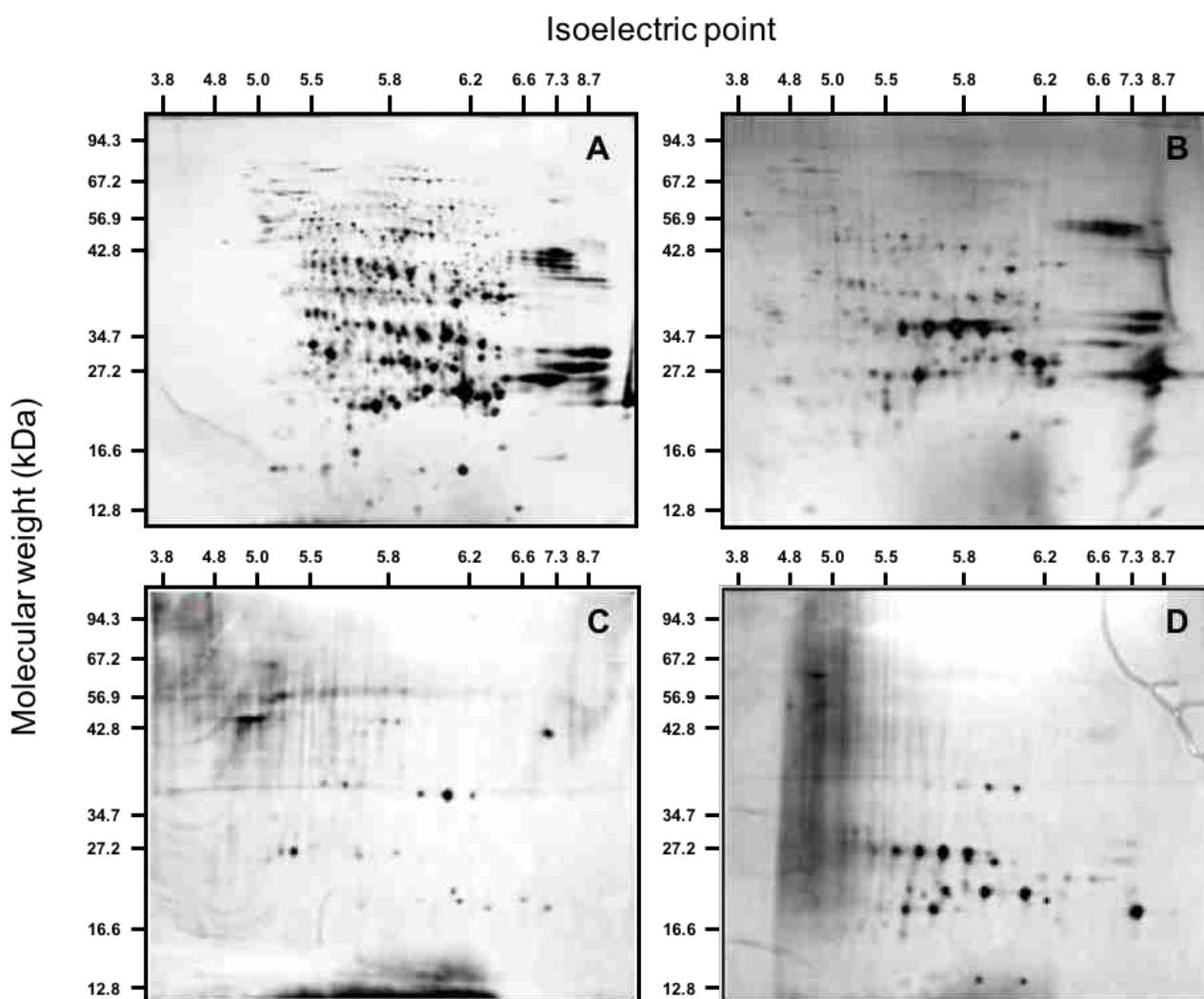


Figure 2. Protéome de la graine entière sèche de *Psychotria gabriellae*. Les différentes classes de protéines de graines (Osborne, 1924) ont été extraites des graines matures sèches de *P. gabriellae* (récoltées au Mont Koghi en 2006, 2009 et 2010 ; Figure 1), puis analysées par électrophorèse bidimensionnelle 2D-SDS-PAGE comme décrit dans les Matériels et Méthodes. A : fraction albumines, B : fraction globulines, C : fraction prolamines, D : fraction glutélines.

un mélange H₂O / acétonitrile (40 / 60 ; v / v) acidifié par l'acide formique (0,1 % ; v / v). Les extraits peptidiques ont ensuite été analysés par nano LC-MS/MS (Catusse *et al.*, 2008). L'ensemble des données de MS/MS a été exploré par le moteur de recherche Mascot (<http://www.matrixscience.com>) de la banque

protéique non redondante de NCBIInr téléchargée sur le site de National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) en mai 2011.

Les protéines ainsi identifiées ont été classées fonctionnellement en utilisant la classification ontologique décrite par Bevan *et al.*, (1998).

Note de recherche

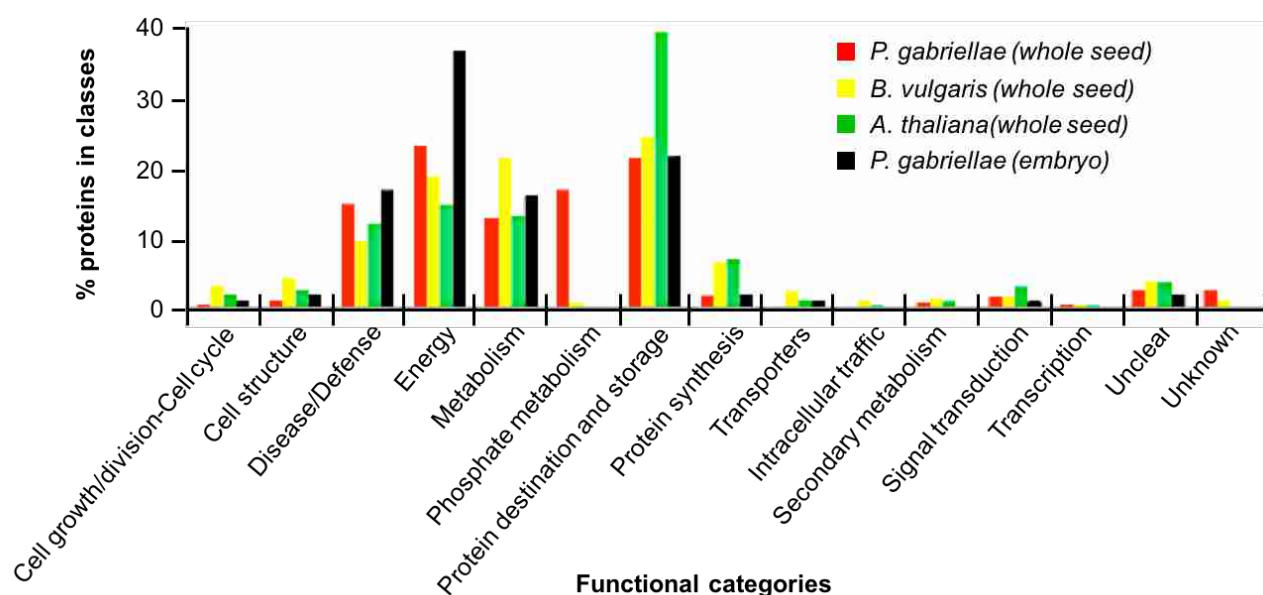


Figure 3. Classes fonctionnelles selon Bevan et al., (1998) des protéines de la fraction albumine caractérisées à partir de la graine entière ou de l'embryon isolé de *Psychotria gabriellae* (graines récoltées au Mont Koghi en 2006, 2009 et 2010 ; cf. Figure 1). Barres rouges : protéome de la fraction albumine des graines matures sèches entières de *P. gabriellae* (Tableau supplémentaire S1) ; barres jaunes : protéome de la fraction albumine des graines matures sèches entières de *B. vulgaris* (Catusse et al., 2008) ; barres vertes : protéome de la fraction albumine des graines matures entières d'*A. thaliana* (Galland et al., 2012, 2014) ; barres noires : protéome de la fraction albumine des embryons isolés des graines matures sèches entières de *P. gabriellae* (Tableau supplémentaire S1).

Western blotting :

Les protéines des échantillons de graines, séparées par migration SDS-PAGE en gels bidimensionnels ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose par un transfert semi-sec (Towbin et al., 1979).

Après incubation (1 h) des membranes de cellulose avec des anticorps anti-protéine DING de tabac (*Nicotiana tabacum*) (Perera et al., 2008), la révélation des Western Blots a été réalisée à l'aide du Kit « BM Chemiluminescence Blotting Substrate Roche » selon les instructions du fabricant (Roche Applied Science - 11500708001), en chambre noire, en plaçant les membranes dans la solution de révélation

additionnée du substrat de la peroxydase pendant 1 min. L'émission de la fluorescence a été enregistrée sur film photographique.

Résultats

Fractions protéiques des graines matures sèches de *Psychotria gabriellae* :

A partir de 50 graines représentant environ 1,8 g de matière fraîche, l'extraction des protéines selon Osborne (1924) conduit aux quatre fractions albumines, globulines, prolamines et glutélines. Les albumines correspondent aux protéines cellulaires solubles dans l'eau alors

Note de recherche

que les trois autres fractions contiennent essentiellement des protéines de réserve de la graine (Shewry *et al.*, 1995). Afin de caractériser le protéome des graines, ces quatre fractions ont été soumises à une électrophorèse 2D SDS-PAGE (Figure 2), puis à une identification des protéines contenues dans les spots par nano LC-MS/MS et recherche Mascot (cf. Matériels et Méthodes). Cela a permis l'identification de 599 albumines, de 40 globulines, de 13 prolamines et de 29 glutélines (Tableau supplémentaire S1).

Les albumines identifiées ont été associées à des catégories fonctionnelles en utilisant la classification ontologique de Bevan *et al.*, (1998), puis l'abondance des protéines dans ces catégories a été comparée avec celle obtenue pour les graines d'*A. thaliana* (Galland *et al.*, 2012, 2014) et de betterave à sucre (*B. vulgaris*) (Catusse *et al.*, 2008). En premier lieu, on peut noter que, globalement, le protéome de la graine mature sèche de *P. gabriellae* est très similaire à ceux de la graine de *B. vulgaris* (Catusse *et al.*, 2008) et d'*A. thaliana* (Galland *et al.*, 2012, 2014) (Figure 3). En effet, les principales composantes fonctionnelles du protéome des graines de ces deux plantes se retrouvent bien dans le protéome de la graine de *P. gabriellae*. Il s'agit notamment des catégories « Disease/Defence », « Energy », « Metabolism », « Protein destination and storage » qui sont les classes majoritaires chez les graines des trois espèces (Figure 3).

Malgré cette similitude globale des protéomes des graines de *P. gabriellae*, *B. vulgaris* et *A. thaliana*, un fait marquant concerne les protéines du métabolisme du phosphate qui sont exceptionnellement représentées chez les graines de *P. gabriellae* (Tableau supplémentaire S1 ; Figure 3). En effet, sur les 599 albumines caractérisées chez la graine mature sèche de *P. gabriellae*, 103 (17,2 %) d'entre elles interviennent dans le métabolisme du phosphate, ce qui représente 58 % des protéines du métabolisme (Tableau supplémentaire S1 ; Figure 3).

Fait plus remarquable encore, l'analyse par BLAST de cette classe fonctionnelle révèle que les 103 protéines identifiées appartiennent à une seule et même famille, les protéines nommées DING (Berna *et al.*, 2002, 2008 ; 2009a,b) (Tableau supplémentaire S1). Chez *P. gabriellae*, on retrouve ces protéines sous deux noms : la protéine *Germin-like-proteins (GLP) binding protein 1a* d'*A. thaliana* et la protéine p27SJ de millepertuis (*Hypericum perforatum*) (Tableau supplémentaire S1). Les protéines DING sont un ensemble de protéines bien conservées et largement distribuées (Berna *et al.*, 2002, 2009a,b), caractérisées par une séquence N-terminale de type DINGGG (aspartate-isoleucine-asparagine-glycine-glycine-glycine), d'où l'origine de leur nom (Berna *et al.*, 2002 ; Pantazaki *et al.*, 2008 ; Bernier, 2013).

Toutefois, leur origine chez les eucaryotes reste toujours à expliquer compte-tenu de l'absence de gènes codant ces protéines dans tous les génomes séquencés en entier d'espèces chez lesquelles des protéines DING ont été identifiées (Bernier, 2013).

Pour approfondir cette question, nous avons réalisé plusieurs expériences afin de mieux préciser leur présence et leur origine dans les graines de *P. gabriellae*. Les résultats sont présentés dans les paragraphes suivants.

Etude protéomique comparative des différents tissus des graines mures sèches de *Psychotria gabriellae* :

L'analyse du protéome de la graine entière a livré des indications sur l'existence de mécanismes nouveaux probablement impliqués dans la protection de l'embryon face au stress nickel. Pour mieux comprendre ces mécanismes, nous avons disséqué les graines entières pour isoler des fractions pures contenant uniquement l'albumen ou l'embryon.

Des électrophorèses 2D SDS-PAGE ont ensuite été réalisées sur les fractions

Note de recherche

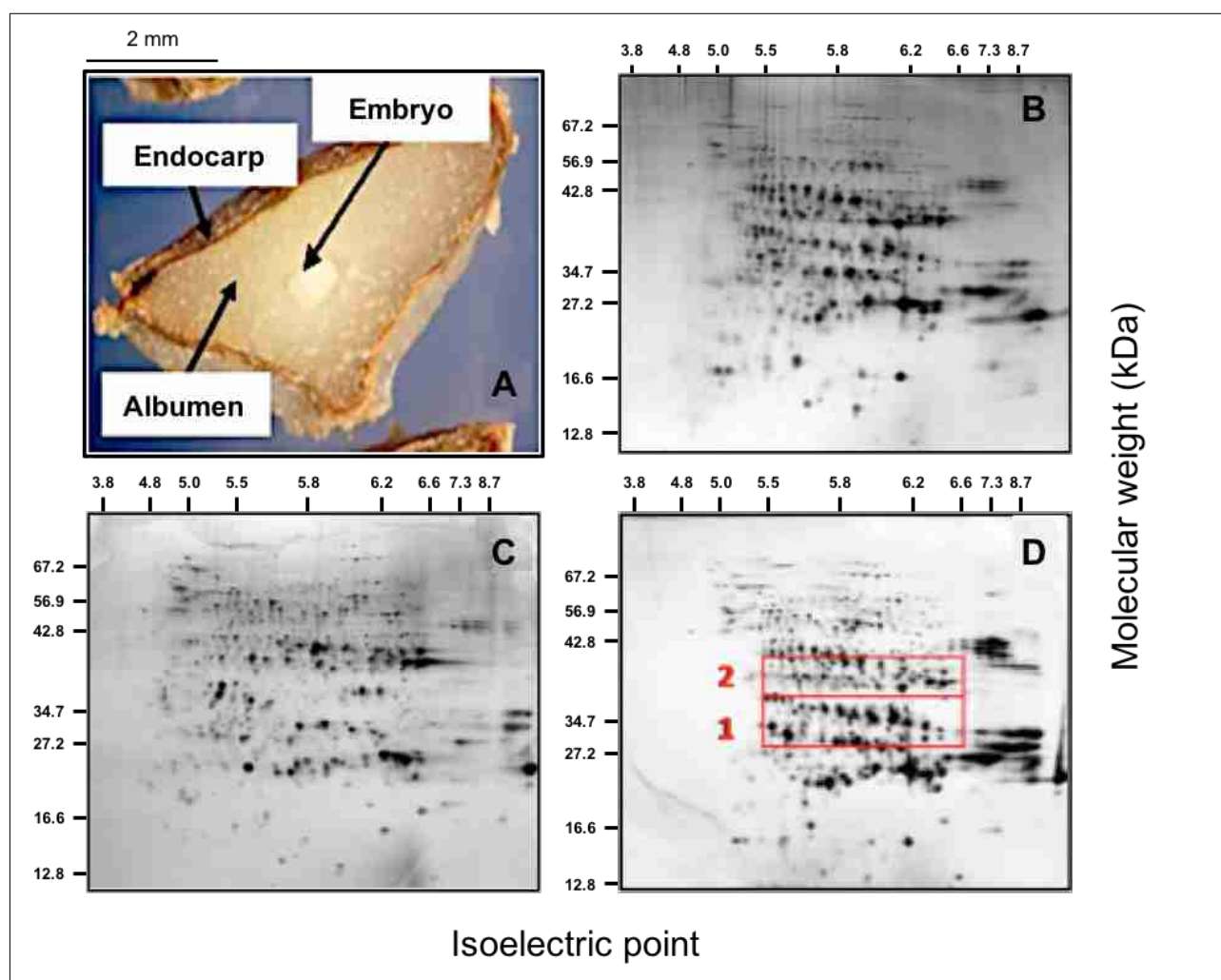


Figure 4. Comparaison tissulaire des différents profils de la fraction albumine de la graine mature sèche de *Psychotria gabriellae* (graines récoltées au Mont Koghi en 2006, 2009 et 2010 ; cf. Figure 1). A : coupe d'une graine montrant l'embryon zygotique (Embryo), le tissu de réserve triploïde (Albumen) et la partie interne du péricarpe (Endocarp) ; B : Albumines de l'albumen ; C : Albumines de la partie embryo ; D : Albumines de la graine entière. Les encadrés en rouge correspondent à des zones du gel 2D où les différences d'accumulation des protéines de l'albumen (et donc de la graine entière) et de l'embryo sont très visibles (notamment la zone 1).

protéiques de l'albumen et de l'embryo isolés (Figure 4) et les protéines contenues dans les spots ont été identifiées par nano LC-MS/MS suivie d'une recherche Mascot, comme décrit dans les « Matériels et Méthodes » (Tableau supplémentaire S1).

Les gels 2D de la Figure 4 montrent bien que le profil des albumines de l'embryo isolé est radicalement différent de celui de la graine entière principalement représentée par l'albumen. Nous avons identifié 106 albumines dans l'embryo (Tableau

Note de recherche

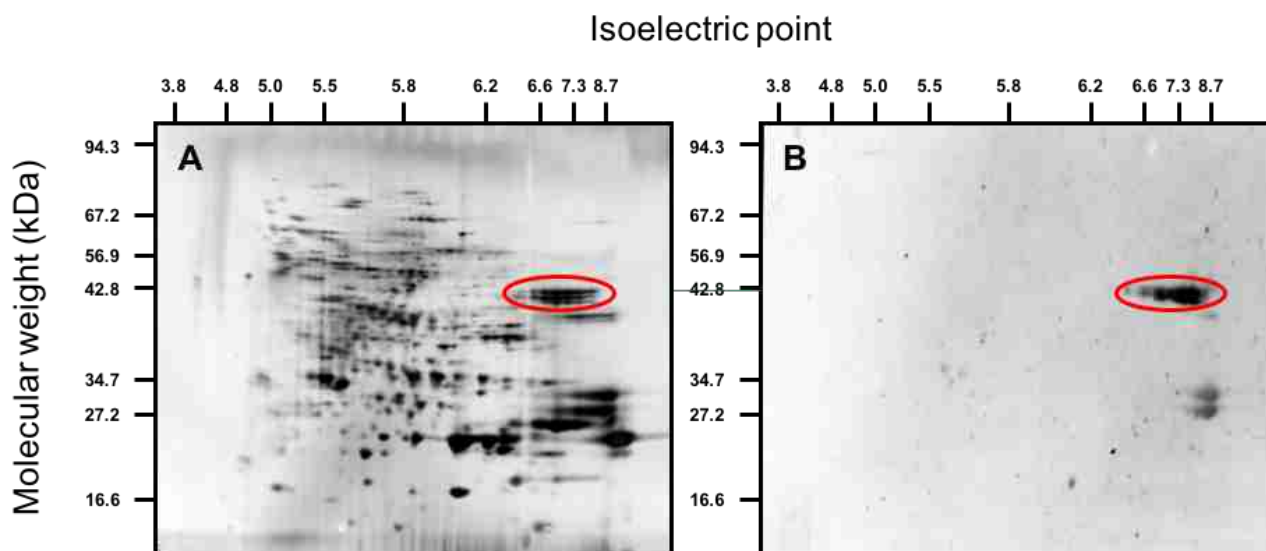


Figure 5. Caractérisation immunologique des protéines de la fraction albumine isolée des graines matures sèches entières de *Psychotria gabriellae* (graines récoltées au Mont Koghi en 2006, 2009, 2010 et 2011 ; cf. Figure 1). Gels d'électrophorèse bidimensionnelle (2D-SDS-PAGE) des fractions albumines des graines matures sèches de *P. gabriellae* colorés à l'argent (A) et après Western blot avec l'anticorps anti-DING de tabac (Perera et al., 2008) (B). Les spots protéiques de 40 kDa environ spécifiquement reconnus par l'anticorps anti-DING sont entourés par un ovale rouge.

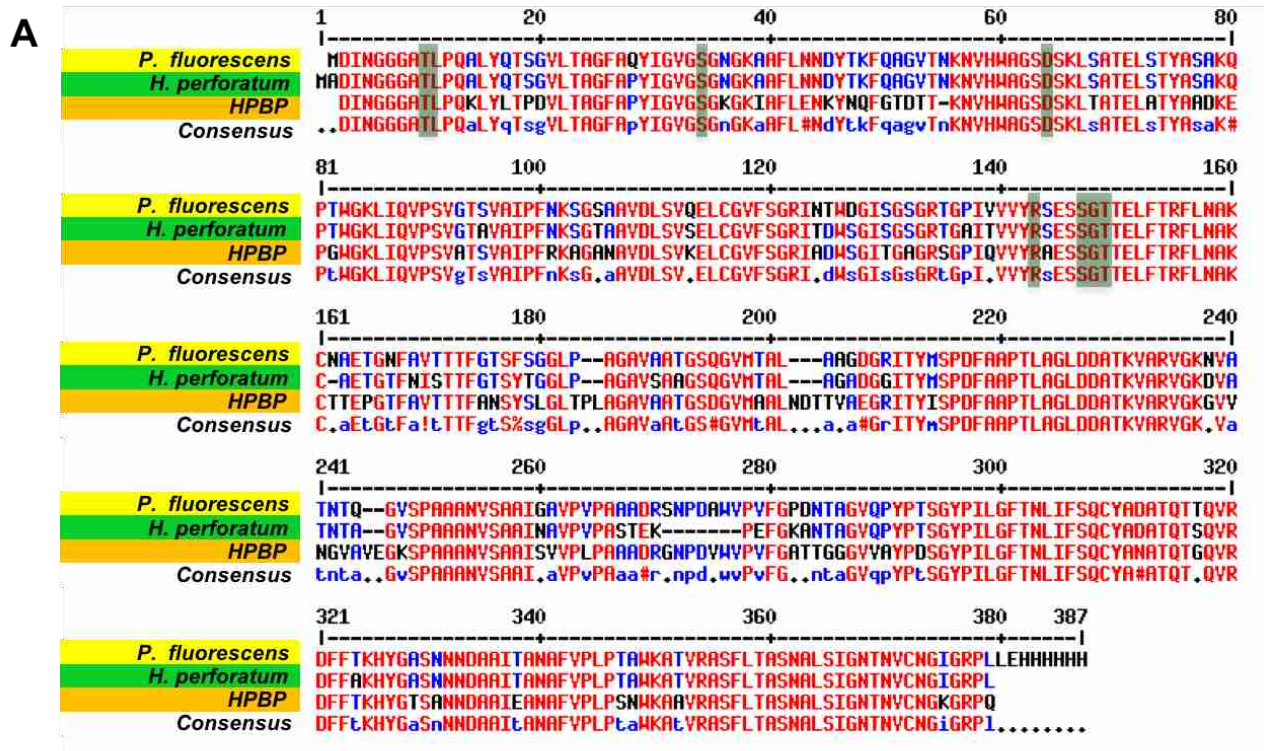
supplémentaire S1), dont la répartition en classes fonctionnelles est présentée dans la Figure 3. Les principales caractéristiques du protéome de l'embryon sont un nombre élevé de protéines dans la classe «Energy» et une totale absence des protéines du métabolisme du phosphate (*GLP-binding protein 1a* et *p27SJ*) (Figure 3 ; Tableau supplémentaire S1). Cette abondance accrue des enzymes de la production d'énergie dans l'embryon suggère l'existence d'un tissu métaboliquement très actif, prêt à enclencher les différents processus de la germination et de la croissance radriculaire. Par ailleurs, l'absence des protéines du métabolisme de phosphate (*GLP-binding protein 1a* et *p27SJ*) dans l'embryon (Figure 3 ; Tableau supplémentaire S1) renforce l'idée selon laquelle l'albumen procure à l'embryon une protection efficace envers le stress nickel. Ces résultats suggèrent ainsi que ce

mécanisme particulier de tolérance joue probablement un rôle prépondérant lors de la maturation de la graine pour assurer l'intégrité de l'embryon nécessaire à l'émergence d'une plantule vigoureuse à l'issue de la germination.

Analyses immunochimiques :

Nous avons cherché à confirmer la présence de ces protéines DING dans les graines de *P. gabriellae* en utilisant une approche immunochimique et en faisant appel au plus grand nombre de graines provenant de lieux et de dates de récoltes différents. Dans ces expériences fondées sur l'utilisation d'un anticorps dirigé contre une protéine DING de tabac (Perera et al., 2008), des graines récoltées au Mont Koghi (Figure 1) en 2006, 2007, 2009, 2010 et 2011, couvrant ainsi une période de six

Note de recherche



B >gi|190613370|pdb|2Q9T|A Chain A, High-Resolution Structure Of The Ding Protein From *Pseudomonas fluorescens*
MDINGGGATLPQALYQTSGLVLTAGFAQYIGVGSNGKAFLNNDYTKFQAGVTNKNVHWAGSDSKLSATELSTYASAKQPTWGLIQVPSVGTSAVAIPFNKSGSAAYDLSVQELCGVFSGRINTWDGISGSGRTGPIVVVYRSESSGTELFTRFLNAK
CNAETGNFAVTTTFTGTSFSGGLPAGAVAAATGSQGVMTALAAGDGRITYMSPDFAAPTLAGLDDATKVARVGVKQVATNTQGVSPAAANVSAIIGAVVPVPAADRSPDAAWVVPVFGPDNTAGVQPYPTSGYPILGFNTLIFSQCADATQTQVRDFFTKHYGASNNNDAAITANAFVPLPTAWKATVRASFLTASNALSIGNTNVCNGIGRPLLEHHHHHH

Figure 6. Séquences peptidiques de diverses protéines DING. A : comparaison des séquences des protéines DING de *Pseudomonas fluorescens* (gi|190613370|pdb|2Q9T) ; masse moléculaire 38947,39 Da et pI 7,72), de millepertuis (*Hypericum perforatum* (P27SJ) ; gi|295687390|gb|AAW57408.2| ; masse moléculaire 36897,19 Da et pI 8,26) et humaine (Human Phosphate Binding Protein (HPBP) ; gi|152032648|sp|P85173.1| ; masse moléculaire 38533,31 Da et pI 7,77). Les alignements ont été générés avec le logiciel MultiAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>). Les séquences en rouge sont les plus conservées. B : Les peptides expérimentaux obtenus ici à partir du spot DING majoritaire reconnu par l'anticorps anti-DING de tabac chez *Psychotria gabriellae* (poids moléculaire proche de 40 kDa, point isoélectrique moyen de l'ordre de 7,3 ; ovale rouge en Figure 5) ont été reportés sur la séquence de la protéine DING de *P. fluorescens* (gi|190613370|pdb|2Q9T). Elles sont indiquées en rouge (les données de masses sont accessibles auprès de la plate-forme de protéomique de Strasbourg Grand Est (jmstrub@unistra.fr)) et en surligné jaune (plate-forme protéomique de Marseille). Le taux de couverture de la protéine de *P. fluorescens* par ces peptides de *P. gabriellae* est de 53 %. Les acides aminés surlignés en vert en (A) et (B) sont les acides aminés conservés impliqués dans la liaison du phosphate (Berna et al., 2008).

Note de recherche

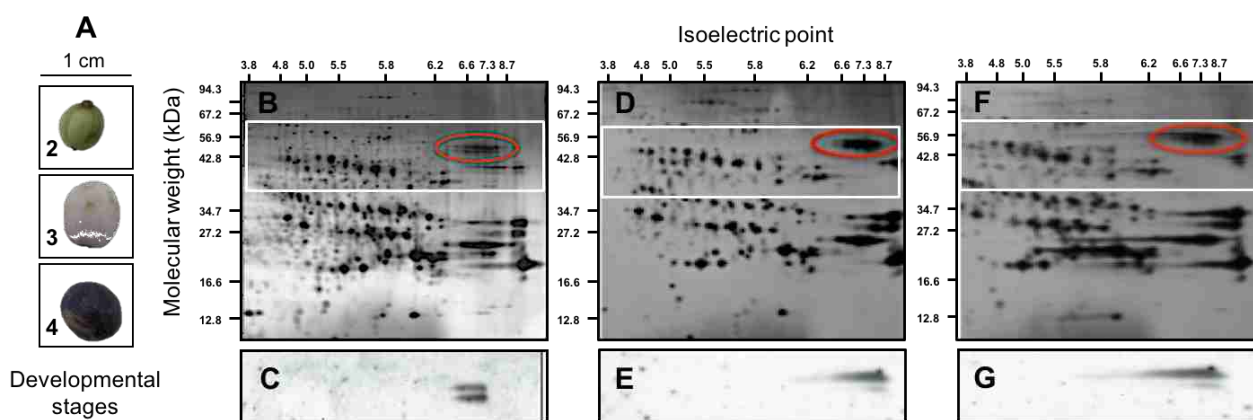


Figure 7. Protéome de la fraction albumines de la graine de *Psychotria gabriellae* à différents stades de développement de la graine (graines récoltées au Mont Koghi en 2011 ; cf. Figure 1). Les graines ont été récoltées à plusieurs stades de développement : le stade 1 (non montré) où les téguments sont encore photosynthétiquement actifs (Nakajima et al., 2012), le stade 2 présentant des graines dures et séparables du fruit et où les chlorophylles commencent à être dégradées (Johnson-Flanagan et McLachlan 1990), le stade 3 où les graines sont capables de germer et où les chlorophylles sont complètement dégradées, et le stade 4 pour lequel la pulpe est riche en pigments de type caroténoïdes ou flavonoïdes impliqués dans l'aptitude à la conservation et la survie à l'état sec des graines (Lepiniec et al., 2006). Après extraction de la fraction albumines des graines, les protéines ont été séparées par électrophorèse bidimensionnelle (2D-SDS-PAGE) comme décrit dans les Matériels et Méthodes. Le stade 1 n'a pu être étudié par analyse protéomique car les graines n'ont pu être extraites du fruit. A : stades de développement successifs utilisés pour l'analyse protéomique. B, D et F : coloration à l'argent des gels 2D obtenus avec ces fractions, respectivement pour les stades (2), (3) et (4). Les spots de 40 kDa environ reconnus par l'anticorps anti-DING de tabac (Perera et al., 2008) sont entourés d'un ovale rouge et la partie d'intérêt des westerns blots est présentée sous les photographies des gels.

années, ont été examinées pour leur contenu en protéine DING. De plus, des graines provenant de deux nouvelles populations, l'une récoltée au nord de la Grande-Terre, la population de Nétéa-Poya, et une autre récoltée au sud de la Grande-Terre, la population de la forêt Desmazures, ont également été utilisées (Figure 1).

Les *Western blots* obtenus à partir des fractions albumines ont permis la révélation d'un groupe de spots (poids moléculaire proche de 40 kDa, point isoélectrique moyen de l'ordre de 7,3 ; ovale rouge en Figure 5) spécifiquement reconnus par l'anticorps anti-

DING de tabac chez *P. gabriellae*. Ces caractéristiques de poids moléculaire et de point isoélectrique sont très proches de celles déterminées pour d'autres protéines DING isolées de bactéries, de plasma sanguin humain ou de plantes (Berna et al., 2008). L'analyse par spectrométrie de masse des protéines contenues dans les spots protéiques correspondant à la zone reconnue par l'anticorps a confirmé l'identification de protéines DING (Figure 6). Les peptides identifiés amènent à une couverture de 51 % de la séquence de la protéine DING de *Pseudomonas*

Note de recherche

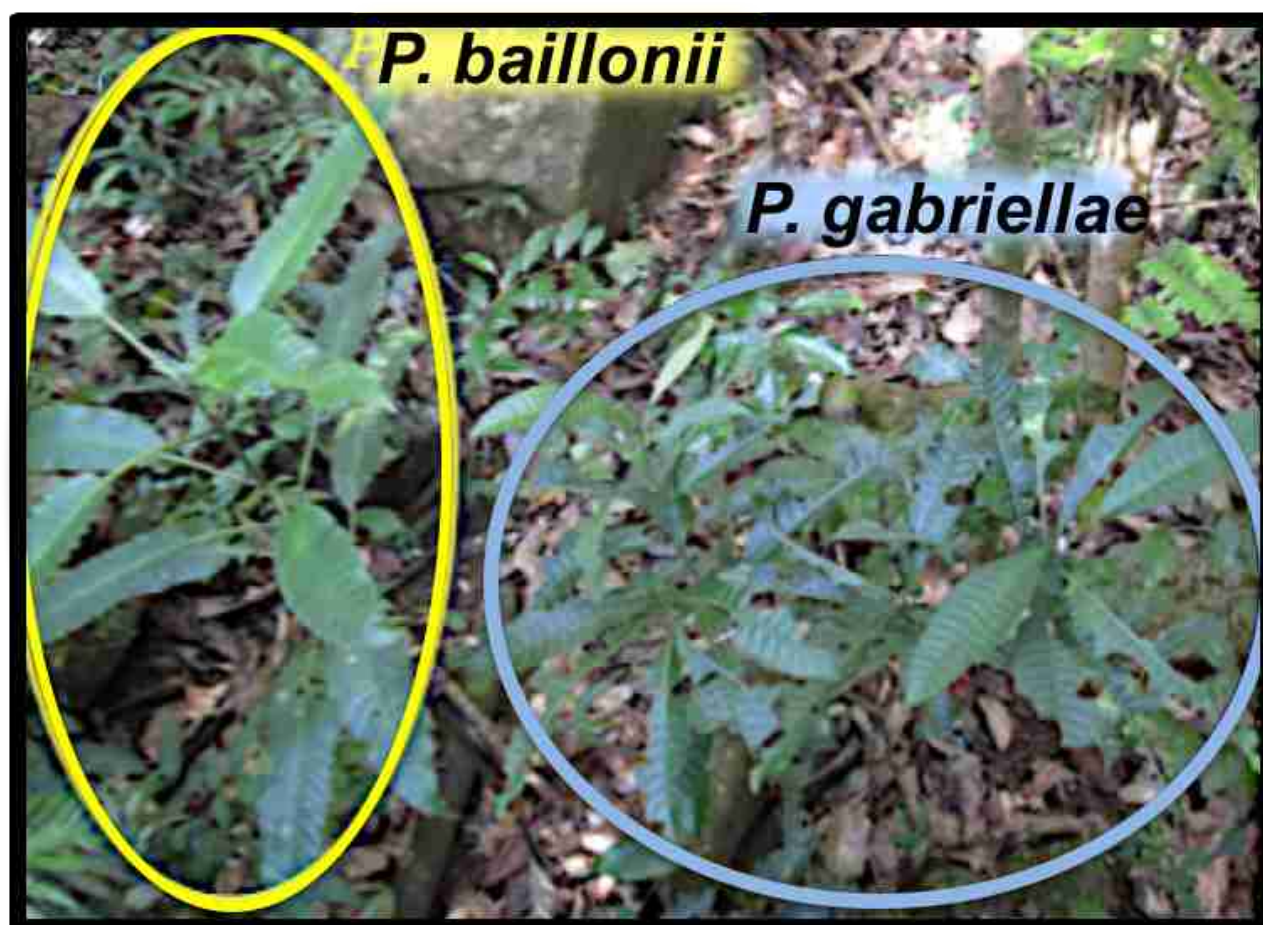


Figure 8. Plants de *Psychotria gabriellae* et de *Psychotria baillonii* se développant côte à côte au Mont Koghi en Nouvelle-Calédonie. Plants de *P. gabriellae* (en bleu) et de *P. baillonii* (en jaune) en conditions naturelles. Pour la localisation du Mont Koghi, voir la Figure 1.

fluorescens (Figure 6). De plus, plusieurs des acides aminés impliqués dans la liaison avec le phosphate ont été expérimentalement déterminés par analyse en spectrométrie de masse, et l'extrémité N-terminale contenant la séquence consensus DINGGG a été mise en évidence (Figure 6).

Par ailleurs, il importe de préciser que ces résultats ont été obtenus par deux plateformes de protéomique différentes (Strasbourg et Marseille), avec des expérimentateurs différents. Ces données permettent donc de conforter l'identification de la protéine DING chez *P. gabriellae* et de

rejeter la possibilité d'une contamination technique au moment du séquençage en spectrométrie de masse. Les mêmes résultats de réactivité de l'anticorps anti-DING de tabac ont été obtenus pour les graines des populations récoltées au Mont Koghi en 2006, 2007, 2009, 2010 et 2011 ainsi que pour les graines correspondant aux deux populations de la forêt Desmazure et de Nétéa-Poya (Figure supplémentaire S2). De plus, les analyses de spectrométrie de masse ont permis de confirmer que ces spots reconnus par l'anticorps correspondaient bien à des protéines DING

Note de recherche

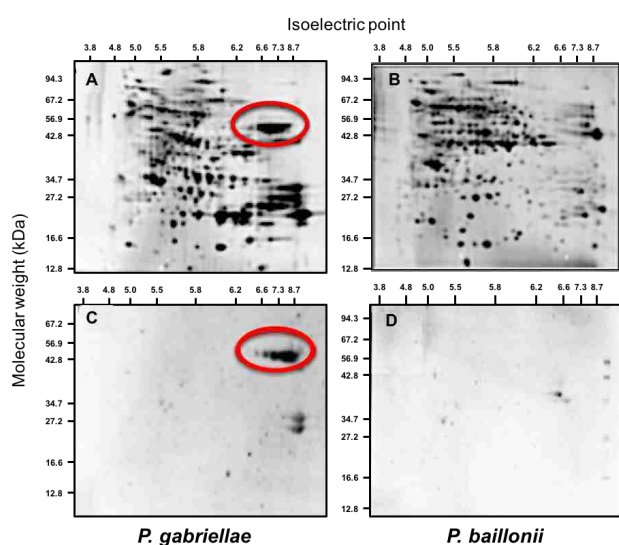


Figure 9. Caractérisation immunologique des protéines de la fraction albumine isolée des graines matures sèches entières de *Psychotria baillonii*. Gels d'électrophorèse bidimensionnelle (2D-SDS-PAGE) des fractions albumines des graines matures sèches de *P. gabriellae* (A) et de *P. baillonii* (B) colorés à l'argent et après western blot avec l'anticorps anti-DING de tabac (Perera et al., 2008) pour *P. gabriellae* (C) et *P. baillonii* (D). Les spots protéiques de 40 kDa environ spécifiquement reconnus par l'anticorps anti-DING sont entourés par un ovale rouge.

(résultats non montrés). Enfin, un contrôle supplémentaire a été réalisé à partir d'un gel 2D non chargé en protéines et ayant migré en même temps que d'autres gels contenant différents extraits riches en protéines DING. Après électrophorèse, plusieurs portions de gel ont été découpées à différentes positions dans ce gel « vide » et soumises à analyse par spectrométrie de masse après action de la trypsine. Aucune protéine de type DING n'a été révélée, permettant d'exclure une contamination de l'appareillage et des solutions utilisées pour les analyses protéomiques par des bactéries exprimant des protéines DING.

Caractérisation des protéines DING de *Psychotria gabriellae* au cours du développement de la graine :

Afin de caractériser le profil d'accumulation de ces protéines DING au cours de la formation de la graine de *P. gabriellae*, trois stades de développement ont été définis (cf. Matériels et Méthodes). Les extraits des fractions albumines ont alors été analysés par électrophorèse bidimensionnelle (Figure 7). Pour les trois stades étudiés, nous avons constaté que les spots (poids moléculaire proche de 40 kDa, point isoélectrique moyen de l'ordre de 7,3 ; ovale rouge) correspondant aux protéines DING reconnues par l'anticorps anti-DING de tabac sont toujours présents, et de même intensité, et ce, quel que soit le stade de développement de la graine. Un stade plus précoce (stade 1) a aussi été étudié, mais malheureusement les résultats n'ont pas été exploitables. En effet, à ce stade précoce, les graines sont indissociables du fruit. Un extrait des albumines sur le fruit total a été réalisé, mais les gels obtenus n'étaient pas satisfaisants. Nous ne pouvons donc pas, à ce jour, conclure sur le profil d'accumulation de ces protéines à un stade précoce du développement des graines de *P. gabriellae*.

Recherche de protéines DING chez *Psychotria baillonii* :

Afin de mieux appréhender les mécanismes de l'hyperaccumulation du nickel dans la graine de *P. gabriellae*, nous avons recherché l'existence de protéines DING chez une autre espèce du genre *Psychotria*, *P. baillonii* (famille des *Rubiaceae*) (Davis et al., 2009 ; Barrabé et al., 2013). Ces deux plantes, *P. gabriellae* et *P. baillonii*, vivent en effet dans les mêmes conditions édaphiques et climatiques au Mont Koghi, proche de Nouméa sur la Grande-Terre (Figure 8). Bien que se développant naturellement à quelques mètres l'une de l'autre, elles mettent en oeuvre deux stratégies adaptatives

Note de recherche

différentes face à l'élément nickel. La première, *P. gabriellae*, est reconnue comme étant hyperaccumulatrice de nickel (Jaffré *et al.*, 2013), alors que l'autre, *P. baillonii*, ne l'est pas (Zongo, 2010). En effet, chez *P. baillonii* les concentrations en nickel sont beaucoup plus faibles que chez *P. gabriellae*, de l'ordre de 430 mg Ni/kg dans les racines, 230 mg Ni/kg dans les tiges, 500 mg Ni/kg dans les feuilles et 40 mg Ni/kg dans les graines (Zongo, 2010).

Les albumines de la graine mature sèche de *P. baillonii* ont été extraites, séparées par électrophorèse bidimensionnelle, et les protéines DING ont été recherchées par analyse de *Western blotting* utilisant les anticorps anti-DING de tabac. La Figure 9 montre bien que ces anticorps reconnaissent des albumines de la graine mature sèche de *P. gabriellae* utilisées comme contrôle (40 kDa environ, ovale rouge) mais ne reconnaissent pas de protéines équivalentes chez *P. baillonii*. Ces résultats suggèrent que la présence de protéines DING est corrélée à l'accumulation de nickel dans la graine de *P. gabriellae*.

Caractérisation de la flore endophyte de *Psychotria gabriellae* :

Afin de tester l'hypothèse d'une origine procaryotique des protéines DING retrouvées dans la graine de *P. gabriellae*, l'identification de bactéries endophytes a été entreprise. Quatre souches bactériennes ont été isolées et caractérisées par séquençage de leur ARN 16S (cf. Matériels et Méthodes ; Tableau supplémentaire S2), *Staphylococcus pasteuri*, *Methylobacterium populi*, *Bacillus cereus* et *Vagococcus fluvialis*. Par ailleurs, nous avons observé que ces bactéries se développent parfaitement dans un milieu de culture contenant 100 mg/L de nickel, mettant en évidence la tolérance de ces micro-organismes envers le nickel (résultats non montrés).

Les protéines totales solubles ont été extraites de ces différentes bactéries, analysées par électrophorèse bidimensionnelle et testées

pour leur réactivité vis-à-vis de l'anticorps anti-DING de tabac. L'anticorps n'a montré aucune réactivité spécifique dans les zones des poids moléculaires et points isoélectriques des protéines DING des graines de *P. gabriellae* (résultats non montrés).

Dans une approche complémentaire, nous avons cherché à caractériser des bactéries endophytes de la graine de *P. gabriellae* en faisant macérer les tissus végétaux, puis séquençage de l'ARN 16S. Cette approche nous permettait ainsi d'isoler la présence éventuelle de bactéries non cultivables chez les graines de *P. gabriellae*, en complément des bactéries cultivables que nous avons isolées à Nouméa (cf. ci-dessus). Cette approche a ainsi permis l'identification d'une bactérie du genre *Ralstoniae*, de la famille des *Burkholderiaceae*. Les résultats de séquences et de BLAST correspondants sont présentés dans le Tableau supplémentaire S2.

Les séquences génomiques et plasmidiques de plusieurs de ces bactéries étant disponibles (Tableau supplémentaire S3), une analyse par BLAST nous a permis de confirmer l'absence de protéines comportant une séquence DINGGG en position N-terminale chez ces organismes.

Discussion

Afin de mettre en évidence les mécanismes de tolérance au nickel chez les plantes, nous avons conduit une analyse protéomique des graines de *P. gabriellae*, une plante endémique de la Nouvelle-Calédonie capable d'hyper-accumuler ce métal. Près de 600 albumines ont été caractérisées pour la première fois par électrophorèse bidimensionnelle et nano LC-MS/MS. Parmi les différentes protéines appartenant aux classes du métabolisme du stress et de la détoxification on note la présence de peroxydase (E.C. 1.11.1.7), lactoyl-glutathion lyase (E.C. 4.4.1.5) et superoxyde dismutase (EC 1.15.1.1) (Tableau supplémentaire S1), ce

Note de recherche

qui renforcerait ainsi les mécanismes nécessaires aux graines de *P. gabriellae* pour répondre au stress nickélique par détoxication des ROS générés par le nickel présent en abondance dans les graines, en accord avec des résultats précédents (Sirhindi *et al.*, 2016 ; Takur et Sharma, 2016).

Il convient également de noter l'existence de protéines de réponse au stress de dessiccation, notées *desiccation related protein (PCC13-62 like)*, retrouvées dans 25 spots de la graine de *P. gabriellae* (Tableau supplémentaire S1). Ces protéines appartiennent à la classe des protéines LEA (*late embryogenesis abundant*) décrites chez les graines de la plupart des angiospermes et qui jouent un rôle central dans la tolérance des graines au stress de dessiccation survenant en fin de maturation des graines orthodoxes (Dure *et al.*, 1989 ; Kermode, 1997 ; Tunnacliffe et Wise, 2007 ; Battaglia *et al.*, 2008). Il est intéressant de noter que les protéines LEA sont capables de fixer très fortement et spécifiquement les métaux lourds, dont le nickel avec une très forte affinité spécifique ($K_d = 1,8 \mu\text{M}$; 5 sites de fixation), ce qui laisse à penser qu'elles pourraient constituer un mécanisme de détoxication supplémentaire par rapport à cet élément métallique (Svensson *et al.*, 2000 ; Hara *et al.*, 2005).

De plus, l'histidinol déshydrogénase (E.C. 1.1.1.23), qui catalyse la dernière étape de synthèse de l'histidine chez les plantes est présente dans le protéome des albumines de la graine mature sèche de *P. gabriellae* (Tableau supplémentaire S1). Cette observation est en accord avec le fait que l'histidine est un puissant chélateur du nickel et que sa suraccumulation conduit à la tolérance envers ce métal chez les plantes (Kerkeb et Krämer, 2003 ; Ingle *et al.*, 2005 ; Zheng *et al.*, 2013).

Enfin, plusieurs enzymes du métabolisme des acides aminés soufrés, la cystéine synthase (E.C. 2.5.1.47), la méthionine synthase (E.C. 2.1.1.13) et la S-adénosyl-L-homocystéine hydrolase (E.C. 3.3.1.1), sont détectées dans la graine mature sèche de *P.*

gabriellae (Tableau supplémentaire S1). La cystéine synthase, qui catalyse la dernière étape de la synthèse de cystéine chez les plantes (Droux *et al.*, 1998), est impliquée dans la synthèse du glutathion, un acteur clé dans la détoxication des métaux lourds, dont le nickel, chez les plantes (Jozefczak *et al.*, 2012). Par ailleurs, la méthionine est impliquée dans la synthèse de la S-adénosyl-méthionine (Ravanel *et al.*, 1998) laquelle sert de précurseur à la synthèse de la nicotianamine, un chélateur puissant des métaux divalents chez les plantes et dont l'accumulation est associée spécifiquement à la tolérance au nickel chez *Thlaspi caerulescens*, une plante hyperaccumulatrice de métaux (Mari *et al.*, 2006).

L'ensemble de ces observations témoignent de la puissance de l'approche protéomique pour révéler les mécanismes rendant compte de l'hyperaccumulation de nickel chez *P. gabriellae*.

Toutefois un fait marquant de notre analyse concerne les protéines du métabolisme du phosphate qui sont exceptionnellement représentées chez les graines de *P. gabriellae* (Tableau supplémentaire S1 ; Figure 3), notamment divers membres de la famille des protéines DING (*GLP-binding protein 1a* et *p27SJ*). Elles constituent une énigmatique famille de protéines fixatrices de phosphate, identifiées dans les différents règnes du vivant, c'est-à-dire les procaryotes, les archaea et les eucaryotes.

Malgré leur caractère ubiquiste chez les eucaryotes, aucun locus ni ORF (*Open Reading Frame* ; cadre de lecture ouvert pour la traduction des protéines) n'a été identifié à ce jour dans les génomes eucaryotiques séquencés. Cette particularité a considérablement freiné les études structurales et fonctionnelles sur ces protéines, et a nécessité la mise en place de méthodologies innovantes, comme lors du séquençage de l'une de ces protéines par spectrométrie de masse et cristallographie aux rayons X (Elias *et al.*, 2011 ; Chabrière *et al.*, 2012).

Note de recherche

L'obtention de structures cristallographiques à très haute résolution a ainsi permis d'élucider le mécanisme moléculaire de fixation à haute affinité du phosphate chez ces protéines, notamment dans le cas de la protéine DING humaine nommée HPBP (*Human phosphate binding protein*), retrouvée en abondance dans le plasma sanguin humain (Morales *et al.*, 2006 ; 2007).

Cette protéine correspond à une apolipoprotéine dénommée *Solute Binding Protein* (SBP) qui fixe le phosphate et dont l'homologue chez les procaryotes est associé aux transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*) qui permettent le passage transmembranaire de molécules variées (Morales *et al.*, 2007). Son abondance dans le plasma sanguin y est d'ailleurs telle que la séquence protéique complète de la protéine a été obtenue par séquençage MS/MS et que la protéine a pu être cristallisée permettant d'établir sa structure tridimensionnelle et de confirmer la séquence en acides aminés déterminée par spectrométrie de masse (Diemer *et al.*, 2008). En particulier, ce séquençage a permis d'identifier le site de fixation des phosphates au niveau de la HPBP, représenté par huit acides aminés déjà caractérisés chez les SBP des procaryotes (Morales *et al.*, 2006, 2007 ; voir Figure 6).

Les premières protéines DING identifiées dans le monde végétal l'ont été fortuitement lors d'études de protéines nommées *Germin-Like Proteins* (GLP) chez *A. thaliana*. La purification des GLP menait en effet systématiquement à la co-purification de protéines de 40 kDa. Cette forte affinité leur a d'abord valu le nom de *GLP-binding proteins* avant d'être clairement associées à la famille des protéines DING (Berna *et al.*, 2009a,b). L'association physique entre une protéine DING et une GLP a récemment été aussi décrite chez le blé (Jiang *et al.*, 2016).

A l'instar des protéines DING, plusieurs fonctions sont associées aux GLP. En revanche, elles n'ont été trouvées que chez les plantes (Membré *et al.*, 2000). Le premier membre de cette famille a été observé lors de

la germination des grains de blé, d'où le nom de germine (Lane, 1991).

Il s'avère que les germes au sens strict sont des protéines spécifiques des Poacées, présentant une très forte conservation de séquences et possédant probablement toutes une activité oxalate oxydase (E.C. 1.2.3.4) (Dumas *et al.*, 1995 ; Woo *et al.*, 2000) et dont on pense qu'elles jouent un rôle important dans la défense des plantes contre les pathogènes (Lane, 2002). Les GLP, quant à elles, se retrouvent chez toutes les espèces végétales sous formes de familles comportant généralement quelques dizaines de gènes (Bernier et Berna, 2001). Plusieurs sont des superoxyde dismutases (E.C. 1.15.1.1). Elles présentent une plus grande variabilité que les germes de Poacées, soit autour de 60-70 % d'identité de séquence d'acides aminés entre elles et avec les germes.

Alors que plusieurs centaines de gènes de germes et GLP existent dans les banques de données, les programmes de séquençage systématique de génomes et d'ARNm n'ont jamais révélé de gènes de protéines DING chez les plantes, ni d'ailleurs chez les animaux et les bactéries, à l'exception du genre *Pseudomonas* (par exemple, *P. fluorescens* ; *P. aeruginosa*). Pour les eucaryotes, seuls quelques fragments de gènes ont pu être obtenus par des approches PCR (Bernier, 2013).

L'origine des protéines DING reste donc mystérieuse. La possibilité d'une contamination bactérienne a souvent été évoquée (e.g., Lewis et Crowther, 2005), mais est difficilement compatible avec plusieurs observations. Premièrement, des protéines DING ont aussi été trouvées chez des bactéries dont le génome est connu et ne comporte pas de gène correspondant (Bernier, 2013). Deuxièmement des protéines DING abondantes ont été identifiées dans des tissus ou milieux de cultures *a priori* sains, tels que le plasma humain (Morales *et al.*, 2006), un milieu de culture cellulaire (Perera *et al.*, 2008) ou encore des souris totalement

Note de recherche

dépourvues de germes bactériens (lignée *germ free*) (Collombet *et al.*, 2010).

Une des caractéristiques majeures des protéines DING chez les bactéries est la concentration et la séquestration du phosphate environnant par la protéine elle-même avant sa prise en charge par des transporteurs de la membrane cytoplasmique (Scott et Wu, 2005). Les protéines DING bactériennes peuvent ainsi jouer un rôle dans l'activation de la biosynthèse de la phosphatase alcaline. Cette activation est régulée par la concentration environnante en phosphate et le contrôle de la transduction du signal requiert l'intervention d'un système de transporteur spécifique des phosphates appartenant à la famille des transporteurs de type ABC (Pantazaki *et al.*, 2007).

Chez les plantes, des homologies ont aussi été notées entre une protéine DING identifiée chez les tubercules de topinambours (*Helianthus tuberosus*) et des phosphatases alcalines de la super famille des *Phosphate binding proteins* de *Pseudomonas* (Griffaut *et al.*, 2007). De manière intéressante, les protéines DING semblent jouer un rôle dans la biominéralisation. Ainsi Berna *et al.*, (2002) notent que les protéines DING peuvent générer et immobiliser une quantité importante de phosphates libres qui seraient à l'origine de la calcification dans les systèmes animaux. Ce mécanisme serait contrôlé par une enzyme clé du métabolisme des purines et pyrimidines, la nucléoside triphosphate pyrophosphatase (EC 3.6.1.19). La formation des cristaux d'oxalate de calcium dans des compartiments vacuolaires spécialisés serait la conséquence de ce phénomène.

Membré *et al.* (2000) montrent, dans une étude menée sur *Arabidopsis*, une faculté des protéines DING et notamment des GLP à lier un métal. En effet, la présence d'histidine, un acide aminé liant le nickel avec une haute affinité (Kramer *et al.*, 1996), dans ces protéines pourrait permettre de chélater des métaux (Hochuli *et al.*, 1987). La caractérisation d'une autre protéine DING chez les plantes provient d'une étude réalisée chez

le millepertuis (*Hypericum perforatum*) (Darbinian-Sarkissian *et al.*, 2006). Cette protéine, dénommée p27SJ, est retrouvée en abondance dans le protéome des graines de *P. gabriellae* (Tableau supplémentaire S1 ; Figure supplémentaire S1).

En effet, les homologues de p27SJ apparaissent 40 fois dans le protéome des albumines de *P. gabriellae* sur les 103 protéines du métabolisme du phosphate (Tableau supplémentaire S1). Fait remarquable, cette protéine de millepertuis se révèle capable d'entraver l'expression du génome du virus HIV-1. Dans ce mécanisme, la protéine p27SJ interagit avec l'activateur transcriptionnel C/EBP β et le transactivateur Tat en empêchant leur localisation nucléaire (Darbinian-Sarkissian *et al.*, 2006 ; Darbinian *et al.*, 2008, 2011).

Des protéines DING bactériennes et humaines bloquent également la transcription du virus de l'immunodéficience humaine HIV-1 (Cherrier *et al.*, 2011 ; Sachdeva *et al.*, 2013, 2015 ; Suh *et al.*, 2013). De plus, des patients infectés par le HIV réagissent à l'infection en sur-accumulant les protéines DING humaines dans le sérum (Djeghader *et al.*, 2012). Il serait intéressant, dans ce contexte, de mettre en place des essais visant à évaluer l'aptitude d'extraits protéiques de graines de *P. gabriellae* à inhiber la réplication du virus de l'immunodéficience humaine HIV-1.

Généralement, les mécanismes de tolérance aux conditions extrêmes de l'environnement ont pour finalité de maintenir l'intégrité d'un individu ou de sa progéniture dans des conditions de stress (Rajjou et Debeaujon, 2008).

La graine de *P. gabriellae* procure un bon exemple d'un tel mécanisme de protection de l'embryon. En effet, l'existence d'un gradient de nickel de la partie externe de l'albumen vers l'embryon suggère un rôle protecteur de l'albumen envers l'embryon (Zongo, 2010). Cette caractéristique suggère l'existence d'un mécanisme de transport symplastique du

Note de recherche

nickel. Il est intéressant de noter dans ce cadre qu'une protéine DING de *Pseudomonas fluorescens* présente de fortes homologies avec le composant fixant le phosphate inorganique du transporteur périplasmique de phosphate du type ABC (Ahn *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2007 ; Chabrière *et al.*, 2012). Il en est de même pour des protéines DING de *P. aeruginosa* (Ball *et al.*, 2012 ; Lewis et Crowther, 2005) et de *Clostridium perfringens* (Gonzalez *et al.*, 2014).

Nos observations seraient ainsi en accord avec l'hypothèse selon laquelle les protéines de type DING de *P. gabriellae* sont associées ou étroitement liées à une fonction transporteur de type ABC. De par le gradient de nickel observé en microscopie électronique à balayage, ces transporteurs ABC pourraient jouer un rôle en filtrant l'élément nickel à travers les couches cellulaires de l'albumen (Zongo, 2010).

De plus, chez les plantes, les transporteurs ABC ont été, depuis très longtemps, associés à la détoxification des métaux lourds et des métalloïdes (Kang *et al.*, 2011 ; Lee *et al.*, 2014 ; Singh *et al.*, 2015 ; Hwang *et al.*, 2016 ; Lane *et al.*, 2016). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, il a été montré que le transporteur ABC YCF1 (*Yeast Cadmium Facteur 1*) contribue à la tolérance aux métaux lourds et métalloïdes (Szczycka *et al.*, 1994 ; Li *et al.*, 1997). Chez *A. thaliana*, (1) le transporteur ABC AtABCG36/AtPDR8 localisé à la membrane plasmique est impliqué dans la résistance au cadmium et (2) des plantes transgéniques d'*A. thaliana* surexprimant AtABCG36 sont beaucoup plus tolérantes à ce métal lourd très toxique que les plantes sauvages (Kim *et al.*, 2007). De même, la surexpression du transporteur ABC mitochondrial AtABC25 d'*A. thaliana* augmente la tolérance de cette plante envers les métaux lourds alors qu'une insertion T-DNA dans ce gène conduit à une augmentation de la sensibilité (Kim *et al.*, 2006). Les protéines DING fixant le phosphate, la fixation des métaux pourrait également être médiée par ce moyen (le phosphate ayant une

grande affinité pour bon nombre de métaux).

Les protéines DING pourraient également jouer un rôle dans la formation des cristaux d'oxalate de calcium localisés dans la partie interne de l'albumen (Zongo, 2010) et/ou dans leur dégradation (par exemple, *GLP-binding protein 1a* retrouvée en abondance dans la graine (Tableau supplémentaire S1) et activité oxalate oxydase associée à certaines germines).

Une zonation bien marquée de l'albumen comprenant ainsi une partie riche en nickel et phosphate et une partie riche en calcium et oxalate ainsi que l'occurrence d'une même famille de protéines DING intervenant dans des mécanismes utilisant ces éléments suggèrent l'existence de liens étroits. Il est par ailleurs intéressant de noter dans ce contexte que des mutants d'*A. thaliana* déficient en oxalyl-CoA synthétase (E.C. 6.2.1.8), une enzyme intervenant dans le catabolisme de l'oxalate, accumulent trois fois plus de cristaux d'oxalate dans les graines au niveau des enveloppes alors que ces cristaux sont absents dans l'embryon (Foster *et al.*, 2012).

Dans le cas des graines de *P. gabriellae*, notre étude a révélé l'existence d'une oxalyl-CoA décarboxylase (E.C. 4.1.1.8) et d'une oxalate oxydase (E.C. 1.2.3.4), toutes deux impliquées dans le catabolisme de l'oxalate (Tableau supplémentaire S1). Ces deux enzymes, ainsi que les *GLP-binding proteins 1a*, sont présentes dans l'albumen et absentes de l'embryon (Tableau supplémentaire S1). Ces observations procurent ainsi des pistes intéressantes pour comprendre les mécanismes moléculaires de l'accumulation des cristaux d'oxalate de calcium, en lien avec l'accumulation du nickel, chez les graines de *P. gabriellae*.

Comme mentionné plus haut, l'existence de gènes codant les protéines DING chez les eucaryotes reste toujours à expliquer compte-tenu de l'absence de gènes codant ce type de protéines chez ces organismes. Une hypothèse séduisante pour expliquer nos résultats serait que des bactéries particulières

Note de recherche

possédant des gènes codant des protéines DING soient capables de développer des associations commensales avec *P. gabriellae* conférant ainsi à cette plante un mécanisme original de tolérance.

Il convient de rappeler que *P. gabriellae* accumule des quantités considérables de nickel, sans commune mesure avec ce que l'on trouve dans les modèles de plantes actuellement étudiés (Verbruggen *et al.*, 2009). De fait, seul un mécanisme totalement nouveau permettrait de rendre compte d'une telle propriété exceptionnelle. Nous avons mis en évidence plusieurs bactéries endophytes de la graine de *P. gabriellae*. De manière très intéressante, ces bactéries s'avèrent très tolérantes aux stress métallifères, dont ceux causés par le nickel, confirmant ainsi une nouvelle fois la présence de fortes concentrations en nickel dans la graine de *P. gabriellae*.

Il a également été montré que ces bactéries favorisent la croissance des plantes en présence de fortes concentrations de métaux. Ce résultat est en excellent accord avec la littérature montrant que ces micro-organismes sont très tolérants aux métaux (Shakoori et Muneer, 2002 ; Madhaiyan *et al.*, 2007 ; Ma *et al.*, 2009 ; Chen *et al.*, 2013). De manière intéressante, *Methylobacterium* est le genre dominant des tissus végétaux de la rhizosphère (endophytes) de *T. geosingense*, une plante hyperaccumulatrice de nickel (Idris *et al.*, 2004) et, de plus, ces bactéries sont capables de réduire la toxicité du nickel chez la tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) (Madhaiyan *et al.*, 2007).

Par ailleurs, Chen *et al.* (2013) ont montré que l'inoculation avec *S. pasteurii* permet d'augmenter l'absorption et la bioaccumulation du cadmium du sol chez *B. vulgaris*. Ma *et al.* (2009) ont également montré que *B. cereus*, une bactérie résistante au nickel isolée de sol serpentinique (sol enrichi en nickel), augmente l'accumulation de nickel chez la moutarde brune (*Brassica juncea*). Enfin *V. fluvialis* est une bactérie résistante à plusieurs métaux de

transition et dont l'utilisation est envisagée pour la remédiation des eaux polluées par les métaux lourds (Shakoori et Muneer, 2002).

Nos résultats indiquent toutefois que ces bactéries n'expriment pas de protéines de type DING (en termes de non reconnaissance par les anticorps anti-DING de tabac et d'absence de protéines comportant une séquence DINGGG en position N-terminale) et ne seraient donc pas responsables de l'accumulation de ces protéines dans la graine de *P. gabriellae*. Cependant la présence de ces bactéries chez *P. gabriellae* permettrait de renforcer la tolérance au nickel de cette plante, notamment au niveau de la graine.

Dans une approche ne visant pas à isoler des bactéries potentiellement vivantes, nous avons mis en évidence la présence d'ADN correspondant à des β -protéobactéries du genre *Ralstonia*, proche de *Burkholderia*, dans les graines de *P. gabriellae*. Certaines espèces du genre *Ralstonia* ont été rapportées comme endophytes (Jimtha *et al.*, 2014), d'autres comme nodulantes sur *Mimosa* spp. et fixatrices d'azote (Chen *et al.*, 2003 ; Verma *et al.*, 2004) et sont par ailleurs fortement résistantes aux métaux (Goris *et al.*, 2001). De plus, différentes *Burkholderiaceae* sont connues pour être endophytes des plantes (Gonin *et al.*, 2013), notamment de *Psychotria* (Lemaire *et al.*, 2012), favorisant ainsi leur croissance sur sol ultramafique (Gonin *et al.*, 2013).

Deux espèces de *Burkholderiales*, *B. vietnamiensis* et *B. tropica*, ont été décrites comme fixatrices d'azote (Santos *et al.*, 2001 ; Reis *et al.*, 2004). Ainsi, l'identification de ces bactéries dans les graines de *P. gabriellae* pourrait être un indice d'une symbiose avec la plante, permettant la fixation d'azote atmosphérique. Connaissant la pauvreté en macro-éléments des sols ultramafiques, cette symbiose serait un avantage considérable au développement de la plante. Les bactéries de ce genre sont connues pour être très tolérantes aux métaux, notamment au nickel

Note de recherche

(Grass *et al.*, 2000 ; Lazzaro *et al.*, 2008 ; Kuffner *et al.*, 2010 ; Schwager *et al.*, 2012 ; Kost *et al.*, 2014). Il est également très intéressant de souligner que, (1) chez les plantes, l'oxalate est directement impliqué dans le recrutement de bactéries symbiotiques (Kost *et al.*, 2014), et (2) que les graines de *P. gabriellae* sont exceptionnellement riches en oxalate (Zongo, 2010).

Il s'agit à notre connaissance de la première description de la présence de telles bactéries dans les graines de plantes hyperaccumulatrices de nickel. Des expériences complémentaires permettront de préciser le rôle de ces bactéries dans l'exceptionnelle tolérance de *P. gabriellae* au nickel (Visioli *et al.*, 2014). Avec les méthodes actuelles de métagénomique (Barret *et al.*, 2015 ; Midha *et al.*, 2016), une caractérisation plus fine du microbiote associé aux graines de *P. gabriellae* est envisageable. Un séquençage complet de l'ADN du microbiome permettrait également de rechercher directement la présence d'ADN codant une protéine DING dans ce microbiome.

L'adaptation des plantes aux fortes concentrations en métaux, et particulièrement au nickel, fait l'objet d'une attention grandissante pour faire face aux problèmes de pollution des sols et de leur restauration et également aborder la question de la phytoremédiation (Salt *et al.*, 1998 ; Pilon-Smits, 2005 ; Ma *et al.*, 2016), du « *phytomining* », c'est-à-dire l'extraction de métaux lourds des sols en vue de leur concentration et réutilisation (Brooks *et al.*, 1998 ; Gleba *et al.*, 1999 ; Losfeld *et al.*, 2015 ; van der Ent *et al.*, 2015).

La Nouvelle-Calédonie, qui possède une flore parmi les plus riches en plantes hyperaccumulatrices de nickel, est un site d'étude à privilégier pour mieux caractériser les mécanismes adaptatifs développés pour faire face au stress nickélicifère (Jaffré *et al.*, 2013 ; Merlot *et al.*, 2014).

Remerciements

Ces travaux de recherche ont été rendus possibles grâce au financement de bourses de thèse à CZ et MV par la Province Sud de Nouvelle-Calédonie ainsi qu'au soutien financier des sociétés *Koniambo Nickel SAS* et *Bayer CropScience* que nous remercions vivement. Nous remercions également les Provinces Nord et Sud de Nouvelle-Calédonie pour l'utilisation du matériel végétal et les autorisations de collecte délivrées à cet effet. Nos plus vifs remerciements vont enfin à Françoise Corbineau, Université Pierre et Marie Curie, Paris, pour de nombreuses discussions et l'accueil de CZ et MV dans son laboratoire.

Données supplémentaires :

Cette Note contient des données supplémentaires accessibles à : <http://www.academie-agriculture.fr/publication/s/n3af>

Références

- Ahn S, Moniot S, Elia M, Chabrière E, Kim D, Scott K. 2007. Structure–function relationships in a bacterial DING protein. *FEBS Letters*, 581, 3455–3460.
- Ball G, Viarre V, Garvis S, Voulhoux R, Filloux A. 2012. Type II-dependent secretion of a *Pseudomonas aeruginosa* DING protein. *Research in Microbiology*, 163, 457-469.
- Barrabé L, Mouly A, Florence J. 2013. *Psychotriacae (Rubiaceae) neocaledonicarum specierum nomenclator*. *Adansonia*, 35, 281-357.
- Barret M, Briand M, Bonneau S, Preveaux A, Valiere S, Bouchez O, Hunault G, Simoneau P, Jacques M A. 2015.

Note de recherche

- Emergence shapes the structure of the seed microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 1257-1266.
- Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garciarrubio A, Campos F, Covarrubias AA. 2008. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiology*, 148, 6–24.
- Berna A, Bernier F, Chabrière E, Elias M, Scott K, Suh A. 2009a. For whom the bell tolls? DING proteins in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66, 2205–2218.
- Berna A, Bernier F, Chabrière E, Perera T, Scott K. 2008. DING proteins; novel members of a prokaryotic phosphate-binding protein superfamily which extends into the eukaryotic kingdom. *The International Journal of Biochemistry et Cell Biology*, 40, 170–175.
- Berna A, Bernier F, Scott K, Stuhlmüller B. 2002. Ring up the curtain on DING proteins. *FEBS Letters*, 524, 6–10.
- Berna A, Scott K, Chabrière E, Bernier F. 2009b. The DING family of proteins: ubiquitous in eukaryotes, but where are the genes?, *BioEssays*, 31, 570–580.
- Bernier F. 2013. DING proteins: numerous functions, elusive genes, a potential for health, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70, 3045-3056.
- Bernier F, Berna A. 2001. Germins and germin-like proteins: Plant do-all proteins. But what do they do exactly?, *Plant Physiology and Biochemistry*, 39, 545-554.
- Bevan M, Bancroft I, Bent E, Love K, Goodman H, Dean C., Bergkamp R, Dirkse W, Van Staveren M, Stiekema W, Drost L, Ridley P, Hudson S-A, Patel L, Murphy G, Piffanelli P, Wedler E, Wambutt R, Weitzenegger T, Pohl T M, Terry N, Gielen J, Villarreal R, De Clerk R, Van Montagu M, Lecharny A, Aubourg S, Gy I, Kreis M, Lao N, Kavanagh T, Hempel S, Kotter P, Entian K-D, Rieger M, Schaeffer M, Funk B, Mueller-Auer S, Silvey M, James R, Montfort A, Pons A, Puigdomenech P, Douka A, Voukelatou E, Milioni D, Hatzopoulos P, Piravandi E, Obermaier B, Hilbert H, Düsterhöft A, Moores T, Jones J D G, Eneva T, Palme K, Benes V, Rechman S, Ansorge W, Cooke R, Berger C, Delseny M, Voet M, Volckaert G, Mewes H-W, Klosterman S, Schueller C, Chalwatzis N. 1998. Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*, *Nature*, 391, 485–488.
- Boyd R S. 2004. Ecology of metal hyperaccumulation, *New Phytologist*, 162, 563–567.
- Boyd R S., Jaffré T. 2009. Elemental concentrations of eleven New Caledonian plant species from serpentine soils: elemental correlations and leaf-age effects, *Northeastern Naturalist*, 16, 93-110.
- Boyd R S, Wall M A, Jaffré T. 2006. Nickel levels in arthropods associated with Ni hyperaccumulator plants from an ultramafic site in New Caledonia, *Insect Science*, 13, 271–277.
- Bradshaw R A, Burlingame A L. 2005. From proteins to proteomics, *IUBMB Life*, 57, 267–272.
- Brooks R R, Chambers M F, Nicks L J, Robinson B H. 1998. Phytomining. *Trends in Plant Science*, 3, 359–362.
- Brooks R R, Lee J, Reeves R D, Jaffré T. 1977. Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants, *Journal of Geochemical Exploration*, 7, 49–57.
- Brown P H, Welch R M, Cary E E. 1987. Nickel. A micronutrient essential for higher plants, *Plant Physiology*, 85, 801–803.

Note de recherche

- Callahan D L, Roessner U, Dumontet V, De Livera A M, Doronila A, Baker A J M, Kolev S D. 2012. Elemental and metabolite profiling of nickel hyperaccumulators from New Caledonia. *Phytochemistry*, 81, 80–89.
- Castellana N E, Payne S H, Shen Z, Stanke M, Bafna V, Briggs, S P. 2008. Discovery and revision of *Arabidopsis* genes by proteogenomics, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 21034–21038.
- Catusse J., Strub J-M. Job C, Van Dorselaer A. Job D. 2008. Proteome-wide characterization of sugarbeet seed vigor and its tissue specific expression, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 10262–10267.
- Chabrière E., Elias M, Hiblot J, Djeghader A, Schwartz C, Rohr O, Schwartz C, Masson P. 2012. Les protéines DING : propriétés biochimiques, structurales et capacité à inhiber la réplication du virus VIH, *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 196, 693-704.
- Chen S, Chao L, Sun L, Sun T. 2013. Effects of bacteria on cadmium bioaccumulation in the cadmium hyperaccumulator plant *Beta vulgaris* var. *cicla* L., *International Journal of Phytoremediation*, 15, 477-487.
- Cherrier T, Elias M, Jeudy A, Gotthard G, Le Douce V, Hallay H, Masson P, Janossy A, Candolfi E, Rohr O, Chabrière E, Schwartz C. 2011. Human-Phosphate-Binding-Protein inhibits HIV-1 gene transcription and replication. *Virology Journal*, 8, 352.
- Clemens S, Palmgren M G, Krämer U. 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation, *Trends in Plant Science*, 7, 309–315.
- Cluzel D, Maurizot P, Collot J, Sevin B. 2012. An outline of the geology of New Caledonia; from Permian – Mesozoic Southeast Gondwanaland active margin to Cenozoic obduction and supergene evolution, *Episodes- Newsmagazine of the International Union of Geological Sciences*, 35, 72–86.
- Collombet J-M, Elias M, Gotthard G, Four E, Renault F, Joffre A, Baubichon D, Rochu D, Chabrière E. 2010. Eukaryotic DING proteins are endogenous: an immunohistological study in mouse tissues, *PLoS One*, 5, e9099.
- Corbinau F. 2012. Markers of seed quality: from present to future, *Seed Science Research*, 22, S61-S68.
- Darbinian N, Popov Y, Khalili K, Amini S. 2008. Creation of a bi-directional protein transduction system for suppression of HIV-1 expression by p27SJ, *Antiviral Research*, 79, 136–141.
- Darbinian N, Gomberg R, Mullen L, Garcia S, White M K, Khalili K, Shohreh Amini S. 2011. Suppression of HIV-1 transcriptional elongation by a DING phosphatase, *Journal of Cellular Biochemistry*, 112, 225–232.
- Darbinian-Sarkissian N, Darbinian A, Otte J, Radhakrishnan S, Sawaya B E, Arzumanyan A, Chipitsyna G, Popov Y, Rappaport J, Amini S, Khalili K. 2006. p27SJ, a novel protein in St John's Wort that suppresses expression of HIV-1 genome, *Gene Therapy*, 13, 288–295.
- Davis A P, Govaerts R, Bridson D M, Ruhsam M, Moat J, Brummitt N. 2009. A global assessment of distribution, diversity, endemism, and taxonomic effort in the *Rubiaceae*, *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 96, 68–78.
- Davis M A, Boyd R S, Cane J H. 2001. Host-switching does not circumvent the Ni-based defense of the Ni hyperaccumulator

Note de recherche

- Streptanthus polygaloides (Brassicaceae), *South African Journal of Science*, 97, 554–557.
- Diemer H, Elias M, Renault F, Rochu D, Contreras-Martel C, Schaeffer C, Van Dorsselaer A, Chabrière E. 2008. *Tandem use of X-ray crystallography and mass spectrometry to obtain ab initio the complete and exact amino acids sequence of HPBP, a human 38-kDa apolipoprotein*, *Proteins*, 71, 1708–1720.
- Djehader A, Aragones G, Darbinian N, Elias M, Gonzalez D, Garcia-Heredia A, Beltran-Debon R, Kaminski R, Gotthard G, Hiblot J, Rull A, Rohr O, Schwartz C, Alonso-Villaverde C, Joven J, Camps J, Chabrière E. 2012. The level of DING proteins is increased in HIV-infected patients: *in vitro* and *in vivo* studies. *PLoS One*, 7, e33062.
- Droux M, Ruffet M L, Douce R, Job D. 1998. Interactions between serine acetyltransferase and O-acetylserine (thiol) lyase in higher plants - Structural and kinetic properties of the free and bound enzymes, *European Journal of Biochemistry*, 255, 235-245.
- Dumas B, Freyssinet G, Pallett K E. 1995. Tissue-specific expression of germin-like oxalate oxidase during development and fungal infection of barley seedlings, *Plant Physiology*, 107, 1091-1096.
- Dure L, Crouch M, Harada J, Ho The, Mundy J, Quatrano R, Thomas T, Sung Z R. 1989. Common amino-acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants, *Plant Molecular Biology*, 12, 475-486.
- Elias M, Liebschner D, Gotthard G, Chabrière E. 2011. *Structural insights and ab initio sequencing within the DING proteins family*, *Journal of Synchrotron Radiation*, 18, 45-49.
- Eskew D L, Welch R M, Norvell W A. 1984. Nickel in higher plants, *Plant Physiology*, 76, 691–693.
- Faini M, Stengel F, Aebbersold R. 2016. The evolving contribution of mass spectrometry to integrative structural biology. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 27, 966-974.
- Foster J, Kim H U, Nakata P A. 2012. A previously unknown oxalyl-CoA synthetase is important for oxalate catabolism in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 24, 1217-1229.
- Galland M, Huguet R, Arc E, Cueff G, Job D, Rajjou L. 2014. Dynamic proteomics emphasizes the importance of selective mRNA translation and protein turnover during *Arabidopsis* seed germination, *Molecular and Cellular Proteomics*, 13, 252-268.
- Galland M, Job D, Rajjou L. 2012. The seed proteome web portal, *Frontiers in Plant Science*, 3, 98.
- Gallien S, Perrodou E, Carapito C, Deshayes C, Reytrat J M, Van Dorsselaer A, Poch O, Schaeffer C, Lecompte O. 2009. Ortho-proteogenomics: Multiple proteomes investigation through orthology and a new MS-based protocol, *Genome Research*, 19, 128-135.
- Gaspar T, Franck T, Bisbis B, Kevers C, Jouve L, Hausman J F, Dommes J. 2002. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures, *Plant Growth Regulation*, 37, 263-285.
- Gâteblé G. 2015. *Flore ornementale de Nouvelle-Calédonie*. Edition Au vent des îles, Pirae, Tahiti, Polynésie française, 624 p.
- Gleba D, Borisjuk N V, Borisjuk L G, Kneer R, Poulev A, Sarzhinskaya M, Dushenkov S, Logendra S, Gleba Y Y, Raskin I. 1999. Use of

Note de recherche

plant roots for phytoremediation and molecular farming, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 5973-5977.

Gonin M, Gensous S, Lagrange A, Ducouso M, Amir H, Jourand P. 2013. Rhizosphere bacteria of *Costularia* spp. from ultramafic soils in New Caledonia: diversity, tolerance to extreme edaphic conditions, and role in plant growth and mineral nutrition, *Canadian Journal of Microbiology*, 59, 164-174.

Gonzalez D, Richez M, Bergonzi C, Chabrière E, Elias M. 2014. Crystal structure of the phosphate-binding protein (PBP-1) of an ABC-type phosphate transporter from *Clostridium perfringens*, *Scientific Reports*, 4, 6636.

Goris J, De Vos P, Coenye T, Hoste B, Janssens D, Brim H, Diels L, Mergeay M, Kersters K, Vandamme P 2001. Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp nov., *Ralstonia metallidurans* sp nov. and *Ralstonia basilensis* Steinle 1998 emend, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1773-1782.

Grandcolas P, Murienne J, Robillard T, Desutter-Grandcolas L, Jourdan H, Guilbert E, Deharveng L. 2008. New Caledonia: a very old Darwinian island?, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 363, 3309-3317.

Grass G, Grosse C, Nies D H. 2000. Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant from *Ralstonia* sp. strain CH34, *Journal of Bacteriology*, 182, 1390-1398.

Griffaut B, Debiton E, Madelmont J C, Maurizis J C, Ledoigt G. 2007. Stressed Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus* L.) excrete a protein fraction with specific

cytotoxicity on plant and animal tumour cell, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770, 1324-1330.

Hanson B, Lindblom S D, Loeffler M L, Pilon-Smits E A H. 2004. Selenium protects plants from phloem-feeding aphids due to both deterrence and toxicity, *New Phytologist*, 162, 655-662.

Hara M, Fujinaga M, Kuboi T. 2005. Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains, *Journal of Experimental Botany*, 56, 2695-2703.

Hochuli E, Dobeli H, Schacher A. 1987. *New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighboring histidine-residues*, *Journal of Chromatography*, 411, 177-184.

Hwang J U, Song W Y, Hong D, Ko D, Yamaoka Y, Jang S, Yim S, Lee E, Khare D, Kim K, Palmgren M, Yoon H S, Martinoia E, Lee Y. 2016. Plant ABC transporters enable many unique aspects of a terrestrial plant's lifestyle, *Molecular Plant*, 9, 338 - 355.

Idris R, Trifonova R, Puschenreiter M, Wenzel W W, Sessitsch A. 2004. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*, *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2667-2677.

Ingle R A, Mugford S T, Rees J D, Campbell M M, Smith A C. 2005. Constitutively high expression of the histidine biosynthetic pathway contributes to nickel tolerance in hyperaccumulator plants, *Plant Cell*, 17, 2089-2106.

Isnard S, L'Huillier L, Rigault F, Jaffré T. 2016. How did the ultramafic soils shape the flora of the New Caledonian hotspot?, *Plant and Soil*, 403, 53-76

Note de recherche

- Jaffré T, Morat P, Veillon J-M. 1994. Caractéristiques et composition floristique des principales formations végétales, *Bois et Forêts des Tropiques*, 242, 7–30.
- Jaffré T, Pillon Y, Thomine S, Merlot S. 2013. The metal hyperaccumulators from New Caledonia can broaden our understanding of nickel accumulation in plants, *Frontiers in Plant Science*, 4, 279.
- Jaffré T, Schmid M. 1974. Accumulation du nickel par une rubiacée de Nouvelle-Calédonie, *Psychotria douarrei* (G. Beauvisage), *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, 278, 1727–1730.
- Jacques M-A, Durand K, Orgeur G, Balidas S, Fricot C, Bonneau S, Quilévéré A, Audusseau C, Olivier V, Grimault V, Mathis R. 2012. Phylogenetic analysis and polyphasic characterization of *Clavibacter michiganensis* strains isolated from tomato seeds reveal that non-pathogenic strains are distinct from *C. michiganensis* subsp. *Michiganensis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 8388–8402.
- Jiang N, Wiemels R E, Soya A, Whitley R, Held M, Faik A. 2016. Composition, assembly, and trafficking of a wheat xylan synthase complex, *Plant Physiology*, 170, 1999–2023.
- Jimtha J C, Smitha P V, Anisha C, Deepthi T, Meekha G, Radhakrishnan E K, Gayatri G P, Remakanthan A. 2014. Isolation of endophytic bacteria from embryogenic suspension culture of banana and assessment of their plant growth promoting properties, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 118, 57–66.
- Johnson-Flanagan A M, McLachlan G. 1990. The role of chlorophyllase in degreening canola (*Brassica napus*) seeds and its activation by sublethal freezing. *Physiologia Plantarum*, 80, 460–466.
- Jozefczak M, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A. 2012. Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 3145–3175.
- Kang J, Park J, Choi H, Burla B, Kretzschmar T, Lee Y, Martinoia E. 2011. Plant ABC transporters. *Arabidopsis Book*, 9, e0153.
- Kermode A R. 1997. Approaches to elucidate the basis of desiccation-tolerance in seeds, *Seed Science Research*, 7, 75–95.
- Kersten W J, Brooks R R, Reeves R D, Jaffré T. 1980. Nature of nickel complexes in *Psychotria douarrei* and other nickel-accumulating plants, *Phytochemistry*, 19, 1963–1965.
- Kim D Y, Bovet L, Kushnir S, Noh E W, Martinoia E, Lee Y. 2006. AtATM3 is involved in heavy metal resistance in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 140, 922–932.
- Kim D Y, Bovet L, Maeshima M, Martinoia E, Lee Y. 2007. The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance, *Plant Journal*, 50, 207–218.
- Kost T, Stopnisek N, Agnoli K, Eberl L, Weisskopf L. 2014. Oxalotrophy, a widespread trait of plant-associated Burkholderia species, is involved in successful root colonization of lupin and maize by *Burkholderia phytofirmans*, *Frontiers in Microbiology*, 4, 421.
- Kramer U, CotterHowells J D, Charnock J M, Baker A J M, Smith J A C. 1996. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel, *Nature*, 379, 635–638.
- Kuffner M, De Maria S, Puschenreiter M, Fallmann K, Wieshammer G, Gorfer M, Strauss J, Rivelli A R, Sessitsch A. 2010. Culturable bacteria from Zn- and Cd-

Note de recherche

- accumulating *Salix caprea* with differential effects on plant growth and heavy metal availability, *Journal of Applied Microbiology*, 108, 1471-1484.
- L'Huillier L, Jaffré T, Wulff A. 2010. *Mines et environnement en Nouvelle-Calédonie: les milieux sur substrats ultramafiques et leur restauration*. IAC, p. 412. Nouméa.
- Lane B G. 1991. Cellular desiccation and hydration - Developmentally regulated proteins, and the maturation and germination of seed embryos, *FASEB Journal*, 5, 2893-2901.
- Lane B G. 2002. Oxalate, germins, and higher-plant pathogens, *IUBMB Life*, 53, 67-75.
- Lane T S, Rempe C S, Davitt J, Staton M E, Peng Y, Soltis D E, Melkonian M, Deyholos M, Leebens-Mack J H, Chase M, Rothfels C J, Stevenson D, Graham S W, Yu J, Liu T, Pires J C, Edger P P, Zhang Y, Xie Y, Zhu Y, Carpenter E, Wong G K, Stewart C N Jr. 2016. Diversity of ABC transporter genes across the plant kingdom and their potential utility in biotechnology, *BMC Biotechnology*, 16, 47.
- Lazzaro A, Widmer F, Sperisen C, Frey B. 2008. Identification of dominant bacterial phylotypes in a cadmium-treated forest soil, *FEMS Microbiology Ecology*, 63, 143-155.
- Lee J Y, Yang J G, Zhitnitsky D, Lewinson O, Rees D C. 2014. Structural basis for heavy metal detoxification by an Atm1-type ABC exporter, *Science*, 343, 1133-1136.
- Lemaire B, Lachenaud O, Persson C, Smets E, Dessein S. 2012. Screening for leaf-associated endophytes in the genus *Psychotria* (*Rubiaceae*), *FEMS Microbiology Ecology*, 81, 364-372.
- Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul J M, Baudry A, Pourcel L, Nesi N, Caboche M. 2006. Genetics and biochemistry of seed flavonoids, *Annual Review of Plant Biology*, 57, 405-430.
- Lewis A P, Crowther D. 2005. *DING proteins are from Pseudomonas*, *FEMS Microbiology Letters*, 252, 215-222.
- Li Z S, Lu Y P, Zhen R G, Szczypka M, Thiele D J, Rea P A. 1997. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato) cadmium, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 42-47.
- Losfeld G, L'Huillier L, Fogliani B, Jaffré T, Grison C. 2015. Mining in New Caledonia: environmental stakes and restoration opportunities, *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 5592-5607.
- Ma Y, Rajkumar M, Freitas H. 2009. Improvement of plant growth and nickel uptake by nickel resistant-plant-growth promoting bacteria, *Journal of Hazardous Materials*, 166, 1154-1161.
- Ma Y, Rajkumar M, Zhang C, Freitas H. 2016. Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation, *Journal of Environmental Management*, 174, 14-25.
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Sa T. 2007. Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L), *Chemosphere*, 69, 220-228.
- Mari S, Gendre D, Pianelli K, Ouerdane L, Lobinski R, Briat J-F, Lebrun M, Czernic P. 2006. Root-to-shoot long-distance circulation of nicotianamine and nicotianamine-nickel chelates in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *Journal of Experimental Botany*, 57, 4111-4122.

Note de recherche

- McAlister R L, Kolterman D A, Pollard A J. 2015. Nickel hyperaccumulation in populations of *Psychotria grandis* (Rubiaceae) from serpentine and non-serpentine soils of Puerto Rico, *Australian Journal of Botany*, 63, 85–91.
- Membré N, Bernier F, Staiger D, Berna A. 2000. *Arabidopsis thaliana* germin-like proteins: common and specific features point to a variety of functions, *Planta*, 211, 345–354.
- Merlot S, Hannibal L, Martins S, Martinelli L, Amir H, Lebrun M, Thomine S. 2014. The metal transporter PgIREG1 from the hyperaccumulator *Psychotria gabriellae* is a candidate gene for nickel tolerance and accumulation, *Journal of Experimental Botany*, 65, 1551-1564.
- Midha S, Bansal K, Sharma S, Kumar N, Patil P P, Chaudhry V, Patil P B. 2016. Genomic resource of rice seed associated bacteria, *Frontiers in Microbiology*, 6, 1551.
- Miernyk J A, Hajduch M. 2011. Seed proteomics, *Journal of Proteomics*, 74, 389-400.
- Mittermeier RA, Gil PR, Hoffman M, Pilgrim J, Brooks T, Mittermeier CG, Lamoreux J, da Fonseca GAB, Seligmann PA, Ford H. 2004. *Hotspots revisited*. (CEMEX, Ed.) (p. 390). Mexico: Conservation International.
- Morales R, Berna A, Carpentier P, Contreras-Martel C, Renault F, Nicodeme M, Chesne-Seck M L, Bernier F, Dupuy J, Schaeffer C, Chabrière E. 2007. Discovery and crystallographic structure of human apolipoprotein, *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 65, 98–107.
- Morales R, Berna A, Carpentier P, Contreras-Martel C, Renault F, Nicodeme M, Chesne-Seck M-L, Bernier F, Dupuy J, Schaeffer C, Diemer H, Van Dorsselaer A, Fontecilla-Camps J C, Masson P, Rochu D, Chabrière E. 2006. *Serendipitous discovery and X-ray structure of a human phosphate binding apolipoprotein*, *Structure*, 14, 601–609.
- Munzinger J, Morat Ph, Jaffré T, Gâteblé G, Pillon Y, Tronchet F, Veillon J-M, Chalopin M. 2016. *FLORICAL: Checklist of the vascular indigenous flora of New Caledonia*. vers. 22.IV.2016.
<http://www.botanique.nc/herbier/florical>
- Myers N, Mittermeier R A, Mittermeier C G, da Fonseca G A B, Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities, *Nature*, 403, 853–858.
- Nakajima S, Ito H, Tanaka R, Tanaka A. 2012. Chlorophyll b reductase plays an essential role in maturation and storability of *Arabidopsis* seeds, *Plant Physiology*, 160, 261–273.
- Nesvizhskii A I. 2014. Proteogenomics: concepts, applications and computational strategies, *Nature Methods*, 11, 1114-1125.
- Osborne T B. 1924. *The vegetable proteins* (2nd edition, p. 125). London Longmans, Green and Co.
- Pantazaki A A., Tsolkas G P, Kyriakidis D A. 2008. A DING phosphatase in *Thermus thermophilus*, *Amino acids*, 34, 437–448.
- Pelletier B. 2007. *Geology of the New Caledonia region and its implications for the study of the New Caledonian biodiversity*. In Payri CE et Richer de Forges B (Eds), *Compendium of marine species of New Caledonia*, IRD Nouméa, 19–32.
- Perera T, Berna A, Scott K, Lemaitre-Guillier C, Bernier F. 2008. Proteins related to St. John's Wort p27SJ, a suppressor of HIV-1 expression, are ubiquitous in plants, *Phytochemistry*, 69, 865–872.

Note de recherche

- Perrier N, Colin F, Jaffré T, Ambrosi J-P, Rose J, Bottero J-Y. 2004. Nickel speciation in *Sebertia acuminata*, a plant growing on a lateritic soil of New Caledonia, *Comptes Rendus Géosciences*, 336, 567–577.
- Pilon-Smits E. 2005. Phytoremediation, *Annual Review of Plant Biology*, 56, 15-39.
- Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, Lelong C. 2010. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future, *Journal of Proteomics*, 73, 2064–2077.
- Rajjou L, Debeaujon I. 2008. Seed longevity: survival and maintenance of high germination ability of dry seeds, *Comptes Rendus Biologies*, 331,796-805.
- Rajjou L, Duval M, Gallardo K, Catusse J, Bally J, Job C, Job D. 2012. Seed germination and vigor, *Annual Review of Plant Biology*, 63, 507–533.
- Rajjou L, Gallardo K, Debeaujon I, Vandekerckhove J, Job C, Job D. 2004. The effect of alpha-amanitin on the Arabidopsis seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination, *Plant Physiology*, 134, 1598–1613.
- Ravanel S, Gakière B, Job D, Douce R. 1998. The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 7805-7812.
- Reeves R D. 1992. In Baker AJM, Proctor J, Reeves RD (Eds) *The vegetation of ultramafic (Serpentine) soils*, Intercept, Andover, Hampshire, UK, 1992) ch. 20, 253 p.
- Reeves R D, Baker J M. 1984. Studies on metal uptake by plants from serpentine and non-serpentine populations of *Thlaspi goesingense* Halácsy (Cruciferae), *New Phytologist*, 98, 191–204.
- Reis V M, Estrada-de los Santos P, Tenorio-Salgado S, Vogel J, Stoffels M, Guyon S, Mavingui P, Baldani V L D, Schmid M, Baldani J I, Balandreau J, Hartmann A, Caballero-Mellado J. 2004. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 2155–2162.
- Sachdeva R, Darbinian N, Khalili K, Amini S, Gonzalez D, Djeghader A, Chabrière E, Suh A, Scott K, Simm M. 2013. DING proteins from phylogenetically different species share high degrees of sequence and structure homology and block transcription of HIV-1 LTR promoter, *PLoS One*, 8, e69623.
- Sachdeva R, Li Y, Shilpi RY, Simm M. 2015. Human X-DING-CD4 mediates resistance to HIV-1 infection through novel paracrine-like signaling, *FEBS Journal*, 282, 937-950.
- Sagner S, Kneer R, Wanner G, Cosson JP, Deus-Neumann B, Zenk MH. 1998. Hyperaccumulation, complexation and distribution of nickel in *Sebertia acuminata*, *Phytochemistry*, 47, 339–347.
- Salt D E, Smith R D, Raskin I. 1998. Phytoremediation, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 643-668.
- Santos PEL, Bustillos-Cristales R, Ecologi P D. 2001. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution, *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2790–2798.
- Schevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, 68, 850–858.

Note de recherche

- Schulze W X, Usadel B. 2010. Quantitation in mass-spectrometry-based proteomics, *Annual Review of Plant Biology*, 61, 491-516.
- Schwager S, Lumjiaktase P, Stöckli M, Weisskopf L, Eberl L. 2012. The genetic basis of cadmium resistance of *Burkholderia cenocepacia*, *Environmental Microbiology Reports*, 4, 562-568.
- Scott K, Wu L. 2005. Functional properties of a recombinant bacterial DING protein: comparison with a homologous human protein, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1744, 234-244.
- Seregin I V, Kozhevnikova A D. 2006. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants, *Russian Journal of Plant Physiology*, 53, 257-277.
- Shakoori AR, Muneer B. 2002. Copper-resistant bacteria from industrial effluents and their role in remediation of heavy metals in wastewater, *Folia Microbiologica*, 47, 43-50.
- Sharma A, Dhiman A. 2013. Nickel and cadmium toxicity in plants, *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, 2, 20-24.
- Sharma SS, Dietz KJ. 2009. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance, *Trends in Plant Science*, 14, 43-50.
- Shewry PR, Napier JA, Tatham A S. 1995. Seed storage proteins: structures' and biosynthesis. *Plant Cell*, 7, 945-956.
- Singh S, Parihar P, Singh R, Singh V P, Prasad S M. 2015. Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1143.
- Sirhindi G, Mir M A, Abd-Allah E F, Ahmad P, Gucel S. 2016. Jasmonic acid modulates the physio-biochemical attributes, antioxidant enzyme activity, and gene expression in Glycine max under nickel toxicity. *Frontiers in Plant Science*, 7, Article Number: 591.
- Sirko A, Brodzik R. 2000. Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochimica Polonica*, 47, 1189-1195.
- Suh A, Le Douce V, Rohr O, Schwartz C, Scott K. 2013. *Pseudomonas* DING proteins as human transcriptional regulators and HIV-1 antagonists. *Virology Journal*, 10, 234.
- Svensson J, Palva E T, Welin B. 2000. Purification of recombinant *Arabidopsis thaliana* dehydrins by metal ion affinity chromatography. *Protein Expression and Purification*, 20, 169-178.
- Szczyпка M S, Wemmie J A, Moye-Rowley W S, Thiele D J. 1994. A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 22853-22857.
- Thakur S, Sharma S S. 2016. Characterization of seed germination, seedling growth, and associated metabolic responses of *Brassica juncea* L. cultivars to elevated nickel concentrations. *Protoplasma*, 253, 571-580.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 4350-4354.
- Tunnacliffe A, Wise M J. 2007. The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*, 94, 791-812.
- Van der Ent A, Baker AJM, Reeves R, Chaney RL, Anderson CWN, Meech JA,

Note de recherche

- Erskine PD, Simonnot MO, Vaughan J, Morel J L, Echevarria G, Fogliani B, Qiu R L, Mulligan D. R. 2015. Agromining: farming for metals in the future?, *Environmental Science et Technology*, 49, 4773-4780.
- Verbruggen N, Hermans C, Schat H. 2009. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist*, 181, 759-776.
- Verma S C, Chowdhury S P, Tripathi A. K. 2004. Phylogeny based on 16S rDNA and nifH sequences of *Ralstonia taiwanensis* strains isolated from nitrogen-fixing nodules of *Mimosa pudica* India. *Canadian Journal of Microbiology*, 50, 313-322.
- Vignais PM, Colbeau A. 2004. Molecular biology of microbial hydrogenases. *Current Issues in Molecular Biology*, 6, 159-188.
- Visioli G, D'Egidio S, Sanangelanton A M. 2014. The bacterial rhizobiome of hyperaccumulators: future perspectives based on omics analysis and advanced microscopy. *Frontiers in Plant Science*, 5, 752.
- Wang W Q, Liu S J, Song S Q, Moller I M. 2015. Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor. *Plant Physiology and Biochemistry*, 86, 1-15.
- Wilkins M. 2009. Proteomics data mining. *Expert Review of Proteomics*, 6, 599-603.
- Woo E J, Dunwell J M, Goodenough P W, Marvier A C, Pickersgill R W. 2000. Germin is a manganese containing homohexamer with oxalate oxidase and superoxide dismutase activities. *Nature Structural Biology*, 7, 1036-1040.
- Wulff A S, Hollingsworth P M, Ahrends A, Jaffré T, Veillon J M, L'Huillier L, Fogliani B. 2013. Conservation priorities in a biodiversity hotspot: analysis of narrow endemic plant species in New Caledonia. *PLoS One*, 8, e73371.
- Yusuf M, Fariduddin Q, Hayat S, Ahmad A. 2011. Nickel: an overview of uptake, essentiality and toxicity in plants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86, 1-17.
- Zhang L, Angle J S, Chaney R L, Angle S. 2007. Do high-nickel leaves shed by the nickel hyperaccumulator *Alyssum murale* inhibit seed germination of competing plants?, *New Phytologist*, 173, 509-516.
- Zhang X X, Scott K, Meffin R, Rainey P B. 2007. Genetic characterization of PDSP encoding the DING protein in *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *BMC Microbiology*, 7, 114.
- Zheng Q, Cheng Z Z, Yang Z M. 2013. HISN3 mediates adaptive response of *Chlamydomonas reinhardtii* to excess nickel. *Plant and Cell Physiology*, 54, 1951-1962.
- Zongo C. 2010. *Données biologiques et physiologiques sur les semences de quelques espèces de milieux ultramaïques néo-calédoniens*. Thèse de Doctorat, Université de la Nouvelle-Calédonie, 228 p.

Edité par :

Christian Ferault, directeur de recherche honoraire à l'INRA, Membre de l'Académie d'Agriculture de France.

Rapporteurs :

Jean-François Briat, directeur de recherche de classe exceptionnelle du CNRS, ancien chef du département de biologie végétale de l'INRA, membre correspondant de l'Académie

Notes académiques de l'Académie d'agriculture de France
Academic Notes from the French Academy of Agriculture
(N3AF)

Note de recherche

d'agriculture de France.

Yvette Dattée, directeur de recherche honoraire de l'INRA, ancienne directrice du GEVES, membre de l'Académie d'agriculture de France.

Rubrique :

Cet article a été publié dans la rubrique « Notes de recherche » des *Notes Académiques de l'Académie d'agriculture de France*, 9, 1-37.

Reçu :

17 juillet 2016

Accepté :

4 octobre 2016

Publié :

25 octobre 2016

Citation:

Zongo C, Villegente M, Le Pessot L, Job C, Strub J-M, Van Dorsselaer A, Schaeffer-Reiss C, Bernier F, Berna A, Belghazi M, Jacques M-A, Amir H, Burtet-Sarramégna V, Rabier J, Fogliani B, Job D. 2016. Analyse protéomique des graines de *Psychotria gabriellae* (Baill.) Guillaumin, une plante endémique de la Nouvelle-Calédonie, en relation avec la tolérance au nickel. *Notes académiques de l'Académie d'Agriculture de France / Academic Notes from the French Academy of Agriculture (N3AF)*, 2(7), 1-37. <https://doi.org/10.58630/pubac.not.a264492>

Les auteurs :



Charly Zongo était chercheur à l'Institut agronomique néo-Calédonien. Il fut le premier Kanak à avoir soutenu une thèse en biologie à l'Université de la Nouvelle-Calédonie.



Matthieu Villegente est responsable de l'unité de Biologie moléculaire au service des laboratoires officiels vétérinaires, agroalimentaires et phytosanitaires de la Nouvelle-Calédonie.



Laurence Le Pessot a exercé le métier d'Ingénieur d'étude à l'INRA de Dijon. Après avoir travaillé pendant plusieurs années sur les protéines du goût, elle est actuellement Professeur de biologie à l'Institut Rondeaux – Idpces (Institut de Préparation au Concours et Etudes Supérieures) de Saint Briec.



Claudette Job est Ingénieur de recherche honoraire au CNRS. Domaines de recherche : physiologie végétale, développement des graines, biochimie des protéines, protéomique.

*Notes académiques de l'Académie d'agriculture de France
Academic Notes from the French Academy of Agriculture
(N3AF)*

Note de recherche



Jean-Marc Strub est Ingénieur de recherche au CNRS. Domaines de recherche : spectrométrie de masse des peptides et protéines, protéomique.



Alain Van Dorsselaer est Directeur de recherche émérite au CNRS. Il est responsable de la plate-forme protéomique Strasbourg Grand Est. Domaines de recherche : cancers, protéomique.



Christine Schaeffer-Reiss est Ingénieur de recherche au CNRS. Domaines de recherche : spectrométrie de masse des peptides et protéines, protéomique.



François Bernier est Professeur à l'Université de Strasbourg. Domaines de recherche : physiologie végétale, métabolisme, Germin-Like Proteins, oxalate oxydase, protéines DING de plantes, enzymes à cytochrome P450.



Anne Berna est Chargée de recherche au CNRS. Domaines de recherche : biosynthèse et fonctions essentielles de stéroïdes et d'autres isoprénoïdes végétaux, biochimie des protéines, germines et protéines DING végétales.



Maya Belghazi est Ingénieur de recherche au CNRS. Elle est responsable de la plate-forme de protéomique du Centre d'analyse protéomique de Marseille. Domaines de recherche : protéomique, quantification des protéines et des peptides, étude des interactomes.



Hamid Amir est Professeur à l'Université de la Nouvelle-Calédonie. Il est responsable du Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement (LIVE – EA 4243), Nouméa. Domaines de recherche : microbiologie, tolérance des plantes au nickel.



Marie-Agnès Jacques est Directeur de recherche à l'INRA. Elle est responsable de l'équipe EmerSys à l'Institut de Recherche en Horticulture et Semences (INRA, Angers). Domaines de recherche : microbiologie, santé des plantes, microbiote des graines.

Note de recherche



Valérie Burtet-Sarramégna est Maître de conférences en biochimie et biologie moléculaire à l'Université de la Nouvelle-Calédonie. Domaines de recherche : physiologie végétale, plantes endémiques de la Nouvelle-Calédonie.



Jacques Rabier est Maître de conférences à l'Université d'Aix-Marseille. Domaines de recherche : mécanismes physiologiques des interactions plantes-environnement, phytoremédiation, endomycorhizes, tolérance aux métaux lourds.



Bruno Fogliani est Chercheur HDR, directeur-adjoint de l'Institut Agronomique néo-Calédonien. Domaines de recherche : écophysiologie de la germination des plantes endémiques de la Nouvelle-Calédonie, conservation et restauration écologique.



Dominique Job est Directeur de recherche émérite au CNRS. Chercheur en physiologie végétale, ses travaux portent sur le développement et l'évolution des plantes, mettant en particulier en évidence la dynamique du protéome des graines.