



Etude du mode d'action d'un herbicide : l'Atrazine

MOTS-CLES

Activité enzymatique GST
Atrazine
Détoxification
Herbicides
Spinacia oleracea
Zea mays

RESUME

L'Atrazine est un produit phytosanitaire qui a été utilisé en tant qu'herbicide pendant de nombreuses années. Plusieurs études ont révélé qu'elle se lie à la protéine D1 du photosystème II et de ce fait, elle inhibe le transport des électrons nécessaire à la photosynthèse. Des réactions de détoxification ont été développées les plantes résistantes telles que la modification de la structure de la protéine D1 ou la formation d'un complexe avec la GSH qui modifie la conformation de l'herbicide. L'intérêt de ce TP a donc été de redécouvrir le mode d'action de l'Atrazine et de comprendre un mécanisme de détoxification en réalisant uniquement deux expériences majeures sur une plante sensible (Epinard, *Spinacia oleracea*) et une plante résistante (Maïs, *Zea mays*).

Introduction

L'Atrazine, ou 2-chloro-4-(éthylamine)-6-(isopropylamine)-s-triazine est un herbicide racinaire appartenant à la famille des triazines. C'est un produit phytosanitaire nocif et dangereux pour l'environnement qui a été interdit dans l'Union Européenne en 2004 mais qui a largement été utilisé comme traitement contre les « mauvaises herbes » ou adventices. En 1970, *Senecio vulgaris* L. a été la première plante résistante découverte et il a été très rapidement défini que sa résistance était due à une modification dans les propriétés du photosystème II et plus précisément une perte spécifique de la capacité à lier l'Atrazine [1]. D'après Smeda *et al.* [2], une mutation dans le gène *psbA*, qui encode la protéine Q_B, a été identifiée chez certaines espèces résistantes à l'Atrazine, comme la pomme de terre *Solanum tuberosum* L., et correspondrait à la substitution d'une sérine par une thréonine. Mais il existe également une autre méthode de détoxification qui a d'ailleurs été mise en évidence chez *Abutilon theophrasti* par Gronwald *et al.* en

1989. Dans ce cas, la résistance est due à une capacité de détoxification de l'Atrazine via la formation d'un complexe avec la GSH. Cette réaction est catalysée par une enzyme, la GST que l'on retrouve chez les mammifères, les insectes et les plantes. Elle est présente en grande concentration chez le Maïs ce qui explique sa tolérance à l'herbicide et sa facilité de détoxification [3].

Durant ces TP, nous avons voulu comprendre le mode de fonctionnement de l'Atrazine en réalisant deux expériences principale. Ensuite nous comparons nos résultats à ceux trouvés dans des publications scientifiques. Pour cela, nous avons tout d'abord déterminé *in vitro* le I₅₀ de l'Atrazine sur le transport photosynthétique des électrons dans les chloroplastes d'Epinard (plante sensible) puis nous avons mesuré l'activité enzymatique GST dans les racines et feuilles de plantules de Maïs afin d'étudier la réaction de détoxification dans une plante résistante.

Protocole expérimental

Détermination in vitro du I₅₀ de l'Atrazine sur le transport photosynthétique des électrons

Préparation des chloroplastes

Broyage des Epinards – Filtration – Centrifugation - Remise du culot en suspension - Maintien à l'obscurité

Dosage spectrophotométrique de la chlorophylle (= rendement)

Mesure de la DO à 645 et 663 nm

Quantification spectrophotométrique à 600 nm de la réduction du DCPIP

Concentration croissante en Atrazine

Détermination graphique du I₅₀

pour une plante sensible

Etude de la réaction de détoxication par la mesure de l'activité enzymatique GST, dans les racines et feuilles de plantules de Maïs

Extraction des protéines

Broyage des racines ou feuilles de Maïs

Dosage des protéines

Test de Bradford avec une gamme BSA et mesure de la DO à 595 nm

Mesure de l'activité enzymatique GST

Mesure de la DO à 340 nm avec utilisation du CDNB (coloré) comme xénobiotique

Résultats

Détermination du I₅₀ de l'Atrazine

Le dosage spectrophotométrique de la chlorophylle nous a tout d'abord permis de calculer la concentration totale en chlorophylle de notre suspension de chloroplastes qui était de 147,21 g/ml. Ce qui nous a permis de réaliser les dilutions nécessaires pour la mesure de l'intensité du transport d'électrons en présence de concentrations croissantes d'Atrazine.

Nous avons donc relevé l'augmentation de l'absorbance à 600 nm (Figure 1) grâce à la présence du DCPIP dans le milieu réactionnel. L'absorbance mesurée pour le tube témoin resté à l'obscurité est de 0,940, ce qui correspond à un transport des électrons dans les chloroplastes des feuilles d'Epinard de 100%. Il nous est donc possible de déterminer graphiquement la concentration d'Atrazine qui inhibe 50% de ce transport :

$$I_{50} = 0,35 \mu\text{M}$$

$$I_{50} \text{ (moyen)} = \mathbf{0,35 \pm 14 \mu\text{M}}$$

Dosage des protéines dans les feuilles et les racines de Maïs

Le dosage des protéines a été réalisé à partir d'une gamme étalon BSA (Figure 2). Les protéines sont détectées par spectrophotométrie à 595 nm grâce au réactif de Bradford qui contient du Bleu de Comassie qui forme des complexes aspécifiques avec les protéines. Sur le graphique on détermine la quantité de protéines présentes dans 10 et 20 μl d'extrait brut de feuilles et on obtient :

$$[\text{protéines}]_{\text{feuilles}} = 2,975 \text{ mg/ml}$$

$$[\text{protéines}]_{\text{feuilles}} \text{ (moyenne)} = \mathbf{3,76 \text{ mg/ml}}$$

Pour les racines, la même expérience a été réalisée et nous avons obtenu en moyenne à partir de la même gamme étalon :

$$[\text{protéines}]_{\text{racines}} \text{ (moyenne)} = \mathbf{1,1625 \text{ mg/ml}}$$

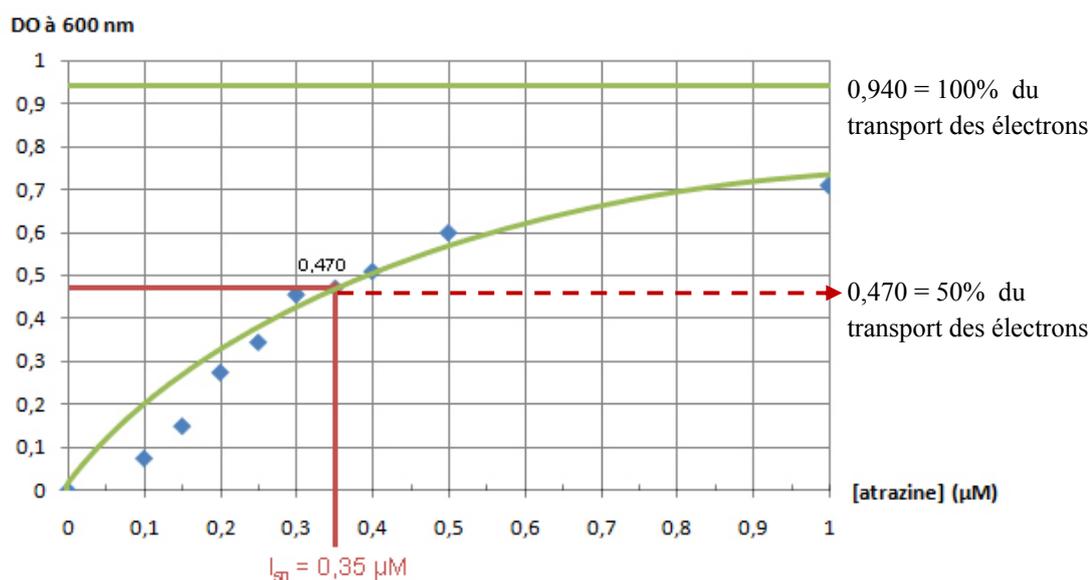


Figure 1 : Mesure de l'intensité du transport d'électrons en fonction de la concentration d'Atrazine
L'absorbance à 600 nm est mesurable par le suivi de la réduction du DCPIP par les électrons présents dans la suspension de chloroplastes. L'augmentation de l'absorbance est donc proportionnelle à la phytotoxicité de l'Atrazine.

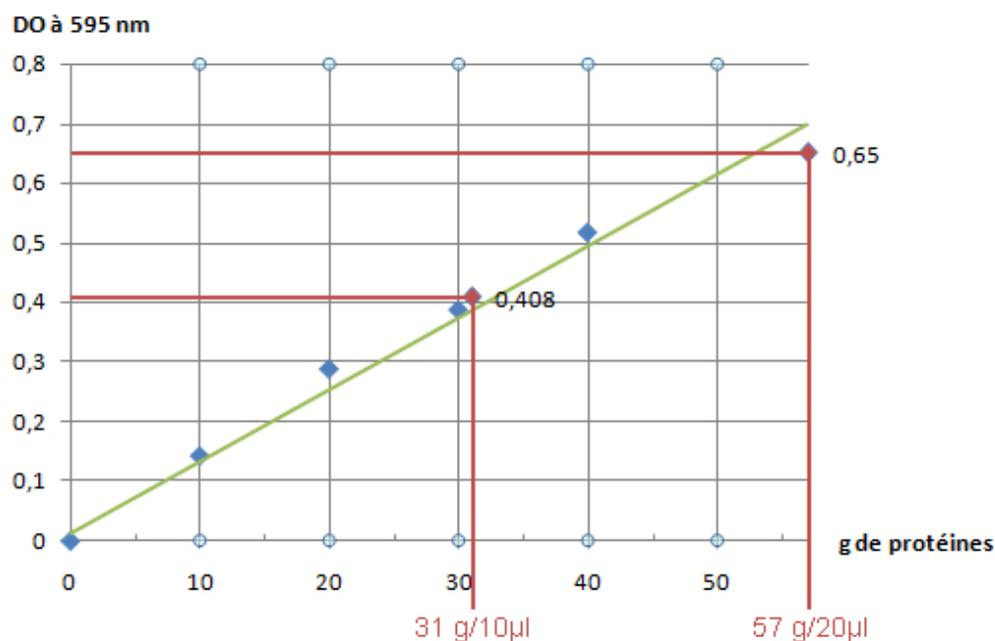


Figure 2 : Gamme étalon de l'absorbance à 595 nm du milieu réactionnel en fonction de la quantité de protéines

L'absorbance de 0,408 correspondant aux 10 µl d'extrait brut équivaut à 31 g de protéines soit à une concentration de 3,1 mg/ml d'extrait. L'absorbance de 0,650 correspondant aux 20 µl équivaut à 57 g de protéines soit une concentration de 2,85 mg/ml d'extrait. En moyenne on obtient donc une concentration en protéines de 2,975 mg/ml d'extrait.

Quantification de l'activité enzymatique GST

La formation du complexe entre le GSH et le CNDB est mesurée en spectrophotométrie à 340 nm. On obtient la droite de la figure 3 qui possède une pente de 0,0015 Δ DO/sec c'est-à-dire 0,0936 Δ DO/min. Grâce à la concentration en protéine calculée plus haut, on peut déterminer l'activité enzymatique de la GST comme suit (**3/0,1** étant le facteur de dilution) :

$$AE(GST) = \frac{\text{pente} \times 3 \times 10^3}{\epsilon \times l \times 0,1 \times [\text{protéines}]}$$

ϵ : coefficient d'extinction molaire du CNDB

$$\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

l : longueur de la cuve de spectrophotométrie

$$l = 1 \text{ cm}$$

On obtient donc dans le cas présent :

$$AE(GST)_{\text{feuilles}} = 98,32 \text{ nmol/min/mg de prot.}$$

Et en moyenne :

$$AE(GST)_{\text{feuilles}} = \mathbf{65,9 \text{ nmol/min/mg de prot.}}$$

$$AE(GST)_{\text{racines}} = \mathbf{562,5 \text{ nmol/min/mg de prot.}}$$

On constate donc que l'activité enzymatique de la GST est environ 10 fois plus grande dans les racines que dans les feuilles de Maïs.

Discussion

L'Atrazine est un produit phytosanitaire qui a été utilisé comme herbicide jusqu'à son interdiction en raison de sa toxicité pour l'environnement. Il est plus ou moins phytotoxique selon les plantes, certaines ayant même développées un mécanisme de résistance. La découverte de plantes tolérantes à l'Atrazine a d'ailleurs permis de comprendre le mécanisme d'action de celui-ci. Il a donc été établi que l'Atrazine perturbait la photosynthèse de la plante en se liant au site actif de la protéine D1 dans les thylakoïdes, de la même manière que le Diuron (Figure 4) [1]. De ce fait, la plastoquinone, qui est le substrat physiologique, ne pourra plus être réduite. L'Atrazine est donc responsable d'une inhibition compétitive avec la plastoquinone qui entraîne une accumulation d'électrons dans les chloroplastes en bloquant le photosystème II.

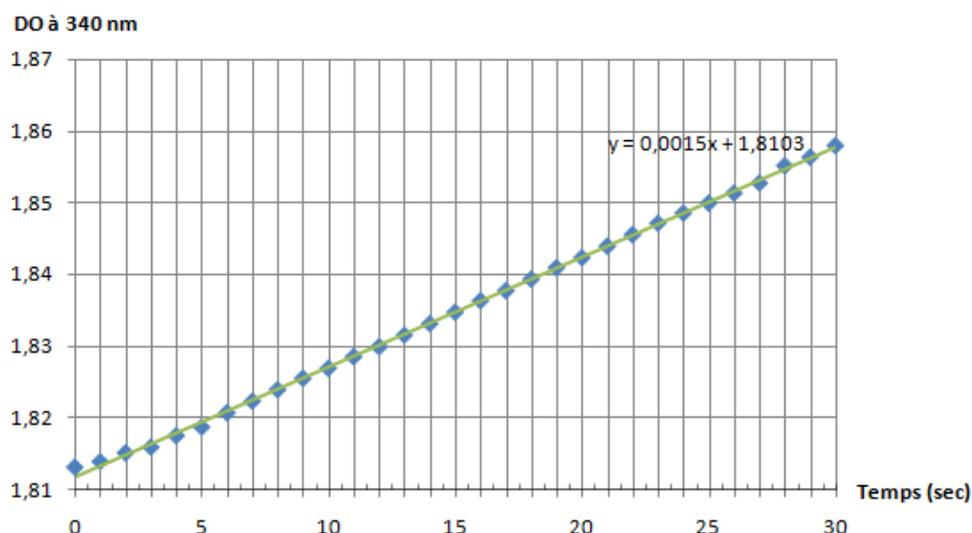


Figure 3 : Cinétique de la formation du complexe GSH-CNDB dans l'extrait protéique des feuilles de Maïs

La densité optique est mesurée au maximum d'absorbance du CNDB, substrat artificiel des GSTs. La pente de la droite nous permet de déterminer l'activité enzymatique GST.

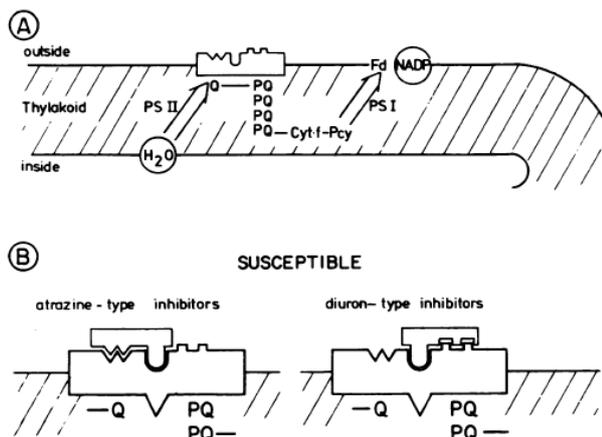


Figure 4 : Localisation de la liaison de l'Atrazine au niveau de la protéine D1 présente sur la membrane des thylakoïdes
 A : Présentation générale du site d'action de la photosynthèse avec la localisation du photosystème II (PSII) ; B : Site de fixation de l'Atrazine au niveau du PSII et comparaison avec le Diuron. [1]

Pour voir l'impact de l'Atrazine sur une plante, on peut calculer l' I_{50} . Il permet de connaître à quelle concentration l'Atrazine provoque la diminution de la moitié (50%) du phénomène étudié. Dans notre cas nous avons étudié le transport photosynthétique des électrons dans des chloroplastes d'Épinard et de Maïs. Expérimentalement pour l'Épinard (plante sensible à l'Atrazine), nous avons un I_{50} de 0,35 μM et 0,2 μM d'après le TD sur les herbicides. Ces valeurs sont cohérentes avec le fait qu'en général les plantes sensibles ont un faible I_{50} . Nous pouvons d'ailleurs observer ce phénomène pour *S. tuberosum* (Figure 5) [2] : l' I_{50} de la plante sensible est assez faible et la concentration d'herbicide nécessaire pour inhiber le transport photosynthétique des électrons est environ 250 fois plus élevée chez la plante résistante (103,5 μM) que la sensible (0,4 μM). Dans ce cas, on peut également conclure que la plante est devenue tolérante par une mutation de la cible.

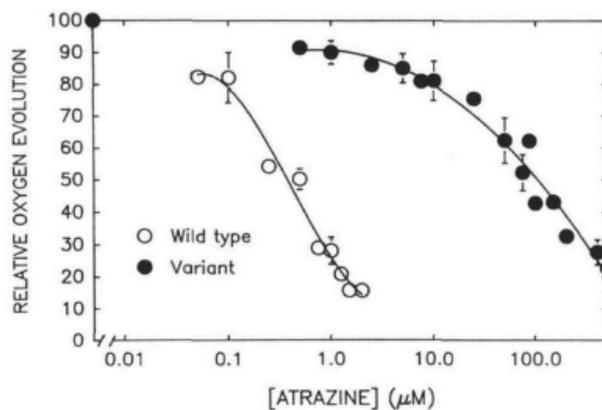


Figure 5 : Inhibition du transport des électrons dans des chloroplastes de *S. tuberosum* sensibles ou résistants à l'Atrazine. La mesure de l'oxygène reflète intensité de la photosynthèse et donc du transport des électrons. [2]

Au contraire, toujours d'après le TD, nous avons un I_{50} de 0,3 μM pour le Maïs, malgré le fait qu'il soit résistant. Ce faible résultat est comparable à celui obtenu pour *A. theophrasti* chez Gronwald J.W *et al.* (1989). En effet, ils ont réalisé la même détermination spectrophotométrique que nous pour mesurer l'intensité du transport des électrons en présence d'Atrazine. L'utilisation du DCPIP, qui est un accepteur d'électrons artificiel, permet de quantifier l'accumulation d'électron dans les chloroplastes due à l'effet de l'Atrazine : plus la concentration d'Atrazine est élevée dans le milieu, et plus il y a des électrons pour réduire le DCPIP et rendre la solution progressivement incolore (Figure 6).

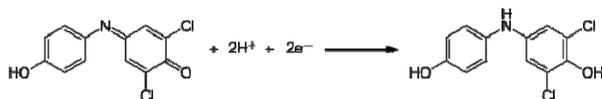


Figure 6 : Réaction de réduction du DCPIP. Le DCPIP oxydé est bleu alors que le composé réduit est incolore.

Ils ont pu observer que le facteur de tolérance de la protéine D1 était nul ($I_{50R} = I_{50S} = 0,18$

μM), ce qui signifie qu'il y a détoxification par la GST. C'est ce que nous avons mesuré grâce au CDNB dans la deuxième partie du protocole.

Les plantes ont développée une résistance contre tous les groupes majeurs d'herbicides, mais durant ce TP, nous nous sommes intéressés à la détoxification des herbicides par la formation d'un complexe avec le glutathion. En effet, des études ont montré que des cultures comme le Maïs possède une forte activité GST et qui est capable de détoxifier plusieurs herbicides ; il est donc intéressant de comprendre ce phénomène de détoxification. Comme pour *A. theophrasti*, le Maïs utilise la GST afin de former un complexe entre la GSH et le xénobiotique. La formation de ce complexe confère une autre conformation à l'herbicide qui n'est alors plus capable de se fixer à la place de la plastoquinone au niveau de la protéine D1. La complexation GSH-Atrazine constitue donc un mécanisme spécifique de détoxification mis en place par la plante pour devenir tolérante à l'herbicide dont la capacité peut être déterminée en mesurant l'activité enzymatique GST.

Nous avons utilisé un substrat artificiel des GSTs, le CDNB qui possède un maximum d'absorption à 340 nm. Il nous permet donc de détecter spectrophotométriquement l'activité enzymatique GST contrairement à l'Atrazine (Figure 7).

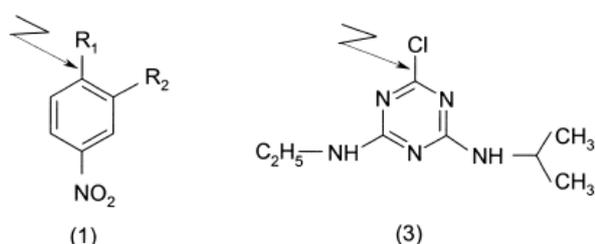


Figure 7 : Substrats de la glutathione S-transferase Les sites d'attaque de la GSH sont marqués par des flèches. [4]

1 : CDNB ($R_1 = \text{Cl}$, $R_2 = \text{NO}_2$) ; 3 : Atrazine

Nous avons pu constater que l'activité enzymatique GST était plus forte dans les racines que dans les feuilles de Maïs. Puisque l'Atrazine est un herbicide racinaire, il se pourrait que ce mécanisme permette à la plante d'effectuer une grande partie de la détoxification dans les racines pour éviter que l'herbicide ne s'attaque aux chloroplastes dans les feuilles.

Conclusion

Nous avons donc vu que l'Atrazine est un herbicide systémique ascendant, qui agit sur le transport des électrons lors de la photosynthèse au niveau du photosystème II. Il entre en compétition avec le substrat naturel de la protéine D1 (Figure 8), qui est la plastoquinone, et perturbe la synthèse de la chlorophylle, ce qui conduit à la mort de la plante.

Il possède une forte action phytotoxique sur les plantes sensibles comme les Epinards qui peut être mesurée grâce à l' I_{50} . Par contre, le Maïs est une plante résistante à l'Atrazine malgré son faible I_{50} . Comme nous avons pu le constater, cette tolérance peut être due à la forte concentration de GST présente dans cette plante, car elle catalyse la formation d'un complexe entre le glutathion et le xénobiotique. Le complexe ainsi formé possède une conformation telle qu'il ne peut plus se substituer à la plastoquinone. Par contre, la concentration en GSH dans la plante peut être un facteur limitant à cette réaction, c'est pourquoi lors de nos mesures, nous avons saturé le milieu en glutathion.

La mesure de l'activité enzymatique de la GST nous a permis de déterminer la capacité de la plante à se détoxifier grâce à ce système. Nous avons pu voir que cette activité était plus forte dans les racines que dans les feuilles, ce qui peut être bénéfique pour le Maïs puisque de cette manière il peut réduire la quantité

d'Atrazine qui arrive jusqu'aux chloroplastes des feuilles.

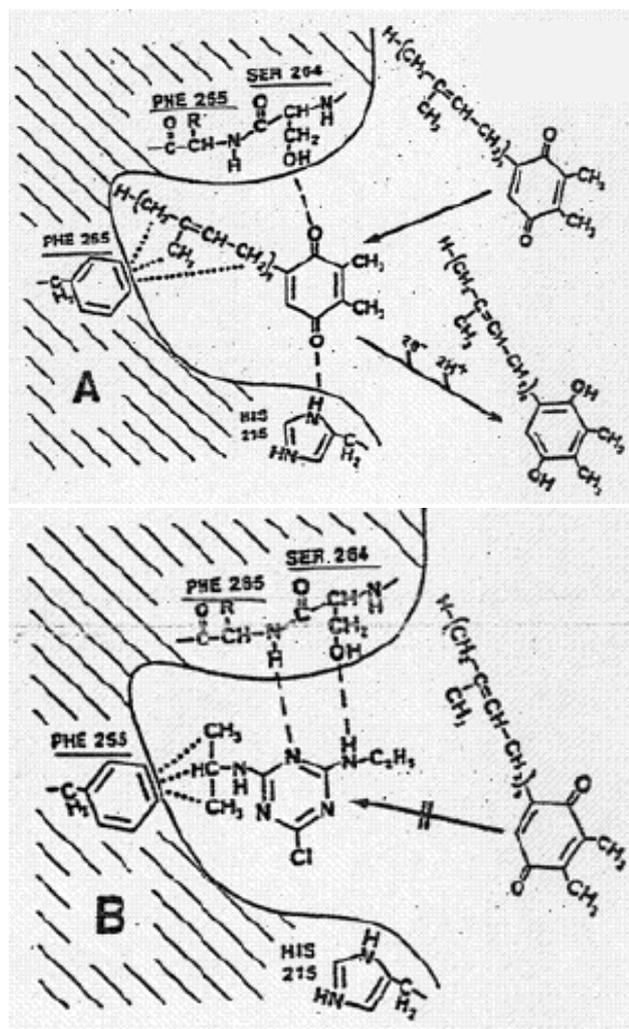


Figure 8 : Compétition entre l'Atrazine et la plastoquinone au niveau de la protéine D1 des thylakoïdes

A : domaine de liaison de la protéine D1 à la plastoquinone ; B : site d'action de l'Atrazine.

Mais la détoxification par la formation de complexe GSH-herbicide n'est pas la seule solution pour la plante. Il existe une autre méthode qui a été étudié sur *S. tuberosum* et qui correspond à la modification de la structure de la cible. Cette méthode empêche également au xénobiotique de se fixer sur sa cible.

Ces méthodes de détoxification ont été étudiées sur ces plantes envers l'Atrazine, mais elles ne sont pas forcément valables pour tous les herbicides. Par contre, la compréhension de ces phénomènes peut permettre de créer des espèces résistantes à un certain type de xénobiotique et donc d'être utilisées dans les domaines de la phytoremédiation.

Abréviations

- **Atrazine** : 2-chloro-4-(éthylamine)-6-(isopropylamine)-s-triazine ;
- **AE** : activité enzymatique ;
- **CDNB** : 1-chloro-2,4-dinitrobenzène ;
- **DCPIP** : 2,6-dichlorophénolindolphénol ;
- **GSH** : glutathion ;
- **GST** : Glutathion S-transférase ;
- **Q_B** : plastoquinone secondaire du photosystème II.

Références

1. **Pfister K., Radosevich S.R., Arntzen C.J.**, Modification of Herbicide Binding to Photosystem II in Two Biotypes of *Senecio vulgaris* L.. *Plant Physiol.* 64, 995-999 (1979)
2. **Smeda R.J., Hasegawa P.M., Goldsbrough P.B., Singh N.K., Weller S.C.**, A Serine-to-Threonine Substitution in the Triazine Herbicide-Binding Protein in Potato Cells Results in Atrazine Resistance without Impairing Productivity. *Plant Physiol.* 103, 911-917 (1993)
3. **Gronwald J.W., Anderson M.P.**, Atrazine Resistance in a Velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) Biotype Due to Enhanced Glutathione S-Transferase Activity. *Plant Physiol.* 96, 104-109 (1991)
4. **Pflugmacher S., Schröder P., Sandermann Jr. H.**, Taxonomic distribution of plant glutathione S-transferases acting on xenobiotics. *Phytochemistry* 54, 267-273 (2000)