

# La proline, un acide aminé multifonctionnel impliqué dans l'adaptation des plantes aux contraintes environnementales

Kilani Ben Rejeb<sup>1,2</sup>, Chedly Abdelly<sup>2</sup> et Arnould Savouré<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Physiologie Cellulaire et Moléculaire des Plantes, UR5, EAC 7180 CNRS, Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Case 156, 4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France

<sup>2</sup> Laboratoire des Plantes Extrêmophiles, Centre de Biotechnologie de Borj-Cedria (CBBC), BP 901, 2050 Hammam-Lif, Tunisie

Auteur correspondant : Arnould Savouré, [arnould.savoure@upmc.fr](mailto:arnould.savoure@upmc.fr)

Reçu le 9 octobre 2012

**Résumé** – Outre son rôle dans le métabolisme primaire en tant que constituant des protéines, la proline est l'un des solutés compatibles le plus fréquemment accumulé en réponse à des contraintes environnementales variées et joue un rôle important dans la tolérance des plantes. La proline a été proposée comme stabilisateur de protéines et de complexes macromoléculaires, piègeur de radicaux libres et régulateur du potentiel redox cellulaire. La concentration intracellulaire de la proline dépend d'une régulation fine entre sa biosynthèse et sa dégradation. Cependant le rôle exact de la proline et les voies de signalisation impliquées dans la régulation de son métabolisme ne sont pas encore complètement élucidés. L'étude du métabolisme de la proline chez les plantes modèles permettrait d'acquérir des informations quant aux mécanismes différentiels mis en œuvre par les plantes pour faire face aux contraintes environnementales et d'établir des outils pertinents pouvant être utilisés dans l'amélioration des plantes cultivées.

**Mots clés** : Contraintes environnementales / plantes / métabolisme de la proline / adaptation des plantes / signalisation cellulaire

**Abstract** – Proline, a multifunctional amino-acid involved in plant adaptation to environmental constraints.

In addition to its role in primary metabolism as a component of proteins, proline is one of the most widely distributed compatible solutes that accumulates in plants during adverse environmental constraints and plays an important role in plant stress tolerance. Proline was proposed to act as stabilizer for proteins and macromolecular complexes, scavenger of free radicals and regulator of cellular redox potential. Intracellular proline concentration depends on a tight regulation between its biosynthesis and catabolism. However the exact role of proline and the signaling pathways involved in the regulation of its metabolism are not completely known yet. Investigation of proline metabolism in model plants would allow to acquire information about the diversity of the mechanisms developed by plants to overcome environmental constraints and to establish some reliable tools for the improvement of crop tolerance.

**Key words**: Environmental constraints / plant / proline metabolism / plant adaptation / plant signalling

## Abréviations

ABA :	Acide Abscissique
ABRE :	<i>ABA Responsive Element</i>
bZIP :	<i>basic Leucine Zipper Protein</i>
ERO :	Espèces Réactives de l'Oxygène
GFP :	<i>Green Fluorescent Protein</i>
NADPH :	Nicotinamide Adénine Dinucléotide PHosphate
nat-siARN :	<i>natural antisense-small interfering RNA</i>
<sup>1</sup> O <sub>2</sub> :	oxygène singulet
OH <sup>•</sup> :	radical hydroxyle
P5C :	Pyroline-5-Carboxylate
P5CDH :	P5C DésHydrogénase
P5CR :	P5C Réductase
P5CS :	P5C Synthétase
PLCs :	PhosphoLipases C
PLDs :	PhosphoLipases D
PRE :	<i>Proline-Responsive-Element</i>
ProDH :	Proline DésHydrogénase
R2NO :	Radical proline-NitrOxyl
RH :	Réponse Hypersensible
SA :	Acide Salicylique
SOD :	SuperOxide Dismutase
SRO5 :	<i>Similar to Radical induced cell death One 5</i>
δOAT :	Ornithine Delta-AminoTransférase

## Introduction

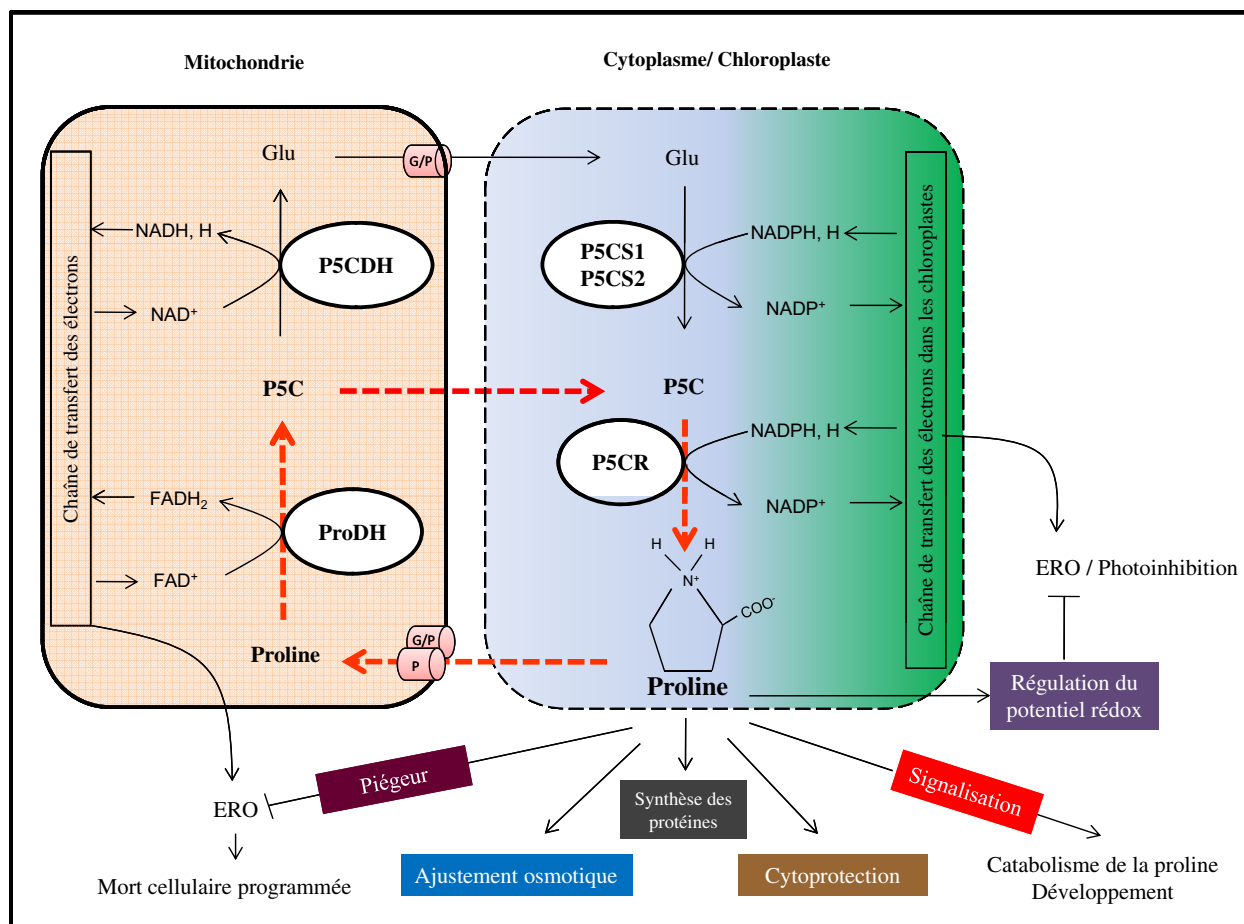
Les contraintes abiotiques, particulièrement la sécheresse et la salinité, sont celles qui sont les plus impliquées dans la limitation de la croissance des plantes et la productivité des cultures. Ces deux contraintes conduisent à un abaissement du potentiel hydrique du sol, avec en plus, dans le cas de la salinité, une accumulation d'ions toxiques pour les plantes. Pour faire face à ces contraintes, les plantes ont mis en place au cours de l'évolution divers mécanismes adaptatifs leur permettant notamment d'ajuster leur potentiel hydrique (Verslues *et al.*, 2006). Au niveau cellulaire, la tolérance des plantes au déficit hydrique implique notamment l'accumulation de solutés organiques dit compatibles car ils n'interfèrent pas avec les fonctions cellulaires. La proline est classée parmi les osmolytes les plus fréquemment accumulés chez un grand nombre d'espèces. Cependant, son accumulation chez les plantes peut aussi être le résultat d'autres facteurs environnementaux qui ne perturbent pas la balance osmotique tels que les contraintes biotiques. Il est aujourd'hui bien admis que la proline, outre sa contribution dans l'ajustement osmotique, a d'autres rôles (figure 1)

(Szabados & Savouré, 2010). La proline peut stabiliser les membranes et les complexes protéiques. Elle peut agir comme antioxydant, notamment grâce à sa capacité de piégeage des radicaux libres. Elle peut également intervenir dans la régulation du pH cytoplasmique ou servir de réserves carbonées et azotées que la plante utilisera postérieurement à la période du stress (Verslues & Sharma, 2010). Selon des données récentes, l'effet protecteur de la proline en condition de stress serait la conséquence des changements dans la régulation de son métabolisme et de ses propriétés intrinsèques. La biosynthèse et la dégradation de la proline sont impliquées dans la régulation du potentiel redox intracellulaire, le stockage d'énergie et son transfert (Sharma *et al.*, 2011). Cette revue résume l'état des connaissances actuelles sur la régulation du métabolisme de la proline et son importance dans la tolérance des plantes aux contraintes environnementales.

## Le métabolisme de la proline chez les plantes

Chez les plantes, la proline est synthétisée essentiellement à partir du glutamate (figure 1). Ce composé est d'abord phosphorylé puis réduit en pyroline-5-carboxylate (P5C) par la pyroline-5-carboxylate synthétase (P5CS). Le P5C est ensuite réduit en proline par la P5C réductase (P5CR). Lors d'un déficit hydrique, la proline est synthétisée dans le cytosol et les chloroplastes. Le catabolisme de cet acide aminé est localisé dans les mitochondries par l'action séquentielle de la proline déshydrogénase (ProDH) et la P5C déshydrogénase (P5CDH). Chez *Arabidopsis thaliana*, ils existent deux isoformes de P5CS codées par les gènes *P5CS1* et *P5CS2*, alors qu'un seul gène code pour la P5CR. Chez *A. thaliana*, deux gènes *ProDH1* et *ProDH2* codent pour deux isoformes de ProDH et un seul pour la P5CDH. En utilisant des plantes transformées exprimant P5CS1 fusionnée avec la GFP et des mutants nuls pour chacun des deux gènes *P5CS1* et *P5CS2*, Szekely *et al.* (2008) ont démontré qu'en condition normale la protéine P5CS1-GFP est localisée dans le cytosol, et que les contraintes osmotiques stimulent l'import de la protéine P5CS1-GFP dans les chloroplastes. En revanche, P5CS2-GFP se trouve localisée dans le cytosol.

La compartimentation du métabolisme de la proline implique un transport intracellulaire de la proline entre le cytosol, les chloroplastes et les mitochondries. Des systèmes de transport de type uniport ou antiport assurant respectivement le transport de la proline ou son échange avec le glutamate ont été mis en évidence dans les mitochondries de blé (Di Martino *et al.*, 2006).



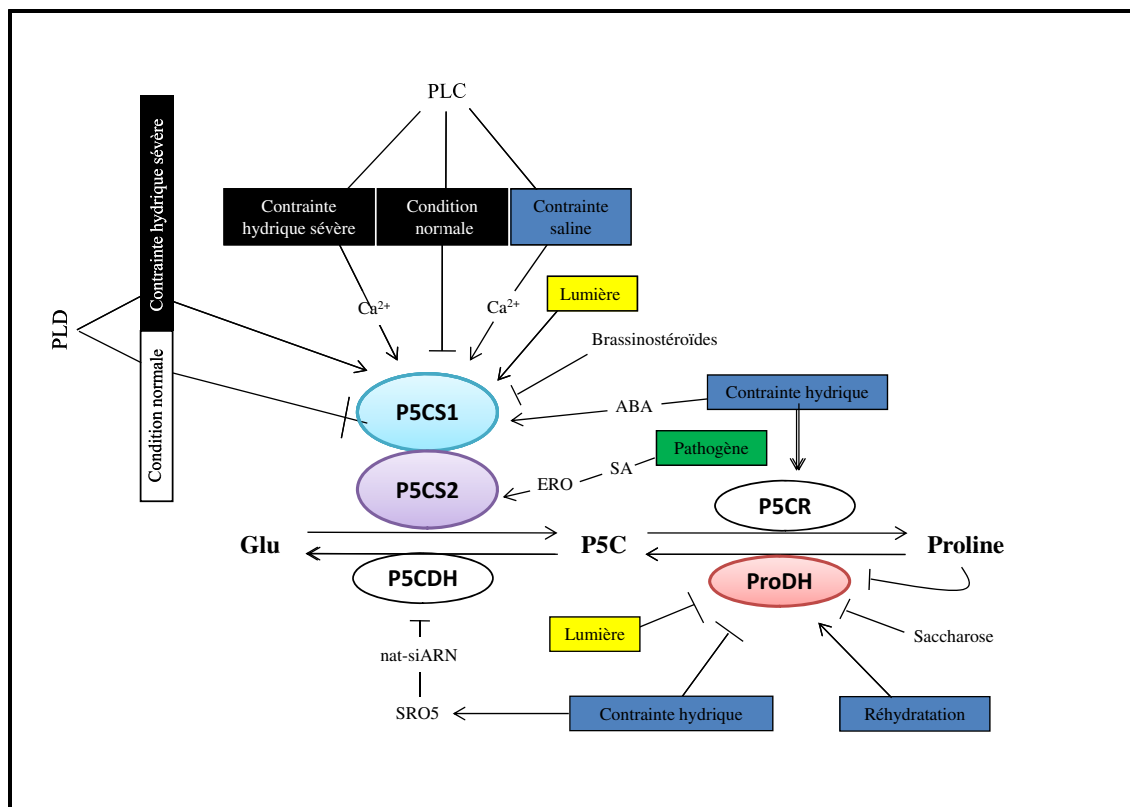
**Fig. 1.** Métabolisme de la proline et ses fonctions cellulaires. Le cycle P5C/proline est marqué par des flèches en pointillé, le P5C mitochondrial peut être recyclé en proline dans le cytoplasme par la P5CR sans produire du glutamate. Abréviations : ERO, espèces réactives de l'oxygène; FAD, Flavine Adénine Dinucléotide; G/P, Antiport Glutamate/Proline; Glu, Glutamate; NADP, Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate; P, Uniport Proline; P5C, Pyrroline-5-Carboxylate; P5CDH, P5C DésHydrogénase; P5CR, P5C Réductase; P5CS, P5C Synthétase; ProDH, Proline DésHydrogénase.

Cependant, les gènes codant pour ces transporteurs n'ont pas encore été identifiés.

## Régulation du métabolisme de la proline chez les plantes

Les concentrations intracellulaires en proline dépendent d'une régulation fine entre sa biosynthèse et son catabolisme. Les deux étapes limitantes du métabolisme de la proline se situent au niveau de sa biosynthèse, catalysée par la P5CS, et à celui de son catabolisme, catalysé par la ProDH. L'expression du gène *P5CS* et la répression simultanée du gène *ProDH* conduisent à une accumulation de la proline pendant le déficit hydrique, tandis que la réhydratation provoque une régulation opposée

(Peng *et al.*, 1996). Bien que les voies de signalisation impliquées dans la régulation du métabolisme de la proline ne soient pas encore complètement établies, les informations actuelles permettent de s'en faire une idée globale (figure 2). P5CS1 est régulée à la fois au niveau de sa transcription et de son activité qui peut être rétro-inhibée par la proline (Zhang *et al.*, 1995). L'expression de *P5CS1* est stimulée par la lumière (Hayashi *et al.*, 2000) ainsi que par le monoxyde d'azote (Zhao *et al.*, 2009) et réprimée par l'application de brassinostéroïdes (Abraham *et al.*, 2003). L'expression d'*AtP5CS1* en réponse à une contrainte hyperosmotique peut être induite par l'acide abscissique (ABA) à travers un élément *cis*, appelé *ABA Responsive Element* (ABRE) présent dans le promoteur du gène *P5CS1* (Strizhov *et al.*, 1997). Toutefois, l'expression de ce gène n'est pas



**Fig. 2.** Voies de signalisation impliquées dans la régulation du métabolisme de la proline. Ces voies ont été principalement caractérisées chez *Arabidopsis thaliana*. Les boîtes noires correspondent aux voies de signalisation récemment mises en évidence chez *Thellungiella salsuginea*, espèce modèle des halophytes. Les deux étapes limitantes du métabolisme de la proline se situent au niveau de sa biosynthèse catalysée par la P5CS et au niveau de son catabolisme catalysé par la ProDH. Abréviations : ABA, Acide Abscisique ; ERO, Espèces Réactives de l'Oxygène ; Glu, Glutamate ; nat-siARN, *natural antisense-small Interfering RNA* ;  $\delta$ OAT : Ornithine Delta-AminoTransférase ; P5C, Pyrroline-5-Carboxylate ; P5CS, P5C Synthétase ; PLC, PhosphoLipases C ; PLD, PhosphoLipases D ; ProDH, Proline DésHydrogénase. SA, Acide Salicylique ; SRO5, *Similar to Radical induced cell death One 5*.

toujours dépendante de l'ABA. En effet, Savouré *et al.* (1997) ont montré que l'induction de *P5CS1* se produit indépendamment de l'ABA. Cela a été confirmé récemment par Sharma & Verslues (2010) qui ont rapporté une expression ABA-indépendante d'*AtP5CS1*. Il a été également démontré que les phospholipases D (PLDs) sont des régulateurs négatifs du métabolisme de la proline en absence de contraintes chez *A. thaliana* (Thiery *et al.*, 2004) tandis que les PLCs, *via* la signalisation calcique, régulent positivement la biosynthèse de la proline lors d'une contrainte saline (Parre *et al.*, 2007). Récemment, Ghars *et al.* (2008a, 2012) ont mis en évidence l'implication de ces mêmes acteurs signalétiques PLCs et PLDs dans la régulation du métabolisme de la proline chez *Thellungiella salsuginea*, anciennement appelée *T. halophila*. Fait particulièrement intéressant, ces mêmes acteurs participent à la régulation du métabolisme de la proline chez cette halophyte de manière opposée par rapport à *Arabidopsis*. Les PLDs régulent

positivement la voie de biosynthèse de la proline en présence du stress alors que les PLCs exercent un contrôle négatif en absence ou en présence d'une contrainte saline modérée (200 mM NaCl) et un contrôle positif en présence d'une contrainte hyperosmotique (400 mM mannitol) ou d'une contrainte saline sévère (400 mM NaCl). Ce schéma de régulation démontre que les plantes natives des biotopes salins (halophytes) mettent en œuvre des voies de régulation et de signalisation différentes de celles observées chez les glycophytes.

Contrairement à *P5CS1*, l'expression de *P5CS2* semble peu régulée par les contraintes abiotiques. En revanche, les contraintes biotiques induisent l'accumulation des transcrits *P5CS2*. En réponse à l'attaque d'un pathogène, il a été démontré que chez *A. thaliana*, l'activation du gène *P5CS2* et la synthèse de proline sont régulées positivement par l'acide salicylique (SA) impliquant les espèces réactives de l'oxygène (ERO) comme signal intermédiaire

(Fabro *et al.*, 2004). *P5CS2* s'exprime également dans les cellules en division dans les *primordia* foliaires et les méristèmes (Szekely *et al.*, 2008).

En condition de déficit hydrique, l'expression de *ProDH* est inhibée. Lors de la réhydratation de la plante ou après un traitement par la proline, le catabolisme de cet acide aminé et en particulier l'expression de *ProDH* sont induits (Servet *et al.*, 2012). L'analyse du promoteur de *ProDH* et son induction par la proline ont conduit à l'identification d'un élément *cis* ACTCAT appelé *Proline-Response-Element* (PRE) (Satoh *et al.*, 2002). Cet élément est reconnu par des facteurs de transcription de type bZIP (*Basic Leucine Zipper Protein*), en particulier AtbZIP11 et AtbZIP53 (Satoh *et al.*, 2004). L'expression ectopique de bZIP11 chez *Arabidopsis* induit l'expression de *ProDH1* et *ProDH2* conduisant à la diminution des niveaux de proline (Hanson *et al.*, 2008). Hayashi *et al.* (2000) ont montré que chez *A. thaliana* les niveaux de proline et des transcrits *P5CS* et *ProDH* sont dépendants de la photopériode. À l'inverse de *P5CS1*, l'expression de *ProDH1* est inhibée par la lumière et induite par l'obscurité. En analysant le métabolisme de la proline à un stade précoce de la réponse hypersensible (RH) contre l'attaque par un agent pathogène chez *A. thaliana*, Cecchini *et al.* (2011) ont montré que l'activité *ProDH* est nécessaire au développement de la RH. L'induction de l'expression *ProDH1* est dépendante du SA.

Chez *A. thaliana*, Borsani *et al.* (2005) ont montré qu'en condition normale, le gène *P5CDH* est constitutivement exprimé. En condition de contrainte saline, le gène *SRO5* (dont la fonction n'est pas connue) est transcrit sur l'autre brin d'ADN du même locus pour donner un ARN partiellement complémentaire à *P5CDH*. L'hybridation des deux transcrits codants forme un ARN double brin qui est clivé pour produire un duplex nat-siARN (*natural antisense-small interfering RNA*). Ces nat-siARN vont cliver les transcrits *P5CDH* entraînant la diminution des niveaux des transcrits *P5CDH*. Cette régulation permet de réduire la dégradation de la proline afin de mieux répondre à la contrainte saline.

## Accumulation de la proline et tolérance aux contraintes environnementales

L'accumulation de la proline est l'une des stratégies adaptatives fréquemment observées chez un grand nombre d'espèces en réponse à des contraintes environnementales variées. Une corrélation positive entre cette accumulation et la tolérance à des contraintes hydriques a été rapportée dans de nombreux systèmes biologiques. Certaines halophytes comme *Sesuvium portulacastrum* (Slama *et al.*, 2006) et *Cakile maritima*

(Megdiche *et al.*, 2009) accumulent la proline à des niveaux particulièrement élevés. Ce comportement est concomitant d'une capacité d'osmorégulation quand ces halophytes sont soumises au sel et/ou à un déficit hydrique. *T. salsuginea* accumule la proline d'une manière constitutive. Sa grande aptitude à tolérer le sel (survie à plus de 500 mM NaCl) est corrélée à une hyperaccumulation de la proline, résultant d'une augmentation des niveaux de transcrits *P5CS* et d'une diminution de ceux de *ProDH* (Kant *et al.*, 2006). Bien que des différences inter- et intraspécifiques d'accumulation de la proline aient été mises en évidence chez les plantes et que la capacité d'hyperaccumulation de la proline accompagne le caractère de tolérance chez plusieurs plantes, certaines données suggèrent que l'accumulation de la proline est plutôt un symptôme de sensibilité. Les données acquises particulièrement sur le comportement de certains mutants plaident en faveur de cette hypothèse. Dans ce cadre, Liu & Zhu (1997) ont montré que le mutant *sos1* affecté dans un antiport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  est hypersensible à la présence de NaCl alors qu'il montre des teneurs en proline deux fois plus élevées que celles mesurées chez le sauvage. Le mutant *eskimo1*, qui suraccumule également la proline est moins tolérant au déficit hydrique et à la salinité que le sauvage (Ghars *et al.*, 2008b). Le mutant *p5cs1* d'*Arabidopsis* produit cinq fois moins de proline que le sauvage et présente une hypersensibilité à la présence de sel. L'ensemble de ces données suggère que le rôle de la proline dans l'osmotolérance est étroitement lié à l'espèce étudiée et que son accumulation ne confère pas toujours une adaptation à des conditions environnementales extrêmes, ce qui ouvre le débat sur le rôle exact de la proline.

## Rôles de la proline

De nombreuses études ont montré que la proline protège les plantes contre les contraintes environnementales en stabilisant la structure et les fonctions des macromolécules et des organites (Hare *et al.*, 1998). Il a été démontré que la proline peut fonctionner comme une molécule chaperonne capable de protéger l'intégrité des protéines et d'améliorer l'activité de certaines enzymes. Il a été proposé que la nature amphiphile de la proline lui permet de créer des liaisons hydrogène avec des molécules d'eau ou des macromolécules. Le noyau pyrrolidine forme une structure plane et hydrophobe alors que l'extrémité carboxyle constitue une partie hydrophile. Ainsi, l'accumulation de la proline pendant une contrainte hydrique permettrait de créer une sphère d'hydratation autour de la protéine, lui évitant ainsi d'être dénaturée (Schobert & Tschesche, 1978; Chadalavada, 1994). Il a été montré que la proline contribue à la conservation et à la stabilisation des enzymes et/ou des

protéines comme la RuBisCo (Solomon *et al.*, 1994) et le complexe II de la chaîne mitochondriale de transfert d'électrons (Hamilton & Heckathorn, 2001). Mishra & Dubey (2006) ont également montré un effet protecteur de la proline sur des ribonucléases et des protéases *in vitro* en présence d'arsenic.

La proline peut avoir aussi un rôle dans la détoxification des ERO. L'effet protecteur de la proline contre le radical hydroxyle (OH $\cdot$ ) a été rapporté par Smirnov & Cumbes (1989). Floyd & Nagi (1984) ont montré qu'un radical proline-nitroxyl (R $_2$ NO) peut être formé entre la proline et OH $\cdot$ . De plus la proline est capable de « quencher » efficacement *in vitro* l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) (Alia *et al.*, 2001). Hua & Guo (2002) ont montré que l'application exogène de proline améliore l'activité de la superoxyde dismutase dans les cals de soja en condition de contrainte saline. Une corrélation négative entre la peroxydation des lipides et l'accumulation de la proline a été observée chez la canne à sucre sur-exprimant le gène *P5CS1* provenant de *Vigna aconitifolia*, suggérant que l'accumulation de la proline pourrait agir en tant que composante du système de défense anti-oxydant et atténuer les effets délétères du stress oxydatif induit par les contraintes osmotiques. Dans le même contexte, la transformation de *Petunia hybrida* par *AtP5CS1* ou *OsP5CS* lui confère une plus grande capacité d'accumulation de la proline et une meilleure tolérance au déficit hydrique (Yamada *et al.*, 2005). Le mutant *p5cs1* affecté dans son accumulation de proline montre une réduction de l'activité anti-oxydante des enzymes clés du cycle ascorbate-gluthathion, conduisant à une hyper-accumulation des ERO et à une intensification des dommages oxydatifs (Szekely *et al.*, 2008). La proline jouerait donc le rôle d'une molécule anti-oxydante et/ou stabiliserait l'activité des enzymes impliquées dans la défense contre le stress oxydatif.

Le cycle P5C/proline découvert récemment chez les plantes (Miller *et al.*, 2009; Cecchini *et al.*, 2011) peut fournir des électrons à la chaîne de transfert des électrons des mitochondries sans produire du glutamate et, sous certaines conditions, peut générer des ERO dans la mitochondrie (figure 1). Par conséquent, le catabolisme de la proline joue un rôle important dans la régulation des niveaux cellulaires en ERO et peut influencer de nombreuses autres voies régulatrices. En effet, le métabolisme de la proline peut influencer la mort cellulaire programmée chez les plantes. Chez *Arabidopsis*, l'interaction incompatible plante-pathogène déclenche, par l'intermédiaire des ERO, une RH qui est accompagnée par une activation locale de *P5CS2* et une accumulation de la proline (Fabro *et al.*, 2004). Dans ces cellules, la proline peut augmenter l'accumulation des transcrits *ProDH* et entraîner une accumulation de P5C qui, en combinaison avec les ERO, peut fonctionner comme un signal

apoptotique déclenchant une RH lors d'une infection par des agents pathogènes avirulents (Fabro *et al.*, 2004). Dans les mitochondries, l'activité de l'ornithine delta-aminotransférase ( $\delta\text{OAT}$ ) permet également de générer du P5C directement (Funk *et al.*, 2008). Senthil-Kumar & Mysore (2012) ont démontré que la régulation coordonnée de *ProDH1* et  $\delta\text{OAT}$  joue un rôle important dans la mise en place de mécanismes de défense contre l'infection par des agents pathogènes grâce à une régulation fine du métabolisme du P5C et la production des ERO. Dans ces interactions plantes-pathogènes, la P5CDH à travers l'oxydation du P5C régule également le cycle P5C/proline pour contrôler la production des ERO.

Outre son rôle protecteur, certaines études suggèrent que le métabolisme de la proline peut réguler l'homéostasie cellulaire dans des conditions de stress. Lors d'un déficit hydrique, la fermeture des stomates réduit la disponibilité de CO $_2$ , ce qui conduit à une réduction de l'activité du cycle de Calvin et, par conséquent, à une diminution de la consommation du pouvoir réducteur NAD(P)H/H $^+$ . L'activation de la biosynthèse de proline dans les chloroplastes permettrait d'atténuer ce phénomène. La synthèse de la proline à partir du glutamate nécessite l'oxydation de deux NAD(P)H $^+$  en NAD(P) $^+$ . En régénérant l'accepteur final de la chaîne de transfert des électrons dans l'appareil photosynthétique, la biosynthèse de la proline permet ainsi de réduire la production des ERO et de participer à la protection contre la photo-inhibition en condition de contraintes (Hare *et al.*, 1998). La biosynthèse de la proline maintient le rapport NAD(P) $^+$ /NAD(P)H compatible avec le métabolisme cellulaire. La dégradation de la proline dans les mitochondries est directement couplée au transport d'électrons et à la synthèse d'ATP au niveau de la chaîne respiratoire. Après la levée de la contrainte, la dégradation de la proline par la *ProDH* et P5CDH fournit du pouvoir réducteur dans la mitochondrie. Les électrons provenant de l'oxydation de la proline vont être transférés à un accepteur de la chaîne respiratoire et donc contribuer à l'approvisionnement énergétique pour la reprise de la croissance (Kavi-Kishor *et al.*, 1995).

## Effet de la proline exogène

Les effets bénéfiques de l'apport exogène de proline sur la tolérance des plantes aux contraintes abiotiques telles que les métaux lourds, la température, la sécheresse et la salinité ont été bien documentés (Ali *et al.*, 2007, 2008; Hayat *et al.*, 2012). Ces auteurs ont rapporté que la pulvérisation foliaire de proline améliore le statut nutritionnel et la croissance du maïs soumis à un déficit hydrique. L'apport exogène de proline contribue à un abaissement

significatif du potentiel hydrique des feuilles de *Vicia faba* au cours d'une contrainte saline (Gadallah *et al.*, 1999), améliorant ainsi son alimentation hydrique. La proline exogène rétablit l'activité photosynthétique et les relations hydriques des feuilles d'*Olea europaea* L. cv Chemlali en conditions de contrainte saline (Ben Ahmed *et al.*, 2010). Selon Sharma *et al.* (1998), la proline exogène protège *in vitro* l'activité enzymatique de la nitrate réductase et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase vis-à-vis des métaux lourds tels que le cadmium ou le zinc.

Outre les effets bénéfiques de son application exogène chez les plantes, la proline peut provoquer des effets toxiques lorsqu'elle est suraccumulée ou appliquée à des concentrations excessives. Une concentration supérieure à 10 mM est toxique pour *Arabidopsis*. Les symptômes causés par la proline incluent des altérations de l'ultrastructure des chloroplastes et des mitochondries ainsi que plusieurs aspects de la mort cellulaire programmée (Hare *et al.*, 2001; Deuschle *et al.*, 2004). Dans le modèle proposé par Chen *et al.* (2011), la proline exogène est capable d'induire la génération des ERO par les NADPH oxydases, qui par la suite induisent la production de SA, conduisant à l'apparition des symptômes de toxicité rappelant ceux observés lors de la RH. L'effet toxique de la proline serait attribué au fait qu'une concentration élevée en proline active le cycle P5C/proline (Cecchini *et al.*, 2011). L'hyperactivation de ce cycle induit une genèse accrue des électrons à partir de l'oxydation incomplète de la proline pouvant dépasser les potentialités de transfert de la chaîne mitochondriale, ce qui a pour conséquence une augmentation du transfert des électrons à l'O<sub>2</sub> et conduit à la formation des ERO (Miller *et al.* 2009).

## Conclusions

L'accumulation de la proline est l'une des stratégies adaptatives fréquemment observées chez les plantes en réponse à diverses contraintes environnementales. Le rôle attribué à la proline dans la réponse des plantes à ces contraintes demeure encore controversé. En dépit des nombreuses études conduites sur la proline, son rôle et les voies de signalisation impliquées dans la régulation de son métabolisme ne sont pas encore bien établis. Nos connaissances sont encore largement insuffisantes, notamment au niveau de la régulation du catabolisme de cet acide aminé et de son rôle dans l'adaptation des plantes aux contraintes environnementales et plus largement chez les eucaryotes dans la régulation de l'homéostasie cellulaire. L'étude de ce métabolisme chez des espèces se développant dans des environnements extrêmes serait une approche pertinente pour analyser la diversité

des mécanismes mis en œuvre par les plantes pour s'adapter, en vue d'établir et de proposer de nouveaux outils ou stratégies expérimentales susceptibles d'améliorer la tolérance des plantes aux contraintes de l'environnement.

*Remerciements.* K. Ben Rejeb a bénéficié d'une bourse de doctorat du Ministère Tunisien de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (LR10CBBC02) et du programme Franco-Tunisien CMCU (Comité Mixte de Coopération Universitaire) n°08G0917. Une partie de cette étude a été également soutenue par les programmes COST FA0605 et COST FA0901.

## Références

- Abraham E., Rigo G., Szekely G., Nagy R., Koncz C., Szabados L., Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 2003, 51, 363–372.
- Ali Q., Ashraf M., Athar H.U.R., Exogenously applied proline at different growth stages enhances growth of two maize cultivars grown under water deficit conditions. *Pak J Bot*, 2007, 39, 1133–1144.
- Ali Q., Ashraf M., Shahbaz M., Humera H., Ameliorating effect of foliar applied proline on nutrient uptake in water stressed maize (*Zea mays* L.) plants. *Pak J Bot*, 2008, 40, 211–219.
- Alia M.P., Matysik J., Effect of proline on the production of singlet oxygen. *Amino Acids*, 2001, 21, 195–200.
- Ben Ahmed C., Ben Rouina B., Sensoy S., Boukhriss M., Ben Abdullah F., Exogenous proline effects on photosynthetic performance and antioxidant defense system of young olive tree. *J Agric Food Chem*, 2010, 58, 4216–4222.
- Borsani O., Zhu J., Verslues P.E., Sunkar R., Zhu J.-K., Endogenous siRNAs derived from a pair of natural *cis*-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell*, 2005, 123, 1279–1291.
- Cecchini M.N., Monteoliva I.M., Marya E.A., Proline dehydrogenase contributes to pathogen defense in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2011, 155, 1947–1959.
- Chadalavada S., B Rajendrakumar., Reddy V., Reddy A., Proline-protein interactions: protection of structural and functional integrity of M4 lactate dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 201, 957–963.
- Chen J., Zhang Y., Wang C., Lü W., Jin J.B., Hua X., Proline induces calcium-mediated oxidative burst and salicylic acid signaling. *Amino Acids*, 2011, 40, 1473–1484.
- Deuschle K., Funck D., Forlani G., Stransky H., Biehl A., Leister D., van der Graaff E., Kunze R., Frommer W.B., The role of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation. *Plant Cell*, 2004, 16, 3413–3425.

- Di Martino C., Pizzuto R., Pallotta M.L., De Santis A., Passarella S., Mitochondrial transport in proline catabolism in plants: the existence of two separate translocators in mitochondria isolated from durum wheat seedlings. *Planta*, 2006, 223, 1123–1133.
- Fabro G., Kovács I., Pavet V., Szabados L., Alvarez M.E., Proline accumulation and *AtP5CS2* gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2004, 17, 343–350.
- Floyd R.A., Nagy I., Formation of long-lived hydroxyl free-radical adducts of proline and hydroxyproline in a Fenton reaction. *Biochim Biophys Acta*, 1984, 790, 94–97.
- Funck D., Stadelhofer B., Koch W., Ornithine-delta-aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis. *BMC Plant Biol*, 2008, 17, 8–40.
- Gadallah M.A.A., Effects of proline and glycinebetaine on *Vicia faba* responses to salt stress. *Biol Plant*, 1999, 42, 249–257.
- Ghars M.A., Parre E., Leprince A.S., Bordenave M., Lefebvre D., Richard L., Abdelly C., Savouré A., Opposite lipid signalling pathways tightly control proline accumulation in *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*. In C. Abdelly, M. Ashraf, C. Grignon, M. Ozturk (Eds.), *Biosaline Agriculture and Salinity Tolerance in Plants*, 2008a, pp. 317–332.
- Ghars M.A., Parre E., Debez A., Bordenave M., Richard L., Lepoint L., Bouchereau A., Savouré A., Abdelly C., Comparative salt tolerance analysis between *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*, with special emphasis on  $K^+/Na^+$  selectivity and proline accumulation. *J Plant Physiol*, 2008b, 165, 588–599.
- Ghars M.A., Richard L., Lefebvre-De Vos D., Leprince A.S., Parre E., Bordenave M., Abdelly C., Savouré A., Phospholipases C and D modulate proline accumulation in *Thellungiella halophila/salsuginea* differently according to the severity of salt or hyperosmotic stress. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53, 183–192.
- Hamilton E., Heckathorn S., Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by antioxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. *Plant Physiol*, 2001, 126, 1266–1274.
- Hanson J., Hanssen M., Wiese A., Hendriks M., Smeekens S., The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of *ASPARAGINE SYNTHETASE1* and *PROLINE DEHYDROGENASE2*. *Plant J*, 2008, 53, 935–949.
- Hare P.D., Cress W.A., Van Staden, J., Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ*, 1998, 21, 535–553.
- Hare P.D., Cress W.A., Van Staden J., The effects of exogenous proline and proline analogues on *in vitro* shoot organogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regul*, 2001, 34, 203–207.
- Hayashi F., Ichino T., Osanai R., Wada K., Oscillation and regulation of proline content by *P5CS* and *ProDH* gene expressions in the light/dark cycles in *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Cell Physiol*, 2000, 41, 1096–1101.
- Hayat S., Hayat Q., Alyemeni M.N., Wani A.S., Pichtel J., Aqil A., Role of proline under changing environment. *Plant Signal Behav*, 2012, 7, 1–11.
- Hua B., Guo W.Y., Effect of exogenous proline on SOD and POD activity of soybean callus under salt stress. *Acta Agric Boreali-Sin*, 2002, 17, 37–40.
- Kant S., Kant P., Raveh E., Barak S., Evidence that differential gene expression between the halophyte, *Thellungiella halophila*, and *Arabidopsis thaliana* is responsible for higher levels of the compatible osmolyte proline and tight control of  $Na^+$  uptake in *T. halophila*. *Plant Cell Environ*, 2006, 29, 1220–1234.
- Kavi Kishor P.B., Hong Z., Miao G.H., Hu C.A.A., Verma, D.P.S., Overexpression of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol*, 1995, 108, 1387–1394.
- Liu J., Zhu J.-K., Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 1997, 114, 591–596.
- Megdiche W., Ben Amor N., Debez A., Hessini K., Ksouri R., Abdelly C., Physiological and biochemical traits involved in the genotypic variability to salt tolerance of Tunisian *Cakile maritima*. *Afr J Ecol*, 2009, 47, 774–783.
- Miller G., Honig A., Stein H., Suzuki N., Mittler R., Zilberstein A., Unraveling delta1-pyrroline-5-carboxylate-proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes. *J Biol Chem*, 2009, 284, 26482–26492.
- Mishra S., Dubey R.S., Inhibition of ribonuclease and protease activities in arsenic-exposed rice seedlings: role of proline as enzyme protectant. *J Plant Physiol*, 2006, 163, 927–936.
- Parre E., Ghars M.A., Leprince A.-S., Thiery L., Lefebvre D., Bordenave M., R Luc., Mazars C., Abdelly C., Savouré A., Calcium signaling *via* phospholipase C is essential for proline accumulation upon ionic but not nonionic hyperosmotic stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2007, 144, 503–512.
- Peng Z., Lu Q., Verma D. P., Reciprocal regulation of delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. *Mol Gen Genet*, 1996, 253, 334–341.
- Satoh R., Nakashima K., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., ACTCAT, a novel *cis*-acting element for proline- and hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene encoding proline dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2002, 130, 709–719.
- Satoh R., Fujita Y., Nakashima K., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.Y., A novel subgroup of bZIP proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45, 309–317.



- Savouré A., Hua X.J., Bertauche N., Van Montagu M., Verbruggen N., Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet*, 1997, 254, 104–109.
- Schobert B., Tschesche H., Unusual properties of proline and its interaction with proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1978, 541, 270–277.
- Senthil-Kumar M., Mysore K.S., Ornithine-delta-aminotransferase and proline dehydrogenase genes play a role in non-host disease resistance by regulating pyrroline-5-carboxylate metabolism-induced hypersensitive response. *Plant Cell Environ*, 2012, 35, 1329–1343.
- Servet C., Ghelis T., Richard L., Zilberstein A., Savouré A., Proline dehydrogenase: a key enzyme in controlling cellular homeostasis. *Front Biosci*, 2012, 17, 607–620.
- Sharma S.S., Schat H., Vooijs R., *In vitro* alleviation of heavy metal-induced enzyme inhibition by proline. *Phytochemistry*, 1998, 49, 1531–1535.
- Sharma S., Verslues P.E., Mechanisms independent of ABA or proline feedback have a predominant role in transcriptional regulation of proline metabolism during low water potential and stress recovery. *Plant Cell Environ*, 2010, 33, 1838–1851.
- Sharma S., Villamor J.G., Verslues P.E., Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. *Plant Physiol*, 2011, 157, 292–304.
- Slama I., Messedi D., Ghnaya T., Savouré A., Abdelly C., Effects of water-deficit on growth and proline metabolism in *Sesuvium portulacastrum*. *Environ Exp Bot*, 2006, 56, 231–238.
- Smirnoff N., Cumbes Q.J., Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 1989, 28, 1057–1060.
- Solomon A., Beer S., Waisel Y., Paleg L.G., Effects of NaCl on the carboxylating activity of Rubisco from *Tamarix jordanis* in the presence of proline-related compatible solutes. *Physiol Plant*, 1994, 90, 198–204.
- Strizhov N., Abraham E., Okresz L., Blickling S., Zilberstein A., Schell J., Koncz C., Szabados L., Differential expression of two *P5CS* genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis*. *Plant J*, 1997, 12, 557–569.
- Szabados L., Savouré A., Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci*, 2010, 15, 89–97.
- Szekely G., Abraham E., Cselo A., Rigo G., Zsigmond L., Csiszar J., Ayaydin F., Strizhov N., Jasik J., Schmelzer E., Koncz C., Szabados L., Duplicated *P5CS* genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant J*, 2008, 53, 11–28.
- Thiery L., Leprince A.-S., Lefebvre D., Ghars M.A., Debarbieux E., Savouré A., Phospholipase D is a negative regulator of proline biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 2004, 279, 14812–14818.
- Verslues P.E., Agarwal M., Katiyar-Agarwal S., Zhu J., Zhu J.-K., Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J*, 2006, 45, 523–539.
- Verslues P.E., Sharma S., Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *Arabidopsis Book*, 2010, 8, e0140.
- Yamada M., Morishita H., Urano K., Shiozaki N., Kazuko Y.S., Shinozaki K., Yoshida, Y., Effects of proline accumulation in petunias under drought stress. *J Expt Bot*, 2005, 56, 1975–1981.
- Zhang C.S., Lu Q., Verma D.P.S., Removal of feedback inhibition of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. *J Biol Chem*, 1995, 270, 20491–20496.
- Zhao M.G., Chen L., Zhang L.L., Zhang W.H., Nitric reductase-dependent nitric oxide production is involved in cold acclimation and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2009, 151, 755–767.